Aus dem Institut für Physiologie der Universität zu Lübeck
Direktorin: Univ. Prof. Dr. rer. nat. Kristina Kusche-Vihrog

UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Charakterisierung endothelabhängiger arteriolärer Dilatationen in vivo und des Blutdrucks in der Maus nach Deletion des muscarinergen Rezeptors M3 oder des G-Proteins $G_{q/11}$ im Endothel

Inauguraldissertation zur Erlangung der
Doktorwürde der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Jakob David Speiser
aus Reutlingen

Lübeck 2019

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Cor de Wit
2. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Salaheldien Mohamed
Tag der mündlichen Prüfung:	30.10.2019
Zum Druck genehmigt:	Lübeck, den 30.10.2019

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis **v**

Tabellenverzeichnis **v**

Abkürzungsverzeichnis **vi**

1 Einleitung **1**

1.1 Anforderungen an das Herzkreislaufsystem 1

1.2 Physikalische Grundlagen des Herzkreislaufsystems 2

1.3 Regulation der Gefäßweite 4

1.3.1 Endotheliale Vasodilatation 6

1.3.2 Muscarinerge Acetylcholinrezeptoren 8

1.3.3 Acetylcholin induzierte Vasodilatation 10

1.3.4 Andere dilatierende Substanzen 12

1.3.5 Das $G\alpha_{q/11}$-Protein 14

1.4 Ziele der Arbeit 15

2 Material und Methoden **18**

2.1 Versuchstiere 18

2.1.1 M3-Rezeptor-defiziente Mäuse 18

2.1.2 $G_{q/11}$-Defiziente Mäuse 19

2.2 Substanzen und Lösungen 20

2.3 Radiotelemetrische Messung der Herzkreislaufparameter 20
2.4 Intravitalmikroskopie 21
2.4.1 Präparation 21
2.4.2 Apparativer Aufbau 24
2.4.3 Datenaufzeichnung 24
2.4.4 Versuchsdurchführung 25
2.5 Verarbeitung von Messwerten und statistische Auswertung 26

3 Ergebnisse **28**
3.1 Makrohämodynamik 28
3.1.1 Blutdruck und Herzfrequenz in endothelspezifischen M3-Rezeptor defizienten Mäusen 28
3.2 Mikrozirkulation 30
3.2.1 Defizienz des $G_{q/11}$-Proteins 30
3.2.2 Wirkung von Atropin in der Mikrozirkulation 33
3.2.3 Defizienz des M3-Rezeptors 36
3.2.4 Vergleich der Deletionsmethoden 44

4 Diskussion **47**
4.1 Einordnung in die aktuelle Studienlage 48
4.1.1 Besonderheiten des Versuchaufbaus 51
4.2 ACh-induzierte Vasodilatation in der Mikrozirkulation ist abhängig von M3-Rezeptoren 53
4.2.1 M3R Restaktivität ist abhängig von der Deletionsmethode 54
4.2.2 Adäquater M3R-Verlust reduziert die Wirksamkeit anderer Vasodilatatoren 57
4.3 $G_{q/11}$-Defizienz führt zu reduzierter Vasodilatation 60
4.4 Makrohämodynamische Veränderungen 62

4.5 Stärken und Schwächen der Untersuchungsmethode: 63
4.5.1 Fehlende Charakterisierung der genetischen Ausschaltung 65
4.6 Zukünftige Fragestellungen 66

5 Zusammenfassung **69**

Literaturverzeichnis **71**

Eidesstattliche Erklärung **84**

Anhang **85**

Danksagung **87**

Lebenslauf **88**

Publikationen **89**

Abbildungsverzeichnis

3.1 Dilatationen in Arteriolen von $G_{q/11}$-Defizienten Mäusen 31
3.2 Wirkung von Atropin auf die Mikrozirkulation 34
3.3 Vasoaktive Substanzen unter Atropin 35
3.4 Deletion des M3-Rezeptors durch $CreER^{Tam}$ 39
3.5 Deletion des M3-Rezeptors durch Tie2Cre 43

Tabellenverzeichnis

3.1 Blutdruck und Herzfrequenz in M3-Defizienten Mäusen 29
3.2 Vergleich der Vasodilatation in $CreER^{Tam}$ und Tie2Cre 46

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Endothelzellen
EDHF	Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
GEF	Guanosine triphosphate Exchange Factor
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
IP3	Inositoltrisphosphat
L-NNA	N^{ω}-nitro-L-arginin
M3R	M3-Rezeptor
mAChR	muscarinerge ACh-Rezeptoren
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NO	Stickstoffmonoxid
PKA	Protein Kinase A
rtPCR	realtime Polymerase-Kettenreaktion

sGC	lösliche Guanylatcyclase
SNP	Natrium-Nitroprussid
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Anforderungen an das Herzkreislaufsystem

Die Gewebe von Aerobiern benötigen zum Leben Sauerstoff und Nährstoffe. In Mehrzellern ist die Versorgung durch Diffusion begrenzt, so dass sich evolutionär mit zunehmender Größe der Organismen Transportsysteme entwickelt haben. Bei Säugetieren übernimmt diese Aufgabe das Herzkreislaufsystem, dessen zwei in Reihe geschaltete und durch das Herz verbundene Kreisläufe den konvektiven Transport von Blut im Körper ermöglichen. Mit dem Blut werden die Atemgase, Nähr- und Abfallstoffe, Botenstoffe sowie zelluläre und humorale Bestandteile der Immunabwehr transportiert. Im Kapillarbett der Zielorgane können diese in das umliegende Gewebe diffundieren oder übertreten. Zusätzlich dient die Blutzirkulation der pH- und Wärmeregulation im Organismus.

Der arterielle Blutfluss wird durch die Pumparbeit des Herzmuskels angetrieben. In der Systole wird Blut durch rhythmische Kontraktion aus den Herzkammern in die Arterien gepumpt. Die großen Arterien sorgen durch ihre Windkesselfunktion für die Aufrechterhaltung des Flusses während der Diastole.

Der Sauerstoff- und Nährstoffbedarf der Organe ist variabel und teilweise stark von deren Aktivität abhängig. Im Skelettmuskel wird eine bis zu 100fache Steigerung der Ruhedurchblutung während starker Arbeit beschrieben [100] und auch die Durchblutung der Haut und des Gastrointestinaltrakts unterliegen starken Schwankungen. Andere Organe wie die Nieren sind hingegen auf einen möglichst konstanten Blutfluss

angewiesen, unabhängig von Änderungen der kardialen Pumpleistung und des arteriellen Blutdrucks. Die Anforderung an das Herzkreislaufsystem ist, jedem Organ zu jedem Zeitpunkt eine dem jeweiligen Bedarf entsprechende Durchblutung zu gewährleisten. Dies erfordert, dass die Durchblutung lokal regulierbar ist und sich möglichst schnell an einen geänderten Bedarf oder geänderte Parameter adaptiert. Andererseits ist die kardiale Funktion nach oben begrenzt, so dass eine gleichzeitige maximale Versorgung aller Organe die Leistungsfähigkeit des Herzens übersteigt. Um einen Zusammenbruch des Blutkreislaufs bei global gesteigertem Bedarf zu verhindern, muss durch zentrale Regulation die Aufrechterhaltung des systemischen Blutdrucks zur kontinuierlichen Versorgung zunächst aller, und im Notfall bevorzugt der überlebensnotwendigen Organe möglich sein.

1.2 Physikalische Grundlagen des Herzkreislaufsystems

Durch die Kontraktion des Herzmuskels wird Blut in das arterielle Gefäßsystem gepumpt. Der Volumenstrom ($\dot{V}$) ist das Maß für das pro Zeiteinheit (Δt) transportierte Blutvolumen (V) [5]:

$$\dot{V} = \frac{V}{\Delta t} \tag{1.1}$$

Der Volumenstrom wird in der Physiologie oft als Herzzeitvolumen bezeichnet und in Litern pro Minute angegeben. Durch Variation der Schlagfrequenz und Kontraktilität kann der Herzmuskel das Herzzeitvolumen anpassen und in Belastungssituationen kurzfristig um etwa das fünffache steigern [5]. Der Bedarf der einzelnen Organe ist jedoch variabel und erfordert eine differenziertere Anpassung der Durchblutung. Diese Regulation der Organdurchblutung geschieht lokal durch Änderung der Gefäßdurchmesser in Arteriolen, den sogenannten Widerstandsgefäßen. Betrachtet man den Blutkreislauf als laminare Strömung in einem geraden Rohr, kann durch das Gesetz

von Ohm die Stromstärke ($\dot{V}$) als Quotient aus der Druckdifferenz (Δp) und des Strömungswiderstands (R) beschrieben werden:

$$\dot{V} = \frac{\Delta p}{R} \tag{1.2}$$

Hagen und Poiseuille definieren den Strömungswiderstand als abhängig von der Viskosität (η) des Fluids, der Gefäßlänge (l) und dem Gefäßradius (r). Erweitert man die Gleichung der Stromstärke um die Gleichung des Strömungswiderstands ergibt sich:

$$\dot{V} = \frac{\Delta p \cdot \pi \cdot r^4}{8 \cdot \eta \cdot l} \tag{1.3}$$

Da die Viskosität und Gefäßlänge in vivo relativ konstant bleiben, ist die Stromstärke proportional zur vierten Potenz des Gefäßradius. Die Arteriolen determinieren also durch ihren Durchmesser, bei gleichbleibendem Blutdruck, den Volumenstrom ins nachgeschaltete Kapillarbett und damit die Durchblutung eines Organs.

Unabhängig vom Volumenstrom in einzelnen Organen bleibt das Herzzeitvolumen des gesamten Blutkreislaufs in Ruhe relativ konstant. Somit kann die Gleichung in 1.2 und 1.3 auch zur Druckdifferenz (Δp) aufgelöst werden. Eine Änderung des Strömungswiderstandes führt daher zu einer gleichsinnigen Änderung der Druckdifferenz, die Arteriolen determinieren durch ihren Durchmesser also auch den arteriellen Blutdruck. Erst durch das Zusammenspiel aus Strömungswiderstand der Arteriolen und der Pumparbeit des Herzens baut sich der arterielle Blutdruck auf. Die exakte Regulation des arteriolären Gefäßdurchmessers ist daher in hohem Maße relevant für die Funktion des Herzkreislaufsystems.

Da sich das Gefäßsystem parallel verzweigt, gilt nach dem zweiten Kirchhoff-Gesetz, dass der Kehrwert des Gesamtwiderstands der Summe der Kehrwerte der Einzelwiderstände entspricht. Bei Reduktion eines Organwiderstands durch lokale Vasodilatation würde demnach der Volumenstrom in anderen Organen abnehmen

und der gesamt arterielle Blutdruck fallen. Im gesunden Organismus erfolgt zur Kompensation eine zentrale Gegenregulation, in diesem Fall die Erhöhung des Volumenstroms. Generell gilt, dass die Organdurchblutung durch Änderung des Widerstands (Vasodilatation) lokal reguliert wird, während zur Aufrechterhaltung des Blutdrucks vor allem eine systemische Regulation durch Steigerung des Herzzeitvolumens erfolgt. Ist diese in extremen Situationen nicht ausreichend, kommt es zusätzlich zu einer zentral gesteuerten Vasokonstriktion in nicht akut überlebensnotwendigen Organen.

1.3 Regulation der Gefäßweite

Die Organdurchblutung wird bei gegebenem systemischem Blutdruck durch Änderung des arteriellen Gefäßdurchmessers an den aktuellen Bedarf adaptiert. Der Durchmesser ist dabei abhängig vom Kontraktionszustand glatter Muskelzellen in der Tunica media der Gefäßwand, welche durch tight junctions miteinander verbunden sind [45] und dadurch zirkulär auf das Gefäß wirken. Eine Erhöhung des Tonus der glatten Gefäßmuskulatur führt zur Vasokonstriktion, eine Reduktion zur Vasodilatation. In den großen Blufgefäßen findet sich zwischen den glatten Muskelzellen ein hoher Anteil des elastischen Strukturproteins Elastin. Durch die Pulsdruckwelle kommt es zur Dehnung des Elastin, systolische Druckspitzen werden abgefedert und im Gegenzug der diastolische Druck stabilisiert. Der Durchmesser des Gefäßes ist dabei pulsvariabel. In den weiter peripher liegenden Gefäßen nimmt der Elastinanteil kontinuierlich ab, der muskuläre Anteil überwiegt und führt zu einem von der Pulswelle unabhängigem Gefäßdurchmesser, der sich nun vor allem durch den Kontraktionszustand der glatten Muskulatur definiert [74]. Entlang der kleinen Arterien und Arteriolen fällt der Mitteldruck am stärksten ab, da diese den höchsten Widerstand entlang der Gefäßstrecke innehaben und daher als „Widerstandsgefäße“ bezeichnet werden.

In den glatten Gefäßmuskelzellen ist die Aktivität der einzelnen kontraktilen Filamente abhängig von der Phosphorylierung der regulatorischen leichten Kette des Myosins [66]. Wird die phosphorylierende Aktivität der Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK) reduziert, oder die dephosphorylierende Aktivität der Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) gesteigert, kommt es zu einer Verringerung der Phosphorylierung der Myosin Leichtketten hin zum inaktiven Zustand und der Muskel relaxiert. Das Verhältnis der Aktivität von MLCK und MLCP kann ein beliebiges Gleichgewicht einnehmen, so dass der Gefäßdurchmesser in den Widerstandsgefäßen variabel alle Zustände zwischen maximaler Konstriktion und Dilatation erreichen kann.

Die Aktivität der MLCK ist abhängig von der Bindung eines Calcium-Calmodulin-Komplexes. Bei sinkender intrazellulärer Calciumkonzentration zerfällt der Komplex und die MLCK wird inaktiv [92], die glatte Muskulatur relaxiert. Die Reduktion des intrazellulären Calciums erfolgt einerseits mittels aktiven Transports aus dem Zellplasma durch Ca^{2+}-ATPasen in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums in diese Speicher [17], andererseits durch Verringerung des Calciumeinstroms durch Hyperpolarisation der Zelle über ${K^+}_{ATP}$-Kanäle und andere Kaliumkanäle [87]. Umgekehrt kommt es bei einer Depolarisation der glatten Muskelzelle durch elektromechanische Kopplung zur spannungsabhängigen Öffnung der Calciumkanäle in der Zellmembran, sodass ein Calciumeinstrom und eine Kontraktion induziert wird. Außerdem kann Ca^{2+} im Rahmen der pharmakomechanischen Kopplung nach Rezeptoraktivierung und Bildung des second Messengers Inositoltrisphosphat (IP3) aus dem sarkoplasmatischem Retikulum freigesetzt werden [108].

Die MLCK und vor allem auch die MLCP können zusätzlich durch Proteinkinasen auch selbst phosphoryliert und so in ihrer Aktivität moduliert werden, wodurch eine Calcium-unabhängige Regulation des Kontraktionszustands der glatten Muskulatur möglich ist [107].

Der Tonus der glatten Muskelzellen kann sowohl auf lokaler Ebene durch metabolische, chemische und mechanische Faktoren [4, 83], als auch durch zentrale Stimulation über nervale oder hormonelle Signale beeinflusst werden. Während die Nervenfasern der Gefäße als Teil des sympathischen Nervensystems direkt an den glatten Muskelzellen ansetzen [44], wirken viele lokale und hormonelle Faktoren zunächst auf die Endothelzellen der Tunica intima. Nach Aktivierung nimmt das Endothel über verschiedene Signalwege Einfluss auf die glatte Muskulatur. Ohne funktionales Endothel wird die Wirksamkeit vieler vasoaktiver Substanzen verändert oder aufgehoben. Teilweise führt derselbe Stimulus bei direkter Wirkung am glatten Muskel zu einer gegensätzlichen Reaktion, wodurch in vitro und in vivo Ergebnisse voneinander abweichen können [43]. Im Rahmen dieser Arbeit wird die lokal metabolische und chemische Regulation des Gefäßtonus in der Mikrozirkulation des Skelettmuskels in vivo weiter beleuchtet.

1.3.1 Endotheliale Vasodilatation

Furchgott und Zawadzki entdeckten 1980, dass sich die in vivo beobachtete vasodilatatorische Wirkung von Acetylcholin in Gefäßpräparaten nur reproduzieren lies, wenn das Endothel durch besonders schonende Präparation unverletzt blieb. In Präparaten mit zerstörtem Endothel kam es stattdessen nach ACh-Gabe zur Vasokonstriktion [43]. Diese Beobachtungen waren der Ausgangspunkt für die Erforschung endothelialer Funktionalität im arteriellen Gefäßsystem.

Die Stimulation des Endothels erfolgt lokal durch Metabolite aus dem Blut und den umliegenden Geweben [114] sowie durch die Scherkraft des Blutstroms an der luminalen Zelloberfläche [93]. Mittlerweile sind drei Transduktionswege bekannt, über die das Endothel den glatten Gefäßmuskel relaxieren kann. Die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) bildet im Endothel Stickstoffmonoxid (NO), welcher zur glatten Muskelzelle diffundiert. Im glatten Muskel bindet NO an die lösliche Guanylatcyclase

(sGC) und führt zur Bildung von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) [58, 116]. cGMP reduziert die intrazelluläre Calciumkonzentration und damit die Aktivität der MLCK, steigert durch die Proteinkinase G aber auch direkt die Aktivität der MLCP. Trotz bekannter endothelialer Funktion blieb die Existenz von NO als Botenstoff lange Zeit unbekannt, sodass vor Identifizierung allgemein von einem endothelabhängigen relaxierendem Faktor (EDRF - endothelium-derived-relaxing-factor) gesprochen wurde.

Einen weiteren Signalweg stellt die endotheliale Synthese von Eikosanoiden durch die Cyclooxygenasen (COX) und die Epoxygenasen (EOX) dar [80]. Die Eikosanoide (vornehmlich Prostanoide) diffundieren ebenfalls vom Endothel zum glatten Muskel und führen dort zur Stimulation von G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Dadurch kommt es unter anderem zu einem intrazellulären Anstieg von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP), Aktivierung der Protein Kinase A (PKA) und nachgeschalteter Relaxation des glatten Muskels [72].

Blockiert man die endotheliale Produktion von NO und Prostanoiden (Eikosanoiden) durch Hemmung der eNOS durch *N*-Nitro-L-arginin und der COX durch Indometacin, lösen manche Vasodilatatoren wie beispielsweise Acetylcholin weiterhin eine endothelabhängige Relaxation des glatten Muskels aus [20, 46]. Dabei kommt es zu einer Hyperpolarisation der glatten Muskulatur [12] und es wurde in Anlehnung an den EDRF der Begriff des Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF) geprägt. Ob es sich dabei tatsächlich um einen löslichen Faktor oder um direkte elektrotonische Kopplung handelt ist Gegenstand aktueller Forschung [16, 36], sodass zunehmend die Bezeichnung endothel-abhängige Hyperpolarisation (EDH) Verwendung findet [47].

Während die Signaltransduktion zwischen Endothel und glattem Muskel in den großen Gefäßen vornehmlich durch NO vermittelt wird, überwiegt in kleinen Gefäßen, beispielsweise den Arteriolen, der EDHF Signalweg [68, 104]. Damit ist EDHF außerordentlich relevant für die Kalibrierung des Blutdrucks und der Organdurchblutung [75]. Die hyperpolarisierende Wirkung von EDHF in der glatten

Muskulatur wird ausgelöst (oder zumindest verstärkt) durch die Aktivierung von endothelständigen, vornehmlich calciumabhängigen Kalium-Kanälen [78], wobei der vorausgehende endotheliale Calciumeinstrom vermutlich über TRPV4-Kanäle erfolgt [69]. Durch die fortgeleitete Hyperpolarisation auf die glatte Muskelzelle kommt es dort zur Inaktivierung von spannungsgesteuerten Calciumkanälen [86], die zelluläre Calciumkonzentration sinkt und der Muskel relaxiert.

1.3.2 Muscarinerge Acetylcholinrezeptoren

Der Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) dient seit den Ergebnissen Furchgotts als Goldstandard zur Untersuchung endothelabhängiger Vasodilatationen. Im Gefäßsystem wirkt Acetylcholin durch Aktivierung der metabotropen muscarinergen ACh-Rezeptoren [32]. Die muscarinergen ACh-Rezeptoren (mAChR) gehören der Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren an und zeigen deren typischen Aufbau, der durch sieben hydrophobe transmembranäre α-Helices charakterisiert ist, welche abwechselnd durch drei zytoplasmatische und drei extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind [121]. Acetylcholin bindet als Ligand extrazellulär in einer durch die α-Helices gebildeten hydrophilen Tasche [59, 123]. Die daraus resultierende Konformationsänderung des Rezeptors eröffnet auf der zytoplasmatischen Seite mehrere Kontaktstellen, an die ein einzelnes heterotrimeres, inaktives G-Protein binden kann und dadurch aktiviert wird [62, 89]. Die α-Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins hat im inaktiven Zustand Guanosindiphosphat (GDP) gebunden. Durch die Aktivierung wird GDP durch Guanosintriphosphat (GTP) ersetzt und das G-Protein zerfällt in die Untereinheiten Gα und G$\beta/$Gγ [89]. Die aktiven Untereinheiten dissoziieren vom Rezeptor und führen über die Bildung von second messengern zur weiteren intrazellulären Transduktion des Signals [56].

Pharmakologische Versuche mit dem Anticholinergikum Pirenzepin zeigten unterschiedliche Affinitäten der untersuchten mAChR [10] und waren ein erster Hinweis

darauf, dass es sich um eine Rezeptorfamilie mit mehreren Subtypen handeln muss [22]. Durch Klonierung und genetischen Analysen wurden Ende der 1980er Jahre alle Gene der fünf heute bekannten Subtypen beschrieben [13, 14]. Innerhalb der muscarinerge ACh-Rezeptoren (mAChR)-Familie ist die Aminosäuresequenz der transmembranären Helices in ihrer Abfolge sehr ähnlich, lediglich die erste Helix und einzelne interhelikale Schleifen zeigen deutliche Unterschiede zwischen den Rezeptorsubgruppen [59]. Anhand dieser Unterschiede lassen sich die Rezeptoren in zwei Kategorien einteilen, welche mit den jeweils gekoppelten G-Proteinen übereinstimmen [21]: Die ähnlichen Subtypen M1, M3 und M5 koppeln an Proteine der Familie $G_{q/11}$ [8], die Subtypen M2 und M4 differieren in ihrem Aufbau und koppeln an $G_{i/0}$-Proteine [90].

Die zelluläre Expression der Rezeptorsubtypen ist abhängig vom untersuchten Gewebe und dessen Lokalisation im Körper und bis heute Gegenstand der Forschung. In nicht zentralnervösen Arterien scheinen vor allem die Rezeptoren M1, M2 und M3 exprimiert zu werden: Messenger Ribonukleinsäure (mRNA) dieser Rezeptoren findet sich beispielsweise in isoliertem bovinem Aortenendothel [112]. In Westernblot-Untersuchungen an Mesenterialarterien der Ratte wurden dieselben Rezeptoren gefunden, der M2-Rezeptor jedoch mit niedriger Expression und der M1-Rezeptor nicht spezifisch im Endothel [110]. In der isolierten A. ophthalmica der Maus wurde durch realtime Polymerase-Kettenreaktion (rtPCR) das Vorkommen von RNA aller fünf mAChR nachgewiesen, der M2 und M4 Rezeptor jedoch mit deutlich niedriger Expression [48]. Ebenso exprimieren kultivierte murine Endothelzellen aus der zerebralen Mikrozirkulation mRNA aller Rezeptorsubtypen [94]. Muscarinerge Acetylcholinrezeptoren finden sich auch direkt auf Zellen der glatten Gefäßmuskulatur [60] und sind vermutlich für die von Furchgott beobachtete Vasokonstriktion bei zerstörtem Endothel verantwortlich. Schließlich exprimieren auch Nervenzellen der Gefäße muscarinerge Rezeptoren und können somit ebenfalls zu den unterschiedlichen Reaktionen bei Acetylcholingabe beitragen [110].

1.3.3 Acetylcholin induzierte Vasodilatation

Acetylcholin führt in Mäusen, als auch in vielen anderen Säugetieren wie beispielsweise dem Menschen, in vivo zu einer potenten endothelabhängigen arteriellen Dilatation. Diese wurde sowohl in großen Gefäßen wie der Aorta, A. carotis und A. mesenterica [33], als auch in kleinen Gefäßen, bis hin zur Mikrozirkulation [97] beobachtet. Die Wirkung von Acetylcholin wird mediiert durch die endothelialen, $G_{q/11}$-Protein gekoppelten, muscarinergen Rezeptoren M1, M3 und M5 [49], jedoch ist die jeweilige Relevanz der einzelnen Subtypen abhängig vom untersuchten Gewebe und wird weiterhin erforscht. Allgemein scheint für die Wirkung in peripheren Arterien vor allem der endotheliale M3-Rezeptor verantwortlich zu sein [32, 43], dessen mRNA Expression auch die höchsten Werte erreicht [49], während der M1 und M5 Subtyp spezialisierten Geweben vorbehalten sind. So sind Dilatationen durch ACh an isolierten Koronararterien des Rinds [18], der A. femoralis [38] und der A. cerebralis media [27] der Katze abhängig vom M3 Rezeptor. Neuere Studien zeigen abweichende Ergebnisse für Arterien und Arteriolen des zentralen Nervensystems mit einer funktionell dominanten Rolle des M5-Rezeptors [127], obwohl auch in der zerebralen Mikrozirkulation die mRNA Expression des M3-Rezeptors um ein vielfaches höher ist [94]. Die Einordnung früherer Studien ist zudem erschwert, da der M5-Rezeptor erst später charakterisiert wurde und dessen Wirkung zuvor möglicherweise anderen Subtypen zugeordnet wurde.

Trotz vieler ähnlicher Ergebnisse zwischen Gefäßgebieten und verschiedener Spezies, lassen sich Beobachtungen nur bedingt übertragen. Duckles beschrieb beispielsweie das Fehlen von Acetylcholin induzierter Vasodilatation an isolierten bovinen Koronarien, während periphere Arterien deutlich dilatierten [30]. Ebenfalls relevant ist, ob Ergebnisse in vivo oder in vitro erzielt wurden, da auch hier deutliche Unterschiede zu beobachten sind [2].

Frühere Studien zur Spezifität der mAChR beruhen auf der medikamentösen Antagonisierung einzelner Subtypen. Aufgrund der ähnlichen Rezeptorstruktur haben

die Antagonisten jedoch auch eine (fast immer relevante) Affinität zu den anderen Rezeptorsubtypen. Zum Erreichen der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) der einzelnen Rezeptoren sind daher nur geringe Konzentrationsunterschiede notwendig, wodurch eine pharmakologische Differenzierung erschwert ist. Durch die oftmals parallele Expression mehrerer Subtypen in den Geweben sind die so gewonnenen Ergebnisse mit einem hohen Unsicherheitsfaktor behaftet [21, 120].

Erst in den 2000er Jahren gelang es, durch genetische Methoden einzelne mAChR-Subtypen spezifisch auszuschalten und sicherere Aussagen zur jeweiligen Relevanz zu machen [122]. Yamada et al. zeigten in M5-Rezeptor-defizienten Mäusen die Relevanz des M5-Rezeptors sowohl in Arterien und Arteriolen des zentralen Nervensystems (ZNS), wiesen aber auch nach, dass dieser für Acetylcholin induzierte Dilatationen der A. carotis und der Koronarien keine Rolle spielt [127]. Lamping et al. untersuchten Dilatationen an isolierten Koronarien und der Aorta von M2- oder M3-Rezeptor defizienten Mäusen. Der Verlust des M2-Rezeptors führte zu keiner Änderung, während die Vasodilatation nach Acetylcholin in M3-Rezeptor defizienten Mäusen aufgehoben war [73]. In isolierten Femoralarterien der Maus sowie ebenfalls in der Aorta führte der Verlust des M3-Rezeptors wiederum zu einer Aufhebung der ACh-Wirkung, während der Verlust des M1- und M2-Rezeptor zu keiner Änderung führte [7]. Eine Gruppe um Gericke et al. untersuchte die isolierte A. ophthalmica der Maus, wo der Verlust des M3-Rezeptors ebenfalls zu einer aufgehobenen Acetylcholinreaktion führte, während der Verlust des M5-Rezeptors folgenlos blieb [48]. Dieselbe Gruppe untersuchte in weiteren Versuchen isolierte kleine Arterien der Niere, des Skelettmuskels und der Haut und konnte die Relevanz des M3-Rezeptors in diesen Gefäßen bestätigen und eine Beteiligung des M1- und M5-Rezeptors ausschließen. Die untersuchten Arterien hatten Durchmesser zwischen 60-250µm [49].

Die genannten Studien zeigen eindrucksvoll, welche Relevanz dem M3-Rezeptor in der peripheren Zirkulation zukommt. Allerdings erfolgte in allen genannten Untersuchungen

die Ausschaltung der zu beobachtenden muscarinergen Rezeptoren über globale Knockouttechniken. Somit fehlen die Rezeptoren nicht nur im Endothel, sondern auch in allen anderen Geweben wie beispielsweise der glatten Gefäßmuskulatur. Die Ergebnisse können daher nicht ohne Weiteres der endothelialen Funktion zugeschrieben werden. Außerdem wurden die Daten fast ausschließlich an isolierten und größeren Arterien gewonnen. In vitro Beobachtungen können jedoch vom Verhalten in vivo deutlich abweichen. Untersuchungen an Tieren mit endothelspezifischer Defizienz des M3-Rezeptors und insbesondere der Mikrozirkulation fehlen bislang komplett.

1.3.4 Andere dilatierende Substanzen

Neben Acetylcholin sind eine Vielzahl weiterer Substanzen bekannt, welche durch lokale Wirkung am Endothel oder der glatten Muskulatur auf den Gefäßdurchmesser Einfluss nehmen. Zur Einordnung der Acetylcholin induzierten Vasodilatation werden in dieser Arbeit die Effekte von Acetylcholin mit ausgewählten anderen Vasodilatatoren verglichen:

Adenosintriphosphat (ATP) ist ein Agonist an purinergen P2Y-Rezeptoren, welche ähnlich den muscarinergen Acetlcholinrezeptoren metabotrop sind und an G-Proteine koppeln. Endothelzellen exprimieren mehrere Untergruppen der P2Y-Rezeptoren [54], jedoch ist für die ATP-abhängige Vasodilatation vorrangig der $P2Y_2$-Rezeptor relevant [51]. Vergleichbar zu Acetylcholin erfolgt die Transduktion des Signals vom Endothel auf die glatte Muskulatur durch NO, Prostaglandine und EDHF [125]. Neben den Endothelzellen exprimieren auch vaskuläre glatte Muskelzelle ATP-Rezeptoren, jedoch vorranging den ionotropen P2X-Subtyp. Über diesen führt ATP zu einer Konstriktion des Gefäßes [6, 117].

Bradykinin ist ein Gewebshormon, welches durch das Kallikrein-Kinin-System synthetisiert wird und im Körper vielfältige Funktionen erfüllt. Über den endothelial exprimierten Bradykininrezeptor B_2 führt es zu einer starken, endothelabhängigen Vasodilatation [91, 98]. Allerdings nimmt die Expression des endothelialen B_2

Bradykininrezeptors in kleineren Gefäßen und insbesondere in Arteriolen ab, während die Expression in der glatten Gefäßmuskulatur gegenläufig zunimmt [39]. Der B_2-Rezeptor koppelt wie auch die bereits beschriebenen muscarinergen Acetylcholinrezeptoren und P2Y-Rezeptoren an $G_{q/11}$-Proteine, wodurch es im Endothel zur Synthese von NO, Prostaglandinen und EDHF kommt [79]. Weniger potent fällt hingegen die Bradykinin induzierte Vasokonstriktion aus, welche durch Wirkung an B_1-Rezeptoren direkt auf den Zellen glatter Gefäßmuskulatur entsteht [113].

Adenosin wirkt durch die Aktivierung von Adenosinrezeptoren auf verschiedene Parameter des Herz-Kreislaufsystems. Die Vasodilatation wird dabei insbesondere durch den Rezeptorsubtyp A_{2A} mediiert [105], wobei Adenosin sowohl arterielle als auch venöse Gefäße dilatieren kann [109]. Arterielle Gefäße werden auch dann noch durch Adenosin dilatiert, wenn zuvor die Endothelzellschicht zerstört wurde [42]. Verantwortlich hierfür sind A_{2A}-Rezeptoren der glatten Muskelzellen, welche über intrazelluläre Produktion von cyclischem Adenosinmonophosphat cAMP und Protein Kinase A (PKA) schließlich zu einer Aktivierung von K_{ATP}-Kanälen und damit zu einer Hyperpolarisation der glatten Muskulatur führen [70].

Natrium-Nitroprussid (SNP) führt als NO-Donor zu einer starken Vasodilatation. NO wirkt direkt an der glatten Muskulatur indem es an die sGC bindet und durch Bildung von cyclischem Guaninmonophosphat (cGMP) zu einer Reduktion des intrazellulären Calciums führt [71]. Im Vergleich zu endogen gebildetem NO ist die Wirkung von SNP unabhängig von der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase eNOS und SNP wird daher auch als endothelunabhängiger Dilatator bezeichnet.

SKA 31 (Kurzform von Naphtho[1,2-*d*]thiazol-2-ylamine) aktiviert Calcium-abhängige Kaliumkanäle des Small-conductance ($K_{Ca}2.3$) und Intermediate-conductance ($K_{Ca}3.1$) Typs im Endothel [68, 101]. Hierdurch wird eine Hyperpolarisation der Endothelzellen induziert, welche durch einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle der Gruppe $K_{IR}2$ noch

verstärkt wird [61]. Über den noch unklaren Mechanismus des EDHF kommt es in der Folge zu einer Vasodilatation [26].

1.3.5 Das $G\alpha_{q/11}$-Protein

Die Guanosintriphosphat-bindenden Proteine (G-Proteine) kommen in allen eukaryonten Organismen vor. Sie verbinden die Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) der Zelloberfläche mit nachgeschalteten Effektorproteinen im Zellplasma und sind dadurch an einer Vielzahl von Signalwegen des Organismus beteiligt [56]. Neben der Aktivierung der intrazellulären Transduktion kommt es durch G-Proteine auch zu einer Multiplikation des Signals, da ein aktiver GPCR mehrere G-Proteine nacheinander aktivieren kann. Der Vielfalt der GPCR mit über 1300 Genen in der Maus [41], stehen nur 16 Gene für Gα-GTPasen zur möglichen Kopplung gegenüber [29]. Diese lassen sich in vier funktionelle Gruppen zusammenfassen, welche ihrerseits intrazellulär unterschiedliche Singalwege aktivieren. An die einzelnen GPCRs können meist nur Vertreter einer Gα-Proteingruppe ankoppeln, sodass sich eine Rezeptorspezifität entweder für die Gruppe der $G\alpha_s$-, $G\alpha_{i/0}$-, $G\alpha_{q/11}$- oder $G\alpha_{12/13}$-Proteine ergibt. Vervollständigt werden die heterotrimeren G-Proteine durch den nicht dissoziierbaren Komplex der beiden kleineren Untereinheiten Gβ und Gγ, der für die Signaltransduktion ebenfalls von Relevanz ist [23]. Inaktive G-Proteine liegen als Heterotrimere vor und haben an der Gα-Untereinheit GDP gebunden. Die Bindung des Liganden und damit die Aktivierung des GPCR führt zum Austausch des GDP durch GTP unter Hilfe von Austauschfaktoren, den sogenannten Guanosine triphosphate Exchange Factor (GEF). Sobald GTP gebunden ist, kommt es zur Dissoziation in die aktiven Untereinheiten Gα und Gβ/Gγ [89].

Die Gα-Untereinheiten $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ kommen ubiquitär in Mauszellen vor [126] und werden gleichwertig durch entsprechende G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert [88]. Nach der Dissoziation vom Rezeptor aktivieren die $G\alpha_{q/11}$-Untereinheiten

zellmembranassoziiert [57] die β-Isoformen der Phospholipase C, wodurch es zur Produktion der intrazellulären Messenger Diacylglycerol (DAG) und Inositol 1-4-5-Trisphosphat (IP_3) kommt [96]. Die Beendigung des Signals erfolgt durch Hydrolyse des an der Gα-Untereinheit gebundenen GTPs zu GDP unter Einwirkung von GTPasen, wodurch es zur Reassoziation der drei Untereinheiten zum inaktiven Heterotrimer kommt [106]. Die aktivierte PLC-β beschleunigt die GTPase-Aktivität von Gα und übt so ein hemmendes Feedbacksignal aus [9].

Wie oben beschrieben koppeln die für die endotheliale Vasodilatation relevanten muscarinergen Acetylcholinrezeptoren M1, M3 und M5 an die $G\alpha_{q/11}$-Proteine. GPCR des M2 und M4-Subtyps koppeln hingegen an $G\alpha_{i/0}$ Untereinheiten, wodurch es zu einer Hemmung der Aktivität der Adenylatcyclase kommt [124].

1.4 Ziele der Arbeit

Endothelzellen sind für die physiologische Funktion des Herzkreislaufsystems unentbehrlich, und das Verständnis der endothelialen Prozesse ist notwendig um Pathologien des Herzkreislaufsystems beschreiben und verstehen zu können. Ein zentraler Aspekt ist dabei die endotheliale Regulation des arteriellen Gefäßdurchmessers, welcher direkt Einfluss auf den systemischen Blutdruck und die Organdurchblutung nimmt. Die endotheliale Funktionalität wird seit ihrer Entdeckung durch Furchgott zumeist anhand der vasodilatatorischen Wirkung von Acetylcholin charakterisiert. Acetylcholin wirkt an den Endothelzellen über muscarinerge Rezeptoren, deren fünf bekannte Subtypen abhängig von der Lokalisation der Endothelzellen in unterschiedlichem Maße exprimiert werden. Bedingt durch die intrazelluläre G-Protein-Kopplung der muscarinergen Rezeptoren führen nur die M1, M3 und M5 Subtypen zur endothel-abhängigen Vasodilatation. Durch das Fehlen von subtyp-spezifischen Rezeptorantagonisten konnte jedoch eine weitere Differenzierung der funktionellen

Relevanz lange Zeit nicht erfolgen. Erst nach Etablierung der genetischen Deletion einzelner Rezeptorsubtypen war es möglich, Aussagen zur funktionellen Bedeutung zu treffen. In den bisher vorliegenden Studien zeigte sich dabei in vielen Gefäßen eine funktionelle Dominanz des M3-Rezeptors. Abhängig von Lokalisation und Durchmesser des Gefäßes spielen aber auch die anderen Subtypen eine wichtige Rolle. Die bisherigen Untersuchungen erfolgten meist in vitro in großen Arterien, in vivo Daten sind weiterhin selten, Untersuchungen der Arteriolen und der Mikrozirkulation fehlen fast komplett. Bisherige Untersuchungen wurden zudem meist an Tieren mit globaler Deletion der muscarinergen Rezeptoren durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit ist es, durch genetische Deletion des M3-Rezeptors und seines gekoppelten G$\alpha_{q/11}$-Proteins, seine physiologische Relevanz in der Mikrozirkulation zu untersuchen. Dafür bietet die Beobachtung des Gefäßdurchmessers von Arteriolen in der Intravitalmikroskopie eine hervorragende Möglichkeit, da nach Zugabe von vasoaktiven Substanzen Änderungen des Durchmessers direkt quantifiziert werden können. Durch Nutzung eines induzierbaren, endothelspezifischen Knockoutmodells können Effekte einer chronischen Gegenregulation vermieden werden. Zusätzlich wird die Beeinflussung der systemischen Herzkreislaufparameter durch invasive Messung von Blutdruck und Herzfrequenz untersucht.

Zusammengefasst ergeben sich folgende Fragestellungen:

- Wird in der Mikrozirkulation die endotheliale Wirkung von Acetylcholin über den M3-Rezeptor mediiert?
- Sind weitere muscarinerge Rezeptoren beteiligt?
- Ist die Signaltransduktion abhängig von G$\alpha_{q/11}$-Proteinen?
- Führt der Verlust des M3-Rezeptors zu einer Änderung globaler Herzkreislaufparameter?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

2.1.1 M3-Rezeptor-defiziente Mäuse

Die Zucht und Haltung der Versuchstiere für die Untersuchung des M3-Acetylcholinrezeptors erfolgte in der Forschungstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durch ausgebildete Tierpfleger. In den Zuchträumen herrschten konstante Umgebungsbedingungen, mit einem klimatisierten Temperaturbereich von 20-24°C und relativer Luftfeuchte von 40-70%. Die tägliche Beleuchtungsdauer betrug 12 Stunden und erfolgte kontinuierlich zwischen 5 und 17 Uhr (Winterzeit). Die Mäuse wurden in isoliert ventilierten Käfigen (IVC) vom Typ II/L zu maximal fünf Tieren pro Käfig gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Trinkwasser.

Die Versuchstiere entstammen dem genetischen Inzuchtstamm C57BL/6 (”Black six”). Zum gezielten Entfernen des M3-Rezeptorgens aus der Desoxyribonukleinsäure (DNA) der Endothelzellen, wurde das Cre/loxP-System verwendet. Grundlage der Deletion ist hierbei die Flankierung des M3-Rezeptorgens durch loxP-DNA-Sequenzen (”floxed”). An den loxP-Markierungen kann das Tyrosin-Rekombinase Enzym Cre-Rekombinase die DNA schneiden, wodurch das flankierte Gen aus dem Genom herausgeschnitten und abgebaut wird.

Das Einbringen der Cre-Rekombinase erfolgte nach der Methode von Feil et al. [34] durch Kreuzung von homozygoten M3-floxed-Tieren mit Tieren, die sowohl für die

Cre-Rekombinase als auch für das (intakte) M3-Rezeptorgen hemizygot waren, die Erbinformation also jeweils nur auf einem Allel vorlag. In der Tochtergeneration erhielt somit etwa ein Viertel der Tiere sowohl das gefloxte M3-Rezeptorgen als auch das Gen für die Cre-Rekombinase. Die Tiere ohne Cre-Rekombinase dienten teilweise als Kontrollgruppe. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Linien mit unterschiedlichen Cre-Rekombinasen generiert und untersucht. Gemeinsam ist beiden Zuchtlinien, dass die Cre-Rekombinase durch einen vorgeschalteten Promoter (VE-Cadherin oder Tie2) nur in Endothelzellen aktiv ist.

In der ersten Gruppe war die Cre-Rekombinase mit einem modifizierten Estrogenrezeptor fusioniert ($CreER^{T2}$), eine Aktivität der Rekombinase war dadurch erst nach Bindung des Estrogenderivats Tamoxifen möglich. Mauseigenes Estrogen ist nicht in der Lage die Rekombinase zu aktivieren. Die Induktion der $CreER^{T2}$erfolgte durch Injektion von Tamoxifen in einer Trägerlösung an fünf aufeinanderfolgenden Tagen nach dem Protokoll der Arbeitsgruppe um Feil. Als Kontrollgruppe wurden Tiere desselben Genotyps benutzt, jedoch erfolgte die Behandlung nur mit der Trägerlösung. Das $CreER^{T2}$-Gen stand unter der Kontrolle des endothelspezifischen Promoter VE-cadherin, um eine endothelspezifische Ausschaltung zu erreichen.

In der zweiten Gruppe stand die Cre-Rekombinase ebenfalls unter der Kontrolle eines endothelspezifischen Promoters, in diesem Fall Tie2. Die Rekombinase selbst war nicht mit weiteren Rezeptoren fusioniert, so dass die Aktivität während der gesamten Lebensdauer der Zelle gegeben war und eine Induktion nicht nötig war (Tie2-Cre). Die Kontrollgruppe bestand aus Tieren mit gefloxtem M3-Rezeptorgen ohne Cre-Rekombinase.

2.1.2 $G_{q/11}$-Defiziente Mäuse

Die Deletion des $G_{q/11}$-Proteins erfolgte ebenfalls durch ein Cre/loxP System. Die genutzte Cre-Rekombinase war in diesen Tieren wiederum kontrolliert durch den

endothelspezifischen Promoter VE-cadherin (Professor Stefan Offermanns, Max-Planck-Institute for Heart and Lung Research, Bad Nauheim). Das Gen der Cre-Rekombinase war dabei jedoch nicht mit einem Östrogenrezeptor fusioniert und somit dauerhaft aktiv, eine Induktion war nicht nötig. Die Kontrollgruppe bestand aus Tieren mit gefloxtem $G_{q/11}$-Gen ohne Cre-Rekombinase. Die Aufzucht der Tiere erfolgte unter vergleichbaren Standardbedingungen, wie im vorangehenden Abschnitt beschrieben, in Bad Nauheim.

2.2 Substanzen und Lösungen

Eine Aufzählung der verwendeten Substanzen und Lösungen findet sich im Anhang.

2.3 Radiotelemetrische Messung der Herzkreislaufparameter

Die Messung des systemischen Blutdrucks und der Herzfrequenz erfolgte invasiv in der Aorta ascendens nach Implantation einer Katheterdrucksonde über die A. carotis communis, welche mit einem subkutan implantiertem, batteriebetriebenem Radiotransmitter verbunden war (PA-C20, Data Sciences International). Für die Implantation wurde das Versuchstier mit Isofluran narkotisiert und in Rückenlage auf einer Wärmematte gelagert. Die Inzision erfolgte am Hals in der ventralen Medianlinie über 3cm. Subkutanes Bindegewebe und die Speicheldrüsen wurden stumpf nach lateral verdrängt und die A. carotis communis neben der Trachea dargestellt. Mittels eines Haltefadens wurde das Gefäß peripher in Höhe der Karotisgabel ligiert, während nach proximal der Bluteinstrom durch Anschlingen mit einem zweiten Faden und vorsichtigem Zug unterbunden wurde. Die Inzision erfolgte durch eine 25G Kanüle, deren Anschliff nach außen gebogen worden war. Mittels einer speziellen, ausgehöhlten Greifpinzette konnte der Messkatheter unterhalb der Kanüle ins Gefäß vorgeschoben werden. Die korrekte Positionierung erfolgte durch Abstandsmarkierungen auf dem Katheter und wurde durch Abhören des Radiosignals mit dem charakteristischen, pulssynchronen

Geräusch bestätigt. Die Fixierung des Katheters erfolgte über die beiden vorgelegten Fäden. Anschließend wurde mit der Schere stumpf eine subkutane Tasche am seitlichen Rumpf zur Aufnahme des Radiotransmitters präpariert und dieser eingebracht. Die Hautnaht erfolgte mit 6-0 Prolene in Einzelkopftechnik. Nach Implantation konnte sich das Tier für mindestens 48 Stunden erholen, die Haltung erfolgte fortan in einem Einzelkäfig (TypII), die Umgebungsbedingungen blieben unverändert. Es erfolgten zwei kontinuierliche Messzyklen der Herzkreislaufparameter über jeweils 24 Stunden mit dazwischenliegender 24 stündiger Messpause. Die radiotelemetrischen Signale des Transmitters wurden über eine unter dem Käfig befindliche Messplatte mit Empfänger aufgefangen und mittles Personal Computer und entsprechender Software (Data Sciences International) aufgezeichnet. Das Tier konnte sich während der Messung frei im Käfig bewegen und hatte freien Zugang zu Futter und Trinkwasser. Die Explantation des Transmitters nach Ende der Messung erfolgte im Rahmen der sich anschließenden Intravitalmikroskopie.

2.4 Intravitalmikroskopie

2.4.1 Präparation

Zunächst wurde die zu untersuchende Maus mit einer Laborwaage (MXX-212, Denver Instrument, USA) gewogen und die Markierung zur Identifikation des Tiers kontrolliert. Zur Narkose und Analgesie wurde eine Kombination der Substanzen Midazolam (0,38mg/mL), Fentanyl (0.38µg/mL) und Dexmedetomidin (0.19mg/mL) verwendet. Diese Mischung wurde initial intraperitoneal verabreicht (400µL Bolus). Nach Erreichen des Toleranzstadiums wurde der ventrale Hals und die rechte Leiste mit einem Tierhaarschneider (Isis GT420, Aesculap, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) rasiert. Um ein Auskühlen der Maus während der Präparation und des Versuchs zu vermeiden,

wurde das Tier auf einer Wärmematte gelagert und die Temperatur überwacht (K201 Voltcraft, Conrad Electronic SE, Hirschau).

In Rückenlagerung wurde der Hals ventral in der Medianlinie über einen etwa 5mm langen Hautschnitt eröffnet, um jeweils einen Katheter in der Trachea und der V. jugularis zu platzieren. Subkutanes Bindegewebe und die Speicheldrüsen wurden stumpf nach lateral verdrängt und die Trachea dargestellt. Nach Umschlingen mit zwei Baumwollfäden wurde die Trachea im oberen Drittel mit einem Skalpell inzidiert. In die entstandene Öffnung wurde ein 15mm langer Polyethylenschlauch (Außendurchmesser 1,27mm, Portex, Smiths medical, St. Paul, USA) eingeführt, 5-8mm Richtung Lunge vorgeschoben und mittels der vorgelegten Fäden gesichert. Danach wurde die rechtsseitige Vena jugularis durch Verdrängung der rechten Speicheldrüse nach medial dargestellt. Die Vene wurde unter mikroskopischer Sicht (Operationsmikroskop M650, Wild Heerbrugg, Schweiz) vom umliegenden Gewebe gelöst und über einen Abschnitt von 10mm freigelegt. Der freie Venenabschnitt wurde am kranialen und kaudalen Ende mit Baumwollfäden angeschlungen und mit diesen aufgespannt, so dass der Abfluss des Bluts unterbrochen wurde. Eine dritte Schlinge wurde medial vorgelegt und die Vene anschließend kranial der medialen Schlinge mit einer Mikrogefäßschere eröffnet. Die ventrale Venenwand wurde mit einer um 90° abgewinkelten Kanüle angehoben und in die entstandene Öffnung ein mit Natrium-Chlorid-Lösung (0,9%) befüllter Polyethylenschlauch (Außendurchmesser 0,61mm, Portex, Smiths medical) Richtung Herz vorgeschoben. Nach Fixierung des Katheters durch die mediale Schlinge wurde die kaudale Schlinge entspannt und der Katheter circa 5mm weiter vorgeschoben. Durch Aspiration von Blut und anschließender Injektion von ca. 50µL Natrium-Chlorid-Lösung (0,9%) wurde die Lage des Katheter geprüft und anschließend durch Verknoten der vorgelegten Baumwollfäden gesichert. Die Wundränder des Hautschnitts wurden zur Schonung und Stabilisierung der einliegenden Katheter mit zwei Einzelkopfnähten (Serapren 6/0 DR-9, Serag Wiessner GmbH & Co. KG, Naila) locker adaptiert.

Zur Präparation des Musculus cremaster wurde die Maus mit der Wärmematte rücklings auf einen Mikroskoptisch aus Plexiglas gelagert, in dem am unteren Ende ein Glasfenster eingebracht war, über dem der zu untersuchende Muskel für die Mikroskopie aufgespannt werden konnte (Herstellung in der wissenschaftlichen Feinmechanikwerkstatt, Universität zu Lübeck). Der Trachealkatheter wurde mit einem Kleintierbeatmungsgerät (MiniVent 845, Hugo Sachs Elektronik, March) verbunden und die Maus mit einem Beatmungsvolumen von 230µL und einer Frequenz von 170/min beatmet. Der Venenkatheter wurde mit einer Spritzenpumpe (78-9100W, World Precision Instruments, Sarasota, USA) verbunden und das Gemisch der Substanzen zur Narkose und Analgesie über diesen Zugang verabreicht (Flussrate 90µL/h).

Die Präparation des M. cremaster erfolgte nach der Methode von Baez [3]. Der Präparationsbereich wurde mit 37°C warmer Salzlösung superfundiert. Der rechte Hoden wurde in der Leiste palpiert und zunächst nach ventral geschoben. Die Leistenhaut wurde mit einer stumpfen Pinzette angehoben und rechts lateral des Schwanzansatzes eingeschnitten. Der Schnitt wurde nach lateral in Richtung des rechten Hinterlaufs um etwa 10mm erweitert. Durch Druck auf die Bauchdecke wurde der Hoden wieder ins Skrotum zurückverlagert und so der Muskel in seiner ganzen Größe dargestellt. Am kaudalen Pol des M. cremaster wurde eine Knopfnaht mit einem atraumatischen, monofilen Polypropylen-Faden (Serapren 6/0 DR-9, Serag Wiessner) gesetzt und der Muskel dann mit leichtem Zug vertikal aufgespannt. Das Bindegewebe wurde vorsichtig mit einer Schere entfernt. Dann wurde der mobilisierte Skrotalsack über der Untersuchungsglasplatte ausgelagert und mittels des Fadens der initialen Knopfnaht im Silikonring des Mikroskoptischs fixiert. Ventralseitig wurde der M. cremaster mit der Schere in kaudal-kranialer Richtung eröffnet. Der Hoden wurde vom Muskel getrennt, indem das ihn haltende Band scharf durchtrennt wurde, und zurück in die Bauchhöhle verlagert. Die Schnittränder des M cremaster wurden an beiden Seiten mit je zwei

Einzelknopfnähten gegriffen und die Fäden seitlich im Silikonring fixiert, um das Cremasterpräparat flächig auf der Untersuchungsplatte auszubreiten.

2.4.2 Apparativer Aufbau

Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen des M. cremaster wurden an einem binokularen Lichtmikroskop (Eclipse E600; Objektiv Plan Fluor ELWD 20x/0,45; Nikon, Tokio, Japan) durchgeführt. Der Plexiglasmikroskoptisch wurde über vier in seinem Boden befindliche, metallene Zapfen verschiebesicher auf dem Objekttisch gelagert. Der Objekttisch (MultiControl2000, ITK Dr. Kassen GmbH, Lahnau) konnte elektronisch per Joystick in der horizontalen Ebene bewegt werden. Die auf 37°C erwärmte Salzlösung wurde über eine Schlauchverbindung zugeleitet, welche im Mündungsbereich mit einer Fassung auf dem Mikroskoptisch fixiert wurde, sodass das Superfusat einen konstanten Flüssigkeitsfilm auf dem Präparat bildete. Über eine Rollerpumpe (Minipuls 3, Gilson Inc., Middleton, USA) konnten dem Superfusat Substanzen beigemischt werden, und eine gleichmäßige Verteilung auf dem M. cremaster erreicht werden. Der Gesamtfluss des Superfusats betrug 8mL/min, sodass kontinuierlich ein schneller Austausch der Flüssigkeit stattfand. Der Abfluss erfolgte zu drei Seiten des Präparats zwischen Untersuchungsplatte und Silikonring.

2.4.3 Datenaufzeichnung

Zur späteren Auswertung der Versuchsergebnisse wurden die mikroskopischen Bilder des Präparats in Echtzeit auf VHS-Kassette aufgenommen. Hierzu befand sich eine Videokamera (CCD Kamera, PCO AG, Kelheim) im Strahlengang des Mikroskops. In das resultierende Bild wurde mit einem Titelgenerator (FX Titler WJ-AVE1, Panasonic, Osaka, Japan) das Versuchsdatum, Versuchsnummer und eine kontinuierlich fortlaufende Stoppuhr gelegt. Die Aufzeichnung erfolgte mit einem Videorekorder (NV-FS2000, Panasonic), außerdem wurde das generierte Bild zusätzlich auf einem

Bildschirm (WV 5410, Panasonic) wiedergegeben. Die Auswertung erfolgte unabhängig vom Versuch zu einem späteren Zeitpunkt an einem Personal Computer mit dem Betriebssystem Windows XP (Microsoft Corp., Redmond, USA) und einer im Institut programmierten Digitalisierung- und Mess-Software. Hierzu wurden die Videobilder zunächst mit einer Videokarte (IMAQ PCI 1407, National Instruments, Austin, USA) digitalisiert und auf einer Festplatte gespeichert. Die Software zur Messung der Gefäßdurchmesser war mit der graphischen Programmierumgebung LabVIEW 2012 (National Instruments) geschrieben. Die Software projizierte zwei parallele, verschiebbare Linien auf das stehende Videobild, welche an die Innenwände der im Versuch ausgewählten Abschnitte der Arteriolen angelegt wurden. Der Abstand der Parallelen entspricht dem Gefäßdurchmesser und wurde in einer Textdatei als Dezimalzahl in Mikrometer ausgegeben. Zur Kalibrierung und Kontrolle wurden Videoaufnahmen eines Objektmikrometers im selben Verfahren vermessen.

2.4.4 Versuchsdurchführung

Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen der Arteriolen im Skelettmuskel erfolgten an der maschinell beatmeten und mittels Infusion narkotisierten und analgesierten Maus. Mit der Untersuchung wurde 30 Minuten nach der Präparation begonnen, um eine Erholung des Präparats zu gewährleisten. Zunächst wurden im Präparat acht bis zwölf geeignete Arteriolen ausgewählt. Dabei wurde darauf geachtet, Arteriolen mit unterschiedlichen Innendurchmessern zwischen 15 und 40µm, ausreichendem Ruhetonus und guter Sichtbarkeit zu wählen. Dem Superfusat wurden die zu untersuchenden vasoaktiven Substanzen in aufsteigender Konzentration zugefügt und die vorher definierten Arteriolen in fester Reihenfolge im mikroskopischen Bild dargestellt und fokussiert. Für jede Substanz und Konzentration wurden die Arteriolen zuerst im unstimulierten Ruhezustand aufgezeichnet. Anschließend wurde die Substanz per Rollerpumpe der Superfusion zugefügt und eine Minute gewartet. Dann wurden

Bilder der Arteriolen in Anwesenheit der Substanz aufgezeichnet, dabei wurden alle Arteriolen zweimal nacheinander in einem Zeitraum von etwa zwei bis drei Minuten dargestellt. Danach wurde die Substanz entfernt und vor Gabe der nächsten Konzentration oder Substanz mindestens fünf Minuten gewartet, um die Rückkehr des arteriolären Durchmessers auf seinen Ruhezustand zu ermöglichen. Es wurden also nicht-kumulative Konzentrationswirkungskurven erstellt. Am Ende des Versuchs wurde dem Superfusat eine Kombination der Vasodilatatoren Acetylcholin, Adenosin und Natrium-Nitroprussid (Konzentration auf dem Präparat 3x10-5mol/L) zugefügt, um den maximal möglichen Durchmesser der Arteriolen zu erreichen und zu bestimmen. Nach Abschluss des Protokolls wurde das Tier durch intravenöse Injektion von 16mg Pentobarbital (Narcoren, Merial GmbH, Hallbergmoos) getötet.

2.5 Verarbeitung von Messwerten und statistische Auswertung

Die Verarbeitung der Messwerte erfolgte mit dem skriptfähigen Statistikprogramm Stata 11 (StataCorp LP, College Station, USA). Die Änderung des Gefäßdurchmessers einer Arteriole wurde als Dilatationskapazität (D_{kap} in Prozent) bei zugefügter Substanz errechnet. Dieser Wert der Dilatation ist normalisiert auf die maximal mögliche Gefäßdurchmesseränderung, die sich aus der Differenz des gemessenen Maximaldurchmessers (D_{max}) und dem Ausgangsdurchmesser ergibt. Ausgangspunkt ist der jeweils direkt vor Substanzgabe festgestellte Durchmesser des Gefäßes (D_{Ruhe}). Von den beiden während der Substanzgabe gemessenen Werte wurde der jeweils größere verwendet (D_{Subs}). Dilatierte das Gefäß nach Substanzgabe wurde die Dilatationskapazität also mit folgender Formel berechnet:

$$D_{kap} = \frac{D_{Subs} - D_{Ruhe}}{D_{max} - D_{Ruhe}} \cdot 100 \tag{2.1}$$

Es wurde davon ausgegangen, dass der minimale Gefäßdurchmesser 0µm beträgt. Bei einer Konstriktion des Gefäßes vereinfachte sich daher die Formel zur Berechnung der normalisierten maximalen Änderungskapazität:

$$D_{kap} = \frac{D_{Subs}}{D_{Ruhe}} \cdot 100 - 100 \tag{2.2}$$

Bei Dilatation des Gefäßes nimmt D_{kap} einen positiven, bei Konstriktion einen negativen Wert an. Aus den berechneten Werten der Dilatationskapazität einzelner Gefäße wurde mit Hilfe des Statistikprogramms das arithmetische Mittel für alle Tiere eines Genotyps gebildet und für jede Substanz und Konzentration spezifisch ausgegeben. Für den Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde ein unverbundener t-Test verwendet. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0{,}05$ wird das Ergebnis als signifikant angesehen. Die Mittelwerte der Dilatationskapazität wurden mit dem Standardfehler mit der Software SigmaPlot 11 (Systat Software Inc., San Jose, USA) graphisch dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Makrohämodynamik

3.1.1 Blutdruck und Herzfrequenz in endothelspezifischen M3-Rezeptor defizienten Mäusen

Der arterielle Blutdruck und die Herzfrequenz von endothelspezifischen M3-Rezeptor defizienten männlichen Mäusen wurde invasiv durch Implantation eines Druckabnehmers in die A. carotis communis zweimal über 24 Stunden bestimmt. Die Deletion des M3-Rezeptors gelang in $M3^{fl/fl}$:$CreER^{T}$-Mäusen durch vorhergehende fünfmalige Injektionen mit Tamoxifen. Nach Implantation des Transmitters erfolgte am dritten und fünften Tag jeweils eine Messung über 24 Stunden. Im fensterlosen Untersuchungsraum wurde durch die Lichtanlage ein gleichmäßiger Tag-Nacht-Rhythmus vorgegeben.

Die Untersuchung wurde an sechs mit Tamoxifen ($CreER^{Tam}$) und an sieben mit dem Vehikel ($CreER^{Veh}$) behandelten Tieren durchgeführt. Der über beide Versuchstage gemittelte Blutdruck unterschied sich nicht signifikant, ebenso war die durchschnittliche Herzfrequenz nicht signifikant verändert (siehe Tabelle 3.1). Da der Blutdruck und die Herzfrequenz von der Aktivität der Tiere abhängig sind und tagsüber während der Ruhephase generell niedrigere Werte physiologisch sind, wurden die Messwerte zusätzlich nach Tag und Nacht gruppiert. In beiden Gruppen wurden während der aktiven Nachtphase höhere Vitalparameter gemessen als im Vergleich zur ruhigen

Tagphase. Zwischen den beiden Genotypen bestand allerdings weiterhin kein statistisch signifikanter Unterschied. Somit scheint die tamoxifeninduzierte, endothelspezifische Deletion des M3-Rezeptors nicht mit einer Änderung des arteriellen Blutdrucks oder der Herzfrequenz einherzugehen, auch unabhängig von der Aktivität der Tiere.

Parameter		$CreER^{Veh}$ n=7	$CreER^{Tam}$ n=6	p
Durchschnitt über 48 Stunden				
Systolischer Blutdruck	[mmHg]	116 ± 2,1	110 ± 3,4	n.s.
Mitteldruck	[mmHg]	102 ± 2,2	97 ± 4,1	n.s.
Diastolischer Blutdruck	[mmHg]	92 ± 2,9	86 ± 2,8	n.s.
Herzfrequenz	[min^{-1}]	481 ± 16,4	467 ± 11,2	n.s.
Systolischer Blutdruck	[mmHg]			
Tag		112,4 ± 2,7	106 ± 3,6	n.s.
Nacht		121 ± 2,5	115 ± 3,2	n.s.
Mitteldruck	[mmHg]			
Tag		99 ± 3,0	94 ± 4,2	n.s.
Nacht		107 ± 1,4	101 ± 4,1	n.s.
Diastolischer Blutdruck	[mmHg]			
Tag		89 ± 3,7	84 ± 5,0	n.s.
Nacht		95 ± 1,7	90 ± 5,1	n.s.
Herzfrequenz	[min^{-1}]			
Tag		450 ± 20,0	444 ± 12,3	n.s.
Nacht		517 ± 13,0	494 ± 10,4	n.s.

Tabelle 3.1: Blutdruck und Herzfrequenz in $M3^{fl/fl}$:$CreER^{Tam}$-Mäusen nach Induktion mit Tamoxifen- ($CreER^{Tam}$, sechs Tiere) oder Vehikelbehandlung ($CreER^{Veh}$, sieben Tiere). Erfassung der Daten durch einen implantierten arteriellen Druckwandler über zweimal 24 Stunden. Tag ist die Zeit von 6 Uhr bis 18 Uhr, der fensterlose Untersuchungsraum war beleuchtet. Nacht ist die Zeit von 18 Uhr bis 6 Uhr des Folgetags, der Untersuchungsraum war unbeleuchtet. Darstellung von Mittelwerten ± Standardfehler, n.s. = nicht signifikant.

3.2 Mikrozirkulation

3.2.1 Defizienz des $G_{q/11}$-Proteins

Die arterioläre Reaktion auf vasoaktive Substanzen in Mäusen mit endothelialer $G_{q/11}$ Defizienz ($G_{q/11}^{-/-}$) wurde durch Beobachtung der Mikrozirkulation des M. cremasters in vivo untersucht und mit Wildtypmäusen verglichen. Dafür wurden 55 Gefäße in fünf $G_{q/11}^{-/-}$ Tieren und 58 Gefäße in fünf Wildtyptieren beobachtet. Acetylcholin, ATP, SNP und Adenosin wurden nicht kumulativ in aufsteigender Konzentration (0,3, 1 und 10µmol/L) dem Superfusat zugegeben, indem die Substanzen nach der Untersuchung ausgewaschen wurden. Der Ruhedurchmesser der Arteriolen wurde vor jeder Substanzgabe jeweils gemessen und betrug im arithmetischen Mittel in Wildtyptieren 13,8 ± 1,1µm und in $G_{q/11}^{-/-}$ Tieren 20,7 ± 1,4µm, womit sich die beiden Gruppen signifikant voneinander unterscheiden ($p < 0{,}001$). Der maximale Gefäßdurchmesser der untersuchten Arteriolen war jedoch in Wildtyptieren mit 26,7 ± 1,1µm und in $G_{q/11}^{-/-}$ Tieren mit 27,5 ± 1,4µm nicht signifikant unterschiedlich und zeigt, dass Gefäße vergleichbarer Größe untersucht wurden. Zur weiteren Einordnung wurde für beide Gruppen der Gefäßtonus in Ruhe als Quotient aus dem Mittelwert der Ruhe- und der maximalen Durchmesser berechnet. Der Gefäßtonus betrug in den Wildtyptieren 52 ± 2,7% und unterschied sich von $G_{q/11}^{-/-}$ Tieren mit 73 ± 2,1% signifikant ($p < 0{,}001$).

Acetylcholin (ACh): Der endothelabhängige Vasodilatator ACh löste in Wildtypmäusen eine mit steigender Konzentration zunehmende Vasodilatation aus, welche in der höchsten Konzentration (10µmol/L) 72 ± 4,5% der maximalen Dilatationskapazität erreichte. Auch in $G_{q/11}$-defizienten Mäusen führte Acetylcholin zu einer Dilatation, jedoch blieb diese signifikant geringer und steigerte sich mit zunehmender Konzentration kaum (siehe Abbildung 3.1 A). In der höchsten Konzentration dilatierte Acetylcholin die Gefäße nur auf 29 ± 4,4% der maximalen Dilatationskapazität.

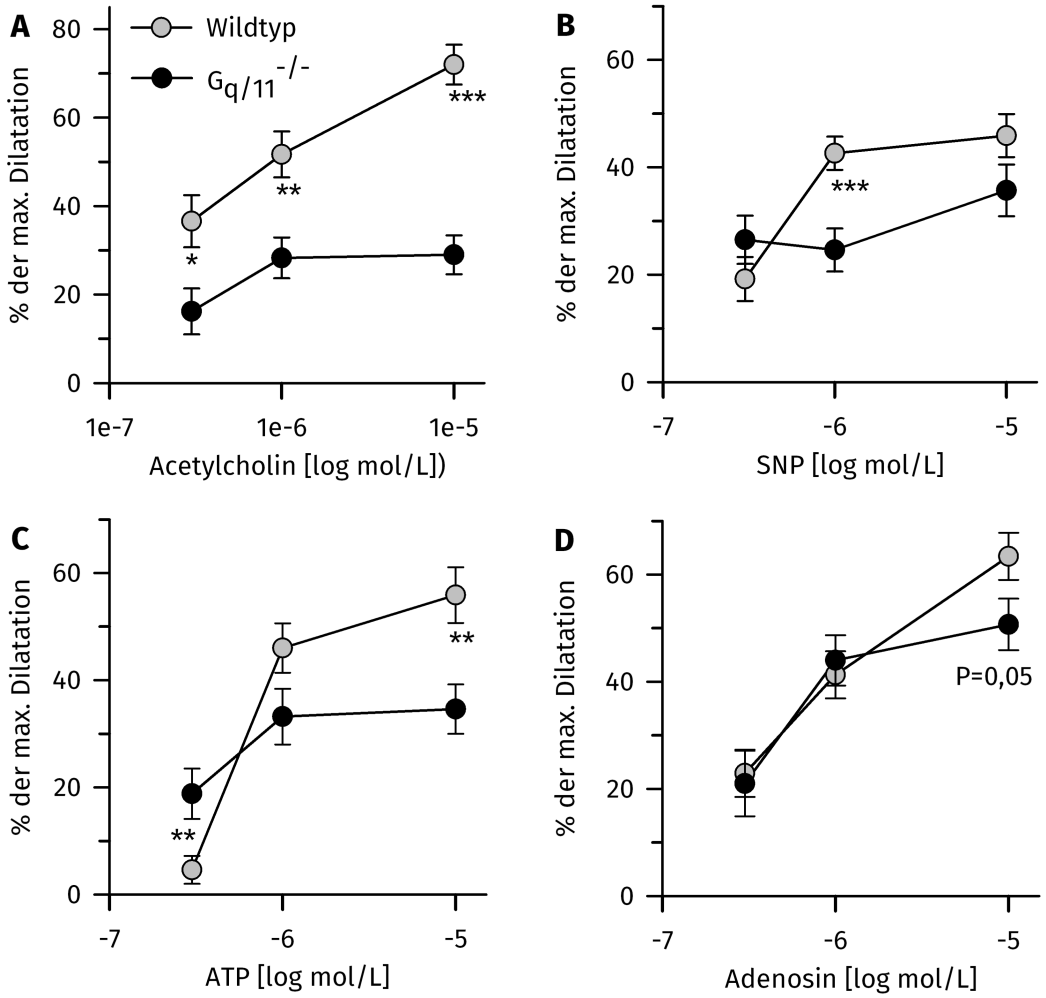

Abbildung 3.1: Dilatationen in Arteriolen in der Mikrozirkulation des M. cremaster von $G_{q/11}^{-/-}$-Mäusen (n=55 Gefäße in fünf Tieren, schwarze Kreise) und Wildtyp Tieren ($G_{q/11}^{+/+}$, n=58 Gefäße in fünf Tieren, graue Kreise). Dargestellt ist die Dilatation (als Prozent der maximal möglichen Gefäßerweiterung) über die Konzentration. **A:** Die Vasodilatation auf Acetylcholin war in $G_{q/11}^{-/-}$-Mäusen signifikant reduziert. **B:** SNP führte zu ähnlichen Dilatationen in beiden Gruppen, allerdings blieben die $G_{q/11}^{-/-}$-Tiere bei 1µmol/L zurück. **C:** $G_{q/11}^{-/-}$-Tiere zeigten eine attenuierte Antwort auf hohe ATP-Konzentrationen. Die niedrige ATP Konzentration 0,3µmol/L führte in Wildtyptieren zu keiner Dilatation, während die Gefäße der $G_{q/11}^{-/-}$-Tiere hingegen signifikant dilatierten. **D:** Adenosin führte in beiden Gruppen zu konzentrationsabhängigen Dilatationen.
Signifikanzen: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

ATP: Wie Acetylcholin vermittelt auch ATP seine Wirkung über endotheliale G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR), die an $G_{q/11}$-Proteine koppeln und führt dadurch zu

einer Vasodilatation. In Wildtypmäusen kam es in Anwesenheit von ATP zu einer konzentrationsabhängig zunehmenden Vasodilatation, die in der höchsten Konzentration 55,9 ± 5,2% der maximal möglichen Dilatation der Gefäße erreichte. Auch in $G_{q/11}^{-/-}$ Tieren führte ATP zu einer konzentrationsabhängigen Dilatation. Diese erreichte jedoch schon bei der mittleren ATP-Konzentration (1µmol/L) ein Plateau und blieb bei der höchsten Konzentration mit 34,6 ± 4,6% der Dilatationskapazität signifikant unterhalb der Dilatation in Wildtypmäusen (siehe Abbildung 3.1 C).

SNP: Der NO-Donor SNP führt durch die Wirkung des freigesetzten Stickstoffmonoxids am glatten Gefäßmuskel zu einer endothelunabhängigen Vasodilatation. SNP führte in beiden untersuchten Gruppen zu einer konzentrationsabhängigen Vasodilatation, welche sich in der niedrigen und hohen Konzentration nicht signifikant zwischen den Gruppen unterschied (siehe Abbildung 3.1 B). In den $G_{q/11}^{-/-}$ Tieren war keine Steigerung der Dilatation von 0,3 auf 1µmol/L zu beobachten (26,5 ± 4,5% vs 24,6 ± 4%), während die Arteriolen in Wildtyptieren deutlich relaxierten. Somit ist die Dilatation in $G_{q/11}^{-/-}$ Tieren unter Wirkung von SNP in der Konzentration 1µmol/L signifikant vermindert. Bei der höchsten Konzentration war aber kein Unterschied zwischen den Genotypen zu beobachten.

Adenosin: Adenosin vermittelt durch die Aktivierung der glatten Gefäßmuskulatur eine endothelunabhängige Vasodilatation, wobei G_S-Protein gekoppelte endotheliale Adenosinrezeptoren diese möglicherweise verstärken. In beiden untersuchten Gruppen führte Adenosin in ansteigender Konzentration zu einer ähnlich zunehmenden Vasodilatation (siehe Abbildung 3.1 D). In der höchsten Konzentration dilatierten die Gefäße im Wildtyp jedoch mit 63,4 ± 4,4% ihrer maximalen Kapazität etwas stärker als in $G_{q/11}^{-/-}$ Tieren (50,7 ± 4,8%). Dieser Unterschied war grenzwertig signifikant (P=0,05).

3.2.2 Wirkung von Atropin in der Mikrozirkulation

Das Anticholinergikum Atropin ist ein potenter kompetitiver Antagonist der muscarinergen Acetylcholinrezeptoren aller Subklassen. Wenn Acetylcholin seine vasodilatatorische Wirkung über endotheliale muscarinerge Rezeptoren vermittelt, sollte Atropin bei entsprechender Konzentration die Dilatation inhibieren. Um zu untersuchen, ob Acetylcholin in der Mikrozirkulation nicht zusätzlich über M-Rezeptor unabhängige Signalwege (zum Beispiel nikotinerge ACh-Rezeptoren) wirkt, wurde die arterioläre Reaktion auf Acetylcholin im Musculus cremaster in Anwesenheit von Atropin dargestellt. Hierzu wurden 50 Gefäße in fünf Wildtypmäusen untersucht (Inzuchtlinie C57BL/6). Zur Kontrolle wurde zuerst die Wirkung von Acetylcholin in aufsteigender Konzentration in Abwesenheit von Atropin untersucht. Anschließend wurde der Superfusionslösung kontinuierlich Atropin zugeleitet, sodass auf dem Cremaster-Präparat eine Konzentration von 3µmol/L vorlag. Acetylcholin wurde nun erneut in aufsteigenden Konzentrationen von 0,1µmol/L bis 10µmol/L zugefügt und zwischen den Beobachtungen ausgewaschen.

Der Mittelwert der Ruhedurchmesser (vor Acetylcholingabe) unterschied sich in der Atropingruppe und der Kontrollgruppe nicht (12,1 ± 1,3µm vs 11,3 ± 1,0µm). Daraus kann gefolgert werden, dass in vivo in Ruhebedingungen der Gefäßdurchmesser nicht in messbarem Maße durch endogenes Acetylcholin beeinflusst wird. Der Mittelwert der maximalen Gefäßdurchmesser wurde mit und ohne Atropin bestimmt und war dabei nicht verschieden (ohne Atropin 28,3 ± 1,2µm, mit Atropin 27,5 ± 1,3µm), sodass für die weiteren Berechnungen das gemeinsame Maximum genutzt wurde. Die alleinige Gabe von Atropin in der Konzentration 3µmol/L führte zu keiner Änderung des Gefäßdurchmessers (siehe Abbildung 3.3).

Acetylcholin: Acetylcholin führte in der Kontrollgruppe zu einer konzentrationsabhängigen Vasodilatation, welche in der höchsten Konzentration 10µmol/L ein Maximum von 68,7 ± 4,4% der Dilatationskapazität erreichte (siehe

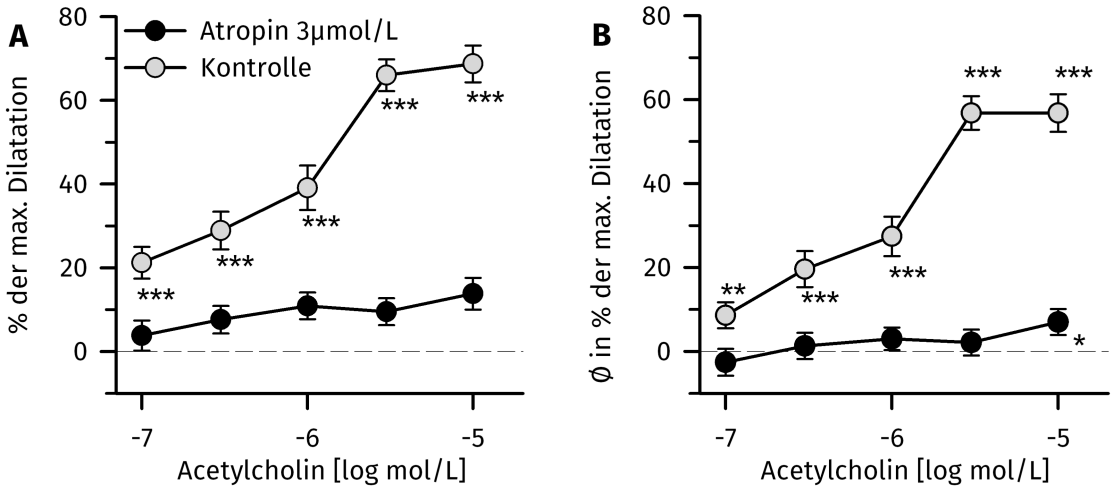

Abbildung 3.2: Wirkung von Atropin auf die Mikrozirkulation des M. cremasters in Wildtyp C57BL/6-Mäusen (n= 50 Gefäße in fünf Tieren). **A:** Darstellung der maximalen unter ansteigender Acetylcholinkonzentration erreichten arteriolären Dilatation in Prozent der maximal möglichen Gefäßerweiterung: nativ (Kontrollgruppe, graue Kreise) und unter kontinuierlicher Gabe von 3µmol/L Atropin (Atropingruppe, schwarze Kreise). Atropin führte zu einer signifikanten Reduzierung des dilatatorischen Potentials von ACh. **B:** Durchschnitt der unter ansteigender ACh-Konzentration erreichten Dilatation, nativ und unter 3µmol/L Atropin. Atropin blockierte die Vasodilatation nach ACh-Gabe bis zur Konzentration 3µmol/L. Lediglich die höchste ACh-Konzentration (10µmol/L) induzierte eine schwache, aber signifikante Erweiterung der Gefäße (Test gegen Null, Nulllinie eingezeichnet).
Signifikanzen: * $p < 0{,}05$ (Test gegen Null); ** $p < 0{,}01$ und *** $p < 0{,}001$ (Test Atropingruppe gegen Kontrollgruppe

Abbildung 3.2 A). In Anwesenheit von Atropin wurde eine Vasodilatation auf Acetylcholin bis zur Konzentration 3µmol/L blockiert, es kam also zu keiner signifikanten Änderung des Gefäßdurchmesser in Anwesenheit von Acetylchollin (siehe Abbildung 3.2 B). Lediglich in der höchsten Konzentration von 10µmol/L kam es zu einer geringfügigen Dilatation auf 7 ± 3,1% der Dilatationskapazität. Hierbei ist zu beachten, dass jedes Gefäß in jeder Konzentration in kurzem zeitlichem Abstand zweimal gemessen wurde. Für die Berechnung der Vasodilatation wurde in dieser Arbeit allgemein der jeweils größere der beiden gemessenen Werte verwendet. Dies führt bei einer ausbleibenden Dilatation jedoch zu einem systematischen Fehler und einer Verschiebung des Ergebnisses hin zu positiveren Werten. In Abbildung 3.2 B wurde daher das arithmetische Mittel der beiden Messwerte zur Beschreibung der Gefäßreaktion verwendet. Berechnet

man auch in der Kontrollgruppe die Mittelwerte, so reduziert sich zwar in allen Konzentrationsstufen die maximal erreichte Dilatation, die konzentrationsabhängige Steigung der Kurve bleibt aber bestehen. Die Berechnung in Abbildung 3.2 A verwendet hingegen den jeweils größeren der beiden Messwerte. In diesem Berechnungsmodell führt schon eine Acetylcholinkonzentration von 0,3µmol/L in der Atropingruppe zu einer geringen Dilatation, die dem systematischen Fehler zuzuschreiben ist. Dies wird auch deutlich durch die Beobachtung, dass steigende Konzentrationen die Dilatation nicht weiter verstärken. Die Dilatation bei den Konzentrationen 0,3µmol/L und 10µmol/L unterscheiden sich nicht signifikant (1,3 ± 3,1% vs 7 ± 3,1%).

Atropin blockiert also komplett die Gefäßantwort auf Acetylcholin. Erst wenn die ACh Konzentration diejenige von Atropin übersteigt, kommt es zu einer geringen arteriolären Dilatation. Die Relaxation ist somit abhängig von muscarinergen Rezeptoren.

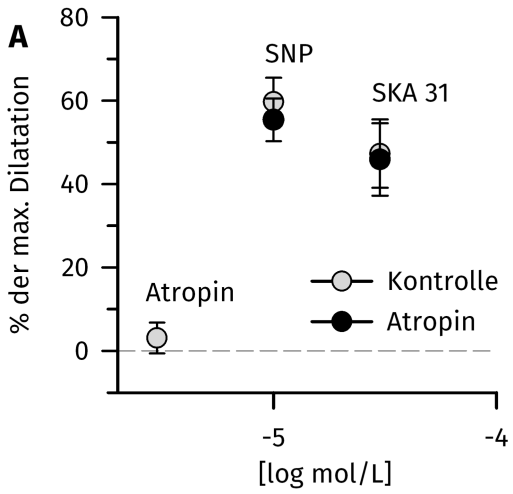

Abbildung 3.3: Vasoaktive Substanzen unter Atropin: Mikrozirkulation des M. cremasters in Wildtyp C57BL/6-Mäusen (n=21 Gefäße in zwei Tieren). Dargestellt ist die Dilatation in Prozent der maximalen Gefäßweite. **A:** SNP und SKA 31 induzierten arterioläre Vasodilatationen, die durch Atropin nicht verändert wurden (Kontrollgruppe graue Kreise, kontinuierliche Gabe von Atropin schwarze Kreise). Atropin selbst führte zu keiner Veränderung des Gefäßdurchmessers.

SNP und SKA 31: In zwei Tieren derselben Versuchsreihe wurde an 21 Gefäßen zusätzlich die Wirkung weiterer vasoaktiver Substanzen untersucht. Der endothelunabhängige NO-Donor SNP führte in der Atropin- und in der Kontrollgruppe zu einer ähnlichen Vasodilatation. Diese erreichte bei einer SNP-Konzentration von 10µmol/L und gleichzeitiger Atropingabe 55,4 ± 5,1% und unter der Kontrollbedingung 59,7 ± 5,8% der maximalen Dilatation (siehe Abbildung 3.3). SKA 31 ist ein Aktivator der endothelialen Calcium-abhängigen Kaliumkanäle $K_{Ca}3.1$ und $K_{Ca}2.3$ und führt dadurch zu einer EDHF mediierten Vasodilatation, die unabhängig von GPCR ist. In der Konzentration 30µmol/L führte SKA 31 zu einer deutlichen Vasodilatation, die nicht von Atropin beeinflusst wurde (siehe ebenfalls Abbildung 3.3). Atropin veränderte die dilatierende Wirkung von SNP und SKA 31 somit nicht.

3.2.3 Defizienz des M3-Rezeptors

Der Neurotransmitter Acetylcholin dient in der Forschung und Klinik als Standard zur Charakterisierung endothelabhängiger Vasodilatation. Er wirkt agonistisch an den muscarinergen Rezeptoren, wobei im peripheren Endothel vor allem die Subtypen M1 und M3 für die gefäßerweiternde Wirkung relevant erscheinen. Zur Bestimmung des funktionellen Anteils des M3-Subtyps an der arteriolären Vasodilatation im Skelettmuskel, wurde die Mikrozirkulation im M. cremaster von endothelzell (EC)-spezifisch M3-Rezeptor-defizienten Mäusen beobachtet. In den untersuchten Mäusen wurde das für den M3-Rezeptor (M3R) kodierende Gen durch loxP-Sites markiert (gefloxt) und konnte durch das Enzym Cre-Rekombinase deletiert werden. Es wurden zwei Gruppen mit unterschiedlicher Cre-Rekombinase Aktivität untersucht: In der ersten Gruppe führte ein modifizierter Estrogenrezeptor zu einer Liganden-aktivierbaren Cre-Rekombinase, die unter der Kontrolle des Endothelzellen (EC)-spezifischen Promotors VE-Cadherin stand, sodass nur bei Gabe des Liganden Tamoxifen das Rezeptorgen endothelspezifisch im adulten Tier deletiert wurde

($M3^{fl/fl}$:$CreER^{T}$). In der zweiten Gruppe stand die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des endothelspezifischen Promotors Tie2, wodurch der kodierende Genabschnitt bereits während der Embryonalphase deletiert wurde ($M3^{fl/fl}$:Tie2Cre). Als Kontrolle dienten in beiden Gruppen Geschwistertiere ohne Cre-Rekombinase Aktivität.

Deletion des M3-Rezeptors durch Liganden aktivierte Cre-Rekombinase

Die Deletion des M3-Rezeptors wurde in adulten Tieren des Genotyps $M3^{fl/fl}$:$CreER^{T}$ durch fünfmalige intraperitoneale Injektion mit in Sonnenblumenöl gelöstem Tamoxifen induziert (im Folgenden als $CreER^{Tam}$ bezeichnet). Um Effekte des Vehikels auszuschließen, wurde eine Kontrollgruppe aus Tieren des gleichen Genotyps mit intraperitonealer Injektion von Sonnenblumenöl behandelt ($CreER^{Veh}$). Zwischen Ende des Induktionsprotokolls und der Untersuchung lag mindestens eine Woche. Untersucht wurden 64 Gefäße in sechs Tieren der $CreER^{Tam}$ Gruppe und mit 62 Gefäßen in sechs Tieren der $CreER^{Veh}$ Gruppe verglichen. Während der Untersuchung wurden dem superfundiertem Präparat des M. cremasters Acetylcholin, Adenosin, SNP, Bradykinin und SKA 31 in aufsteigenden Konzentrationen nacheinander (nicht-kumulativ) zugefügt. Bei mehreren Tieren beider Gruppen zeigten sich lokalisierte Vernarbungen und Verklebungen des M. cremaster, welche die Sicht auf das Gefäßbett lokal erschwerten und damit die Auswahl an zu untersuchenden Arteriolen einschränkten. Diese Artefakte sind am ehesten auf eine Reizung des Muskels durch das Sonnenblumenöl zurückzuführen, welches nach Injektion entlang des Peritoneums in den Muskelsack fließen kann. Es wurden nur Gefäße untersucht, die außerhalb dieser Veränderungen lagen, eine weitere Beeinträchtigung während der Versuche wurde nicht beobachtet. Der Ruhetonus (Quotient aus den Mittelwerten der Ruhedurchmesser und des jeweils maximalen Gefäßdurchmessers), betrug in beiden Gruppen 41 ± 2%. Der maximale Gefäßdurchmesser der Arteriolen war in beiden Gruppen ebenfalls gleich ($CreER^{Tam}$:

32,1 ± 1,5µm; CreER^{Veh}: 32,5 ± 1,5µm). Somit wurden in Bezug auf Größe und Tonus vergleichbare Arteriolen untersucht.

Acetylcholin: In der CreER^{Veh} Gruppe führte Acetylcholin zu einer konzentrationsabhängigen Vasodilatation. Die maximale Gefäßweite wurde in der höchsten Konzentration 10µmol/L erreicht und betrug 74,5 ± 3,4% der maximal möglichen Dilatation. Auch in der CreER^{Tam} Gruppe kam es unter Wirkung von Acetylcholin zu einer zunehmenden Erweiterung der Gefäße: In den beiden niedrigsten Konzentrationsstufen war die Dilatation ähnlich ausgeprägt wie in den CreER^{Veh} Tieren. Ab Acetylcholinkonzentrationen von 3µmol/L und höher blieb die Gefäßantwort in den CreER^{Tam} Tieren signifikant hinter der CreER^{Veh} Gruppe zurück, stieg aber weiterhin konzentrationsabhängig an. Die größte Dilatation wurde ebenfalls durch die höchste ACh-Konzentration ausgelöst, erreichte mit 38,3 ± 4,4% der maximalen Gefäßweite jedoch nur etwa die Hälfte der Amplitude in CreER^{Veh} Tieren (siehe Abbildung 3.4 A). Die Ergebnisse zeigen, dass ein Fehlen des M3-Rezeptors zu einer attenuierten Dilatation auf Acetylcholin führt. Jedoch bleibt bei einer Deletion des Rezeptors durch Liganden aktivierte Cre-Rekombinase eine Restaktivität bestehen.

Bradykinin: Das Gewebshormon Bradykinin führt über den endothelialen Bradykinin2-Rezeptor (BR2) zu einer potenten Vasodilatation, welche Ähnlichkeiten zu der endothelialen Stimulation des M3-Rezeptors durch Acetylcholin zeigt. Beide Rezeptorgruppen koppeln intrazellulär an $G_{q/11}$-Proteine und führen durch Produktion von Stickstoffmonoxid, Prostaglandinen und über den EDHF Signalweg zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur. In der Mikrozirkulation der CreER^{Tam} Gruppe führte Bradykinin zu einer mit der Konzentration zunehmenden Vasodilatation. In der höchsten untersuchten Konzentration von 1µmol/L, erweiterte Bradykinin die Gefäße auf 63,9 ± 4,8% des maximalen Durchmessers. Die Kontrollgruppe der CreER^{Veh} Tiere zeigte einen sehr ähnlichen Kurvenverlauf und erreichte eine gleichstarke maximale Dilatation von 65 ± 3,8% (siehe Abbildung 3.4 D). Die Deletion des M3-Rezeptors durch eine

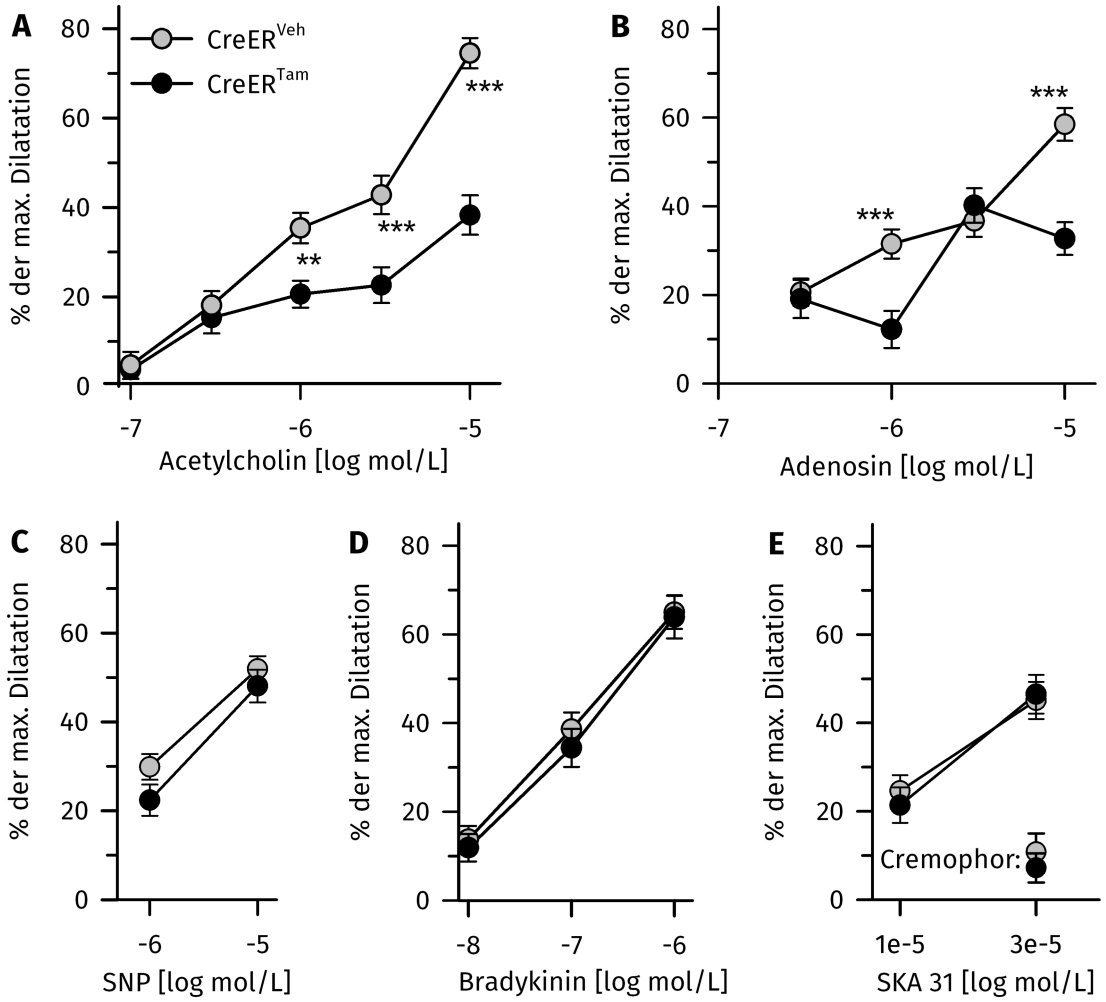

Abbildung 3.4: Arterioläre Dilatation in der Mikrozirkulation des M. cremasters in $M3^{fl/fl}$:$CreER^{Tam}$ Mäusen. Deletion des M3-Rezeptors in n=64 Gefäßen in sechs Tieren durch Injektion von Tamoxifen ($CreER^{Tam}$, schwarz) und Vergleich mit n=62 Gefäßen in sechs Tieren desselben Genotyps nach Injektion des Vehikels ($CreER^{Veh}$, grau). Dargestellt ist die Dilatation in Prozent der maximal möglichen Gefäßerweiterung. **A:** In $CreER^{Tam}$-Mäusen ist die konzentrationsabhängige Vasodilatation nach Acetylcholin ab 1µmol/L im Vergleich zu $CreER^{Veh}$-Tieren reduziert. **B:** Im Vergleich zu $CreER^{Veh}$-Mäusen bleibt die Dilatation der Gefäße in $CreER^{Tam}$-Mäusen nach Adenosingabe bei 1 und 10µmol/L zurück. **C, D, E:** SNP, Bradykinin und SKA 31 führen in beiden Gruppen zu konzentrationsabhängigen Vasodilatationen, der Verlust des M3-Rezeptors führt zu keiner signifikanten Änderung. **E:** SKA 31 wurde in Cremophor (30µmol/L) gelöst. Durch Cremophor alleine kommt es zu keiner Änderung des Gefäßdurchmessers.
Signifikanzen: ** $p < 0{,}01$; *** $p < 0{,}001$

Liganden aktivierte Cre-Rekombinase hatte keine Auswirkung auf die durch Bradykinin induzierte Dilatation. Da die intrazelluläre Signalweiterleitung des M3- und des BR2-

Rezeptors ähnlich ist, legen diese Daten nahe, dass die Deletion von M3-Rezeptoren keine Veränderungen der intrazellulären Kaskaden provoziert.

SNP und SKA 31: SNP setzt im Gewebe Stickstoffmonoxid frei, welcher direkt an der glatten Gefäßmuskulatur zu einer endothelunabhängigen Vasodilatation führt. Die arterioläre Reaktion auf SNP wurde in $CreER^{Tam}$ und $CreER^{Veh}$ Tieren in zwei Konzentrationen (1µmol/L und 10µmol/L) untersucht. In beiden Gruppen kam es zu einer konzentrationsabhängigen Vasodilatation, die sich nicht signifikant voneinander unterschieden (siehe Abbildung 3.4 C). Die Wirkung von Stickstoffmonoxid ist damit, wie erwartet, unabhängig von der Expression endothelialer M3-Rezeptoren.

In der Mikrozirkulation führt Acetylcholin am Endothel zu einer Hyperpolarisation durch Öffnung Calcium-abhängiger Kaliumkanäle und aktiviert dadurch auch den EDHF Signalweg. SKA 31 ist ein direkter Agonist dieser Kanäle und ermöglicht dadurch Aussagen über die Funktion des Signalwegs. Da SKA 31 nicht wasserlöslich ist, muss die Substanz mithilfe von Cremophor EL (Kolliphor) im Superfusat gelöst werden. Cremophor selbst führte zu keiner Veränderung des Gefäßtonus (siehe Abbildung 3.4 E). SKA 31 löste in beiden Gruppen eine konzentrationsabhängige Vasodilatation aus, die Deletion des M3-Rezeptors ließ diese Reaktion unverändert.

Adenosin: Adenosin bewirkt eine endothelunabhängige Vasodilatation durch direkte Aktivierung von Adenosinrezeptoren in der glatten Gefäßmuskulatur. Endotheliale Adenosin-Rezeptoren können die Wirkung teilweise verstärken. In der Mikrozirkulation der $CreER^{Veh}$ Mäuse induzierte Adenosin eine konzentrationsabhängige Dilatation der untersuchten Arteriolen. Die maximale Gefäßerweiterung von 58,5 ± 3,7% der Dilatationskapazität wurde in der höchsten Konzentraion 10µmol/L erreicht, und ist damit ähnlich ausgeprägt wie die Vasodilatationen nach SNP. In den $CreER^{Tam}$ Tieren führte Adenosin jedoch zu einem ungewöhnlichen Ergebnis: Die Konzentrationen 0,3 und 3µmol/L provozierten eine mit den $CreER^{Veh}$ Tieren vergleichbare Dilatation. Die jeweils nächst höheren Konzentrationen 1 und 10µmol/L führten aber nicht zu einer

weiteren Zunahme der Dilatation, stattdessen stagnierte die Gefäßerweiterung auf etwa demselben Niveau. Im Vergleich zu den $CreER^{Veh}$ Tieren blieb die Gefäßreaktion der $CreER^{Tam}$ Tiere auf Adenosin in den Konzentrationen 1µmol/L und 10µmol/L somit zurück (Abbildung 3.4 B).

Deletion des M3-Rezeptors durch Tie2Cre

Die Ausschaltung gefloxter Genabschnitte durch die Liganden-aktivierte Cre-Rekombinase gelingt nicht mit vollständiger Penetranz. Beispielsweise führen niedrige lokale Tamoxifenspiegel zu einer unzureichenden Aktivierung der Cre-Rekombinase und es entstehen genetische Mosaike. Jede Zelle in der die Cre-Rekombinase nicht aktiviert wurde, liest das gefloxte Gen weiterhin ab und transkribiert das entsprechende Protein. Da Endothelzellen untereinander durch Gap junctions elektrisch gekoppelt sind, ist es denkbar, dass die Aktivierung einer einzelnen Zelle mit M3R Expression zur Aktivierung mehrerer benachbarter Zellen führen kann. Die nur etwa zur Hälfte reduzierte Dilatation nach Acetylcholingabe in tamoxifenbehandelten $M3^{fl/fl}$:$CreER^{T}$-Mäusen lässt vermuten, dass das M3-Rezeptorgen nur unvollständig deletiert wurde (Vergleich Abbildung 3.4 A). In $M3^{fl/fl}$:Tie2Cre-Mäusen wird die Aktivität der Cre-Rekombinase nur durch den endothelspezifischen Promotor Tie2 kontrolliert und ist damit unabhängig von einer Aktivierung durch Liganden. Dadurch gelingt die Deletion des M3-Rezeptors im Endothel schon während der Embryonalphase und mit hoher Penetranz. Vergleichende Beobachtungen der Mikrozirkualtion im Skelettmuskel der beiden Deletionsgruppen erlauben Rückschlüsse auf die Relevanz einer kompletten Deletion.

Zur Beobachtung der Mikrozirkulation standen sechs $M3^{fl/fl}$:Tie2Cre-Tiere zur Verfügung, in denen 75 Gefäße untersucht wurden. Die Ergebnisse wurden mit 58 Gefäßen in fünf Geschwistertieren des Genotyps $M3^{fl/fl}$ (ohne Tie2Cre) verglichen (Kontrollgruppe). Die Untersuchung wurde wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben durchgeführt. Der Mittelwert der arteriolären Durchmesser in Ruhe

vor Substanzgabe betrug in der $M3^{fl/fl}$:Tie2Cre-Gruppe 15,7 ± 1,7µm und in der Kontrollgruppe 14,1 ± 1,1µm, ein Unterschied war auf dem Signifikanzniveau nicht festzustellen. Die maximalen Durchmesser waren ebenfalls nicht verschieden mit 28,4µm ± 1,1µm beziehungsweise 28,6 ± 1,0µm.

Acetylcholin: In der Kontrollgruppe ($M3^{fl/fl}Tie2Cre^{-/-}$ führte Acetylcholin zu einer ausgeprägten konzentrationsabhängigen Vasodilatation und erweiterte in der höchsten Konzentration von 10µmol/L die Gefäße auf 78,9 ± 3,3% der maximal möglichen Gefäßerweiterung. In $M3^{fl/fl}$:Tie2Cre-Tieren führte Acetylcholin in hohen Konzentrationen zu einer nur geringen Dilatation. Die beiden niedrigsten Konzentrationen Acetylcholins (0,1 und 0,3µmol/L) führten zu keiner signifikanten Veränderung der Gefäßweite im Vergleich zum Ruhedurchmesser. Der in der Abbildung ersichtliche positive Wert bei 0,1µmol/L ACh kommt dadurch zustande, dass zur Darstellung der Dilatation nur der jeweils größere der beiden kurz hintereinander erhobenen Messwerte berücksichtigt wurde (wie im Abschnitt 3.2.2 auf Seite 34 beschrieben). Erst ab einer Konzentration von 1µmol/L ACh kam es zu einer signifikanten Dilatation der Gefäße (siehe Abbildung 3.5 A). Diese signifikante Dilatation war auch festzustellen, wenn zur Berechnung der Mittelwert der beiden Messwerte herangezogen wurde. Bei den beiden höchsten Konzentrationen ACh (3 und 10µmol/L) nahm die Dilatation nur wenig weiter zu und erreichte maximal 24,2 ± 3,9% der Dilatationskapazität. Die Gefäßweiten bei den Konzentrationen 1 bis 10µmol/L waren jedoch nicht signifikant unterschiedlich.

Im Vergleich der beiden Gruppen führte der Verlust des M3-Rezeptors durch die Tie2-induzierte Cre-Rekombinase somit zu einer deutlichen Reduktion des vasodilatatorischen Potentials von Acetylcholin. In höheren Konzentrationen vermochte Acetylcholin jedoch weiterhin eine Erweiterung der Gefäße auszulösen, wobei eine Steigerung bei Erhöhung der Konzentrationen nicht mehr möglich war. Die Reaktion auf Acetylcholin ist in

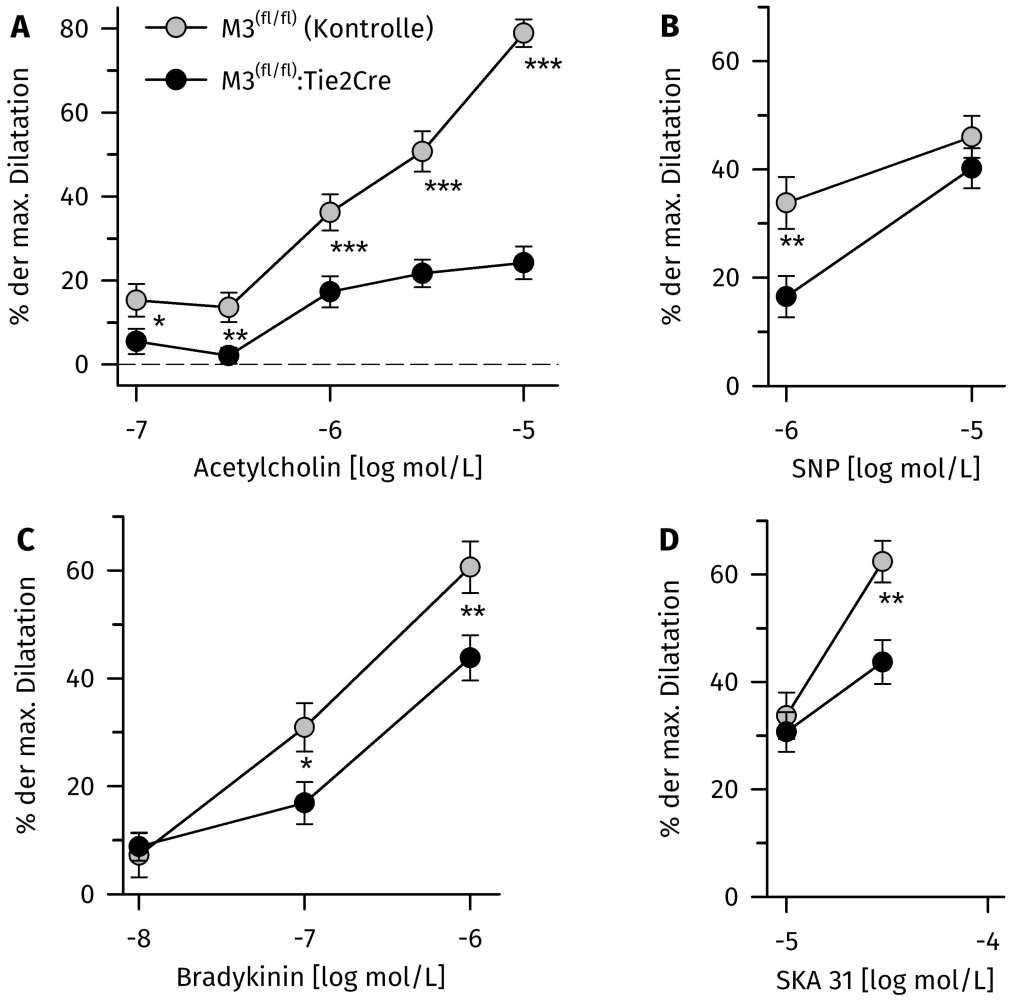

Abbildung 3.5: Arterioläre Dilatation in der Mikrozirkulation des M. cremasters in endothelspezifisch M3-Rezeptor defizienten Mäusen ($M3^{fl/fl}$:Tie2Cre, schwarz, n=75 Gefäße in sechs Tieren) und Vergleich mit $M3^{fl/fl}$-Mäusen ohne Tie2Cre (Kontrolle, grau, n=58 Gefäße in fünf Tieren). Dargestellt ist die Dilatation in Prozent der maximal möglichen Gefäßerweiterung. **A:** Die Dilatation durch ACh war in $M3^{fl/fl}$Tie2Cre-Tieren in jeder getesteten Konzentration signifikant vermindert. ACh-Konzentrationen von 0,1µmol/L und 0,3µmol/L führten in $M3^{fl/fl}$Tie2Cre-Tieren zu keiner Dilatation. Bei höheren Konzentrationen stellte sich ein Plateau ein. **B:** SNP führte zu konzentrationsabhängiger Vasodilatation, die in $M3^{fl/fl}$Tie2Cre bei 1µmol/L signifikant hinter der Kontrollgruppe blieb. **C:** Bradykinin führte zu konzentrationsabhängiger Vasodilatation, die in $M3^{fl/fl}$Tie2Cre-Tieren gering zur Kontrollgruppe vermindert war. **D:** SKA 31 führte in beiden Gruppen zu konzentrationsabhängiger Vasodilatation, war jedoch in der $M3^{fl/fl}$Tie2Cre-Gruppe bei 30µmol/L signifikant reduziert.
Signifikanzen: * $p < 0{,}05$; ** $p < 0{,}01$; *** $p < 0{,}001$

den $M3^{fl/fl}$:Tie2Cre-Tieren im Vergleich zu den im vorherigen Abschnitt beschriebenen $M3^{fl/fl}$:$CreER^T$ weiter reduziert.

Bradykinin: Bradykinin führte in $M3^{fl/fl}$:Tie2Cre-Tieren zu einer konzentrationsabhängigen Vasodilatation, welche in der höchsten Konzentration 43,8 ± 4,2% erreichte. Die im Vergleich untersuchte Kontrollgruppe zeigte ebenfalls eine konzentrationsabhängige Dilatation der Gefäße, welche aber in den höheren Konzentrationen zu etwas größeren Durchmessern führte und maximal eine Dilatation von 60.6 ± 4,8% der Dilatationskapazität erreichte (siehe Abbildung 3.5 C). In den Konzentrationen 0,1 und 1µmol/L war die $M3^{fl/fl}$:Tie2Cre-Gruppe damit statistisch signifikant hinter der Kontrollgruppe zurück. Durch den Verlust des M3-Rezeptors durch Tie2Cre-Aktivität wurde die Vasodilatation nach Bradykiningabe in der Mikrozirkulation geringfügig abgeschwächt.

SNP und SKA 31: SNP führte in beiden Gruppen zu einer konzentrationsabhängigen Vasodilatation, die in der höchsten Konzentration ähnliche Werte erreichte ($M3^{fl/fl}$:Tie2Cre-Gruppe 40,2 ± 3,7%, Kontrollgruppe 46,0 ± 3,9%). In der niedrigeren Konzentration (1µmol/L) dilatierten die Gefäße der Kontrolltiere jedoch signifikant stärker (siehe Abbildung 3.5 B).

SKA 31 führte in der Konzentration 10µmol/L in beiden Gruppen zu einer fast identischen Erweiterung der Gefäße. Unter 30µmol/L SKA 31 nahm die Dilatation weiter zu, wobei die Dilatation in $M3^{fl/fl}$:Tie2Cre-Gruppe unter derjenigen der Kontrolltiere blieb. Der Verlust des M3-Rezeptors durch Tie2Cre-Aktivität führte somit in einigen Konzentrationen zu einer abgeschwächten vasodilatatorischen Reaktion auf SNP und SKA 31.

3.2.4 Vergleich der Deletionsmethoden

Die Untersuchung der Mikrozirkulation erfolgte wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben anhand von zwei unterschiedlich genetisch modifizierten Tiergruppen. Die veränderte Reaktion auf vasoaktive Substanzen wurde dabei direkt mit den Wildtypen oder nicht induzierten Tieren aus derselben Zuchtlinie verglichen. Aus den

gewonnenen Daten lassen sich aber auch Vergleiche zwischen den beiden genetisch modifizierten Gruppen durchführen. In der Tie2Cre Gruppe war die Acetylcholin induzierte Vasodilatation weniger ausgeprägt als in Tieren der $CreER^{Tam}$-Gruppe. Dieser Unterschied war bei der höchsten Konzentration besonders ausgeprägt, und die Dilatation war in $CreER^{Tam}$-Tieren nahezu doppelt so groß. Des Weiteren war die Sensitivität für ACh in den Tie2Cre-Tieren reduziert, denn bei 0,3µmol/L ACh war nur in $CreER^{Tam}$-Tieren eine geringe, aber signifikante Dilatation zu beobachten.

Bradykinin führte in Tie2Cre-Tieren ebenfalls zu einer signifikant geringer ausgeprägten Vasodilatation (ab 0,1µmol/L), und der Unterschied blieb bei steigender Konzentration bestehen. Die Wirkung von SNP und SKA-31 unterschied sich in den beiden Gruppen hingegen nicht voneinander. In Tabelle 3.2 sind die Dilatationswerte der untersuchten Substanzen und Konzentrationen für die beiden Genotypen gegenüber gestellt.

Konzentration [µmol/L]	Prozent der max. Dilatation [%]		p
	$CreER^{Tam}$	Tie2Cre	
Acetylcholin			
0,1	3,8 ± 2,1	5,5 ± 3,0	n.s.
0,3	15,3 ± 3,5	2,1 ± 1,9	<0,001
1,0	20,9 ± 3,0	17,3 ± 3,7	n.s.
3,0	22,8 ± 4,0	21,7 ± 3,3	n.s.
10	39,6 ± 4,4	24,2 ± 3,9	0,010
Natriumnitroprussid (SNP)			
1,0	23,1 ± 3,5	16,5 ± 3,8	n.s.
10	48,9 ± 3,6	40,2 ± 3,7	n.s.
Bradykinin			
0,01	12,1 ± 3,1	8,8 ± 2,6	n.s.
0,1	34,4 ± 4,3	16,9 ± 3,9	0,003
1,0	64,5 ± 4,7	43,8 ± 4,2	0,001
SKA-31			
10	21,7 ± 4,0	30,7 ± 3,7	n.s.
30	47,9 ± 4,5	43,7 ± 4,1	n.s.

Tabelle 3.2: Vergleich der Vasodilatation in Tieren nach zeitlicher begrenzter Ausschaltung ($CreER^{Tam}$) und kontinuierlicher Deletion (Tie2Cre) des endothelialen M3-Rezeptors. Die Vasodilatation ist in Prozent der maximal möglichen Dilatation während des Versuchs angegeben. In der linken Spalte finden sich die untersuchten vasoaktiven Substanzen und deren wirksame Konzentration auf dem Präparat. Signifikanzberechnung über ungepaarten t-Test.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt die wesentliche Beteiligung des endothelialen M3-Acetylcholinrezeptors und der $G_{q/11}$-Proteine in der durch Acetylcholin ausgelösten Vasodilatation in Arteriolen eines Skelettmuskels der Maus (M. cremaster). Acetylcholin führte in allen untersuchten Wildtyptieren, wie erwartet, zu einer konzentrationsabhängigen Vasodilatation, welche in der höchsten untersuchten Konzentration (10µmol/L) durchschnittlich 70% der maximalen Dilatationskapazität der Arteriolen erreichte. Atropin, ein unspezifischer Antagonist der muscaringergen Acetylcholinrezeptoren, war in der Lage die durch Acetylcholin ausgelöste Vasodilatation vollständig zu hemmen, sofern die Atropinkonzentration gleich (oder höher) der des Acetylcholins war. Andere Vasodilatatoren wie SNP und SKA31, waren in ihrer vasodilatatorischen Wirkung unabhängig von muscarinergen Rezeptoren und nicht durch Atropin zu beeinflussen. Dies zeigt, dass muscarinerge Rezeptoren die endotheliale Stimulation zur Auslösung der Dilatation nach Acetylcholin vermitteln.

In genetisch modifizierten Tieren mit Deletion des endothelialen M3-Rezeptors war die Vasodilatation nach Acetylcholingabe deutlich abgeschwächt, jedoch nicht vollständig aufgehoben. Die Restaktivität der Acetylcholin-induzierten Vasodilatation war dabei abhängig von der gewählten Deletionsmethode: Der Verlust des endothelialen M3-Rezeptors durch eine Tie2 kontrollierte Cre-Rekombinase führte zu einer Reduktion der Vasodilatation durch Acetylcholin auf etwa ein Viertel der in Wildtyptieren gemessenen Werte. Wurde der M3-Rezeptor zeitlich durch eine mittels Tamoxifengabe

induzierte Aktivierung der Cre-Rekombinase deletiert ($CreER^{Tam}$ Gruppe), reduzierte sich die Vasodilatation nur um etwa die Hälfte. Beide Deletionsmethoden erreichen damit im Gegensatz zu Atropin keine vollständige Unterdrückung der ACh-induzierten Vasodilatation. Dies zeigt, dass in peripheren Arteriolen der M3-Rezeptor bedeutend für die Signaltransduktion ist, jedoch andere M-Rezeptoren (zum Beispiel M1) ebenfalls zur Dilatation beitragen.

Die Wirkung anderer Vasodilatatoren (SNP, Bradykinin) war in der $CreER^{Tam}$ Gruppe unverändert. In der Tie2-Gruppe war die Vasodilatation nach Bradykinin wenig reduziert, SNP führte in hoher Konzentration zu gleicher Vasodilatation wie im Wildtyp.
Der Verlust des endothelialen $G_{q/11}$-Proteins durch Deletion seines kodierenden Gens führte ebenfalls zu einer deutlich abgeschwächten Vasodilatation nach Acetylcholingabe auf etwa ein Drittel der Werte im Wildtyp.

Hervorzuheben ist, dass in dieser Arbeit Arteriolen mit einem Ruhedurchmesser von etwa 15 bis 40µm untersucht wurden, welche der Mikrozirkulation zu zuordnen sind. Auf der Ebene der Mikrozirkulation wird die endothelabhängige Dilatation nach Aktivierung der endothelialen Acetylcholinrezeptoren und ihren gekoppelten $G_{q/11}$-Proteinen vornehmlich durch EDHF auf die glatte Muskulatur und nicht wie in größeren Gefäßen durch Stickstoffmonoxid (NO) oder Prostaglandine übertragen [104]. Die endothelialen muscarinergen M3-Rezeptoren und die an sie koppelnden $G_{q/11}$-Proteine sind somit wesentlich in der Signaltransduktion im Endothel bei der endothelabhängigen und EDHF-mediierten Vasodilatation durch Acetylcholin beteiligt.

4.1 Einordnung in die aktuelle Studienlage

Acetylcholin gilt seit Furchgott als Goldstandard zur Untersuchung der endothelabhängigen Vasodilatation [43]. Seine Messungen führte Furchgott an Präparaten von Arterien in vitro durch. Rosenblum konnte 1986 die gefäßerweiternde

Wirkung des ACh erstmals in vivo in der Mikrozirkulation cerebraler Mausarteriolen nachweisen [97]. Auch in peripheren Mausarteriolen führt ACh zur Vasodilatation [99]. Die Ergebnisse der Untersuchungen dieser Arbeit im Wildtyp bestätigen die bekannte, gefäßerweiternde in vivo Wirkung des Acetylcholins in der Mikrozirkulation der Maus.

Furchgott beschrieb nicht nur die Endothelabhängigkeit der Acetylcholin induzierten Vasodilatation sondern auch, dass sich diese Vasodilatation durch Atropin blockieren lässt und somit auf Rezeptoren des muscarinergen Typs basiert. Die Einteilung der Acetylcholinrezeptoren in muscarinerg und nitcotinerg erfolgte bereits durch Dale Anfang des 20. Jahrhunderts [25]. Zur Zeit der Veröffentlichung Furchgotts waren aber, trotz erster Vermutungen, die unterschiedlichen Subtypen der mACh-Rezeptoren noch nicht bekannt. Erst in den folgenden Jahren wurden zunächst durch pharmakologische Untersuchungen und dann durch Sequenzierung die Subtypen M1 bis M5 differenziert und die Unterschiede der Subtypen anhand der gekoppelten G-Proteine und der gewebespezifischen Verteilung entdeckt. Auch in dieser Arbeit konnte durch Zugabe von Atropin eine vollständige Unterdrückung der ACh-abhängigen Vasodilatation erreicht werden, wodurch die Zugehörigkeit der relevanten Rezeptoren als Familie der muscarinergen ACh-Rezeptoren bestätigt wird. Neben den muscarinergen Rezeptoren können Endothelzellen auch nikotinerge Acetylcholinrezeptoren exprimieren [76]. Diesen Rezeptoren wird eine Rolle in der Angiogenese zugeschrieben [55], unter speziellen Bedingungen scheint zudem eine teilweise Vermittlung der ACh-induzierten Vasodilatation möglich zu sein [130]. Sofern durch Atropin die Acetylcholinwirkung vollständig inhibiert werden kann (wie in dieser Arbeit der Fall) ist keine Kontribution der nikotinergen Rezeptoren zur Vasodilatation nachweisbar.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten Anfang der 1990er Jahre in in vitro Studien zur pharmakologischen Bindungsaffinität die muscarinergen Rezeptoren der Subtypen M1, M5 und vornehmlich M3 (jeweils $G_{q/11}$-gekoppelt), als die für die Vasodilatation relevanten Rezeptoren nachweisen [19]. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete

Abschwächung der Acetylcholin-induzierten Vasodilatation in Mäusen nach Deletion des Gens der endothelialen $G_{q/11}$-Proteine verifiziert die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppen auch in Arteriolen.

Obwohl es grundsätzlich möglich ist, die muscarinergen Rezeptoren durch Unterschiede in den Dissoziationskonstanten von Agonisten und Antagonisten den jeweiligen Subtypen zuzuordnen, so fehlen doch bis heute in der Breite anwendbare, hochspezifische Antagonisten der einzelnen Subtypen [102]. Eine sonst übliche funktionelle pharmakologische Charakterisierung der Rezeptorsubtypfunktion ist daher an muscarinergen ACh-Rezeptoren nur mit großem Unsicherheitsfaktor möglich [129]. Im Rahmen der Möglichkeiten genetischer Modifizierung durch homologe Rekombination, umgingen Arbeitsgruppen dieses Problem der pharmakologischen Antagonisierung durch gezielte genetische Ausschaltung einzelner Rezeptorsubtypen (erstmals durch Hamilton et al. 1997 [53]). Eine umfangreichere Charakterisierung der für die arterielle Vasomotorik relevanten muscarinergen Rezeptoren mittels rekombinanten Tieren fand durch Gericke et al. am in vitro Modell statt [49]. Dafür nutzte die Gruppe Mäuse mit globaler Deletion von jeweils einem der $G_{q/11}$-Protein gekoppelten ACh-Rezeptor Subtypen M1, M3 oder M5. Die cholinerge Vasodilatation wurde in vitro an isolierten und kanülierten kleinen Arterien ohne Fluss beobachtet (Ruhedurchmesser zwischen 62µm und 267µm). Innerhalb dieses Versuchaufbaus führte Acetylcholin an Gefäßen aus M3-defizienten Tieren zu keiner Vasodilatation, während der Verlust des M1 und M5 Subtyps die Wirkung des Acetylcholins nicht beeinträchtigte. Damit lieferte die Arbeitsgruppe um Gericke einen wichtigen Nachweis zur funktionellen Dominanz des M3-Rezeptors in arteriellen Gefäßen und bestätigt die von Bungardt et al. in Dissoziationsstudien gewonnenen Ergebnisse. Auch die vorliegende Arbeit zeigt anhand der deutlich reduzierten cholinergen Vasodilatation in M3-defizitären Tieren die funktionelle Relevanz des M3 Rezeptors.

Im Gefäßsystem exprimieren neben den Endothelzellen auch die glatten Muskelzellen muscarinerge Rezeptoren. Für die direkte Wirkung von Acetylcholin an der glatten Muskulatur ist je nach Rezeptorsubtyp eine konstringierende oder auch dilatierende Wirkung beschrieben, wobei die Vasokonstriktion meist führend ist [31]. Die Relevanz der glattmuskulären Acetylcholinwirkung, insbesondere für die Mikrozirkulation in vivo ist aber fraglich: Wird die endothelabhängige Vasodilatation durch Inhibierung des EDHF und des NO-Wegs unterdrückt führt Acetylcholin nicht mehr zu einer Änderung des arteriolären Durchmessers [15]. In der vorliegenden Arbeit kam es bei keiner Acetylcholinanwendung zu einer Gefäßkonstriktion, auch nicht nach endothelialer M3-Deletion.

4.1.1 Besonderheiten des Versuchaufbaus

In Zusammenschau der Forschungsergebnisse seit Entdeckung der endothelabhängigen Vasodilatation durch Furchgott spricht in peripheren Arterien vieles für eine führende, wenn nicht sogar fast ausschließliche Transduktion der Acetylcholin induzierten Vasodilatation über den M3-Rezeptor. Eine Einschränkung vieler zu diesem Themenfeld veröffentlichten Studien ist jedoch, dass die Ergebnisse nicht in vivo und insbesondere nicht in Arteriolen mit einem Durchmesser unter 50µm gemessen wurden. Häufig wird die Vasomotorik in vitro beispielsweise an Gefäßringen in einem Myographen gemessen, mit zwar frischen Gefäßpräparaten, aber in einem Versuchsaufbau der die Physiologie nur teilweise wiedergibt. Schwierig zu simulieren sind unter anderem Flusseffekte des Blutstroms (falls Fluss überhaupt simuliert wird ist dieser meist kontinuierlich und nicht pulsatil), mögliche Wirkungen von im Blut gelösten Hormonen und Metaboliten, sowie mechanische Effekte des umgebenden Gewebes. Je nach Versuchsanordnung variieren die Ergebnisse daher deutlich. So ist beispielsweise die Acetylcholin-induzierte, EDHF-abhängige Vasodilatation in Connexin 40 defizienten Mäusen nur in einem isobaren

Versuchsaufbau darstellbar, in einem isometrischen Aufbau hat Acetylcholin hingegen beinahe keinen dilatativen Effekt [11].

Ebenfalls relevant ist die anatomische Herkunft der untersuchten Gefäße, da sich Beobachtungen nicht immer auf andere Gefäßregionen übertragen lassen. Besonders prägnant hierfür sind die zerebralen Gefäße, in denen funktionell wohl nur der M5 Rezeptor von Bedeutung ist [127], dessen Rolle in der Peripherie aber vernachlässigbar ist.

Obwohl gerade auf Ebene der Arteriolen und im Bereich der Mikrozirkulation wichtige physiologische Parameter wie Blutdruck und Gewebeperfusion entscheidend kontrolliert werden, so beleuchten bisherige Untersuchungen meist größere Arterien oder zerebrale Arteriolen, welche sich gut für in vitro Versuche präparieren lassen; Studien zur peripheren Mikrozirkulation sind bis heute selten. Die vorliegende Arbeit hat somit ein Alleinstellungsmerkmal inne, da die funktionelle Relevanz des M3 Rezeptors für die periphere Mikrozirkulation in vivo bisher nicht beschrieben wurde.

In der bisherigen Ermangelung hochspezifischer Antagonisten werden zur Charakterisierung der muscarinergen Rezeptoren heutzutage bevorzugt rekombinante Tiere genutzt [102]. Besonders hervorzuheben an dieser Arbeit ist die Nutzung von zwei verschiedenen endothelspezifischen Deletionsmethoden des M3-Rezeptors, welche eine weitere Differenzierung und Beurteilung der Ergebnisse zulässt. Durch zusätzliche Untersuchung von rekombinanten Tieren mit Verlust des an den M3-Rezeptor koppelnden $G_{q/11}$-Proteins in derselben in vivo Methode lässt sich auch die nachfolgende Signaltransduktion beschreiben.

Nicht zuletzt erlaubt die Beobachtung der Makrohämodynamik durch invasive Langzeitmessung von Herzfrequenz und Blutdruck Rückschlüsse auf die physiologische Relevanz der durch M3-Rezeptoraktivierung ausgelösten Dilatation.

4.2 ACh-induzierte Vasodilatation in der Mikrozirkulation ist abhängig von M3-Rezeptoren

Ordnet man die Ergebnisse dieser Arbeit in die bestehende Datenlage ein, so lässt sich primär die hohe Relevanz des M3 Rezeptors für die Acetylcholin induzierte Vasodilatation auch in der Mikrozirkulation bestätigen: Der Verlust des M3-Rezeptors durch eine Tie2 induzierte Cre-Rekombinase führte im Vergleich zum Wildtyp zu einer um 70% reduzierten Vasodilatation nach Acetylcholingabe. Damit ist der M3 Rezeptor auch in der Mikrozirkulation des Skelettmuskels der Maus der führende Vermittler Acetylcholin induzierter Vasodilatation. Im Unterschied zu den funktionellen in vitro Ergebnissen von Bungardt et al., Bény et al. und Gericke et al. führte der Verlust des M3 Rezeptors jedoch nur zu einer abgeschwächten Vasodilatation, nicht aber zum vollständigen Verlust [7, 19, 49].

Es stellt sich daher die Frage, welche Ursache der vasodilatativen Restaktivität zu Grunde liegt. Obwohl die drei oben genannten Arbeitsgruppen keine Beteiligung der anderen Subtypen nachweisen konnten, so lieferten doch Gericke et al. den Nachweis, dass mRNA-Produkte aller muscarinergen Rezeptoren in peripheren Gefäßen durch rtPCR nachweisbar sind. Einschränkend dabei ist die mangelnde Differenzierung, ob mRNA-Produkte von Endothelzellen oder von anderen vaskulären Zellen (beispielsweise der glatten Muskulatur) stammen. Daten von Tracey et al. weisen aber auch an frisch isolierten, kultivierten Endothelzellen aus boviner Aorta per Northernblot-Analyse mRNA der Subtypen M1 bis M3 endothelspezifisch nach [112]. Die lediglich reduzierte Vasodilatation nach Acetylcholingabe ist daher ein Hinweis darauf, dass möglicherweise auch andere muscarinerge Acetylcholinrezeptoren im Endothel der Arteriolen funktionell aktiv sind und in vivo an der endothelabhängigen Vasodilatation beteiligt sind. Diese These wird unterstützt durch die in dieser Arbeit gezeigten Versuche

mit Atropin in Wildtyptieren, in denen Atropin in entsprechend hoher Dosierung die acetylcholinabhängige Vasodilatation vollständig unterdrückte.

Unabhängig von der endothelialen Funktion besteht die Möglichkeit, dass Acetlycholin über die muscarinergen Rezeptoren der glatten Muskulatur ebenfalls zu einer Vasodilatation führen kann. Die glatte Gefäßmuskulatur exprimiert mehrere Subtypen der muscarinergen Rezeptoren, welche in vitro - je nach untersuchter Spezies, Gefäßregion und Rezeptorsubtyp - sowohl zu einer Dilatation als auch zu einer Konstriktion führen können [31, 32]. Wie bereits durch Furchgott gezeigt, scheint der glattmuskuläre Anteil bei funktionsfähigem Endothel aber vernachlässigbar zu sein [43]. Untersuchungen an Mäusen in vivo mit Deletion der endothelialen, calciumabhängigen Kaliumkanäle $K_{Ca}2.3$ und $K_{Ca}3.1$ (EDHF-Mediatoren) sowie gleichzeitiger Inhibierung des NO-Signalwegs durch Blockierung der eNOS mit N^{ω}-nitro-L-arginin (L-NNA) zeigten weder eine verbleibende Dilatation noch eine Konstriktion von Gefäßen nach Acetylcholin [15]. Dies lässt vermuten, dass die glattmuskulären Acetylcholinrezeptoren in vivo auch bei Aufhebung der Endothelfunktion nicht in relevantem Maßstab zur Änderung des Gefäßdurchmessers beitragen. Die nach Acetylcholingabe verbliebene Dilatation in M3-defizienten Mäusen ist daher wahrscheinlich nicht durch eine glattmuskuläre Wirkung bedingt, obgleich sie im Rahmen dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden kann.

4.2.1 M3R Restaktivität ist abhängig von der Deletionsmethode

Auffällig an den vorliegenden Ergebnissen ist die Diskrepanz zwischen den beiden Deletionsmethoden. Der Verlust des M3 Rezeptors über eine permanent aktive durch Tie2 kontrollierte Cre-Rekombinase findet bereits in der Embryonalphase mit Entstehung der Endothelzellen statt, die Tamoxifeninduzierte Deletion hingegen erst im adulten Tier. Im Fall einer vollständigen Deletion ohne zelluläre Kompensation sollten beide Methoden dennoch zu gleichen vaskulären Effekten führen. Allenfalls wäre eine stärkere Hemmung der Vasodilatation in Tieren mit Tamoxifen induzierter Deletion denkbar, da hier dem

Endothel weniger Zeit bleibt, um auf zellulärer Ebene kompensatorisch die Expression anderer muscarinerger Rezeptoren heraufzuregulieren. In der vorliegenden Arbeit ist jedoch das Gegenteil der Fall: Die Reduktion der Acetylcholin induzierten Vasodilatation in Tieren mit Tamoxifen induzierter Deletion zur Kontrollgruppe betrug in der höchsten Konzentration nur etwa 50% und war signifikant geringer ausgeprägt als in den Tieren der Tie2 Gruppe.

Eine mögliche Erklärung ist eine nach Tamoxifenbehandlung nicht in allen Zellen erfolgreiche Deletion des M3-Rezeptorgens. Über die interzelluläre Kopplung der Endothelzellen kann sich ein durch Acetylcholin ausgelöster Anstieg der Ca^{2+}-Konzentration auch in benachbarte Zellen ausbreiten [65]. So genügen wenige Zellen [67] mit noch vorhandener Expression des M3-Rezeptors, um einen größeren Zellverband zu aktivieren und das Signal im Vergleich zur eigentlichen Rezeptordichte zu potenzieren. Monvoisin et al., als Erstbeschreiber der VE-Cadherin-CreER^{T2} Tiere, konnten bereits mittels eines β-Galactosidase Reportergens in Färbeversuchen nur eine partielle Rekombination im Endothel nachweisen. Die Anzahl der Zellen mit rekombinanter DNA nimmt dabei mit Dosis und Dauer der Tamoxifenbehandlung zu [81]. Diese Arbeitsgruppe quantifizierte in einer ihrer Versuchsreihen eine erfolgreiche Rekombination in 65% der Zellen, jedoch wurden für die Tiere der vorliegenden Arbeit sowohl eine höhere Dosis als auch eine durchschnittlich längere Behandlung mit Tamoxifen gewählt. Zusätzlich neigt die quantitative mikroskopische Kontrollmethode zu falsch negativen Ergebnissen, da das Reportergen aufgrund der Eigenschaften seines ROSA26-Promoters möglicherweise nicht in allen rekombinanten Zellen abgelesen wird und somit die Effektivität der Rekombinase unterschätzt wird [34].

Des Weiteren muss die Halbwertszeit der Rezeptoren in Betracht gezogen werden, da die Behandlung mit Tamoxifen keinen Einfluss auf bereits synthetisierte, membranständige M3-Rezeptoren hat. Die Halbwertszeit des endothelialen M3-Rezeptors in der Maus ist nicht bekannt. Einen groben zeitlichen Anhalt geben Studien

zur Rezeptorsynthese: Durch dauerhafte, agonistische Stimulation der muscarinergen Rezeptoren wird eine Minderung der exprimierten Rezeptoren erreicht (um anschließend die Resyntheserate zu beobachten [85]). Die errechnete Halbwertszeit für muscarinerge Rezeptoren im Kükenherz wurde von Halvorsen und Nathanson mit weniger als zwei Stunden angegeben [52], vermutlich handelte es sich hierbei um M1 und M3 Rezeptoren. Da in der vorliegenden Arbeit die Induktionsbehandlung mit Tamoxifen über fünf Tage erfolgte, wäre bei Versuchsbeginn am sechsten Tag und einer Rezeptorhalbwertszeit im einstelligen Stundenbereich quasi ein kompletter Austausch der Rezeptoren erfolgt.

In Zusammenschau erscheint eine inkomplette Deletion nach Tamoxifenbehandlung als die wahrscheinlichste Ursache für die diskrepanten vaskulären Effekte der beiden Deletionsmethoden. Die wenigen verbleibenden Endothelzellen mit M3-Rezeptor können nicht nur über interzelluläre Gap Junctions weitere Endothelzellen über Calciumanstieg aktivieren, sondern insbesondere kann sich in der Mikrozirkulation die Hyperpolarisation im Rahmen des EDHF-Signalwegs im Endothel und in der glatten Muskulatur über interzelluläre Kopplung ausbreiten [16, 28, 37, 63].

Betrachtet man die Restaktivität in den induzierte CreER^{T2} Tieren als Folge unvollständiger Rekombination, so stellt sich unweigerlich die Frage, ob dies nicht auch in den Tie2-Tieren der Fall ist. Generell führt die Tie2 abhängige Induktion aber zu beinahe durchgehender Rekombination, wie mehrere Gruppen anhand unterschiedlicher Reportergene in verschiedenen Gefäßen zeigen konnten [103, 111]. Constien et al. beschreiben gar eine vollständige Penetranz [24]. Zur genauen Beurteilung bedürfte es bei den untersuchten Tieren (welche kein Reportergen besitzen) der Kontrolle durch spezifische Färbungen oder PCR-Analysen von muscarinergen Rezeptoren in Endothelzellen. Die Anfärbung einzelner Rezeptorsubtypen ist aber bis heute nicht sicher möglich, da spezifische Antikörper fehlen [53, 64, 129]. Für PCR-Analysen hingegen muss das Untersuchungsmaterial frei von Verunreinigungen mit anderen Zellarten sein, womit die Materialgewinnung von Endothelzellen aus in vivo Proben schwierig ist. In

dieser Arbeit wurde aufgrund der mangelnden Spezifität der verfügbaren Färbungen und der fehlenden Laborausstattung zur Endothelzellgewinnung auf eine Kontrolle der Expression muscarinerger Rezeptoren in den untersuchten Tieren verzichtet.

In Zusammenschau der beiden Deletionsmethoden und der in der Literatur beschriebenen Ergebnisse ist die Vasodilatation nach Acetylcholingabe von der Dichte an M3-Rezeptor tragenden Zellen abhängig. Ob die bestehende Restaktivität in Tie2-Tieren eine Mitbeteiligung, beispielsweise des M1 Rezeptor impliziert oder Zeichen unvollständiger Deletion ist, kann mit den vorliegenden Daten nicht abschließend geklärt werden. Wahrscheinlicher ist aber die Beteiligung anderer muscarinerger Rezeptoren, vor allem M1, wobei offensichtlich keine kompensatorische Heraufregulation des M1-Rezeptors erfolgt.

4.2.2 Adäquater M3R-Verlust reduziert die Wirksamkeit anderer Vasodilatatoren

Zur Einordnung der Funktion des endothelialen M3-Rezeptors gehört auch die Untersuchung, ob durch den Verlust des Rezeptors Störungen am weiteren Signalweg auftreten und die Effektivität anderer Vasodilatatoren beeinträchtigt wird. In dieser Arbeit wurden daher in denselben Versuchsreihen Konzentrationswirkungskurven weiterer vasoaktiver Substanzen untersucht.

Bradykinin wirkt über endothelständige $G_{q/11}$-Protein gekoppelte B2-Rezeptoren. Der weitere Signalweg wird durch aktivierte $G_{q/11}$ Proteine vermittelt und gleicht daher dem des Acetylcholins. Somit kann durch Bradykinin untersucht werden, ob eine endotheliale Vasodilatation weiterhin möglich ist und ob der Verlust des M3-Rezeptors zur Alterierung des intrazellulären Signalwegs führt.

Die Übermittlung eines vasodilatierenden Signals vom Endothel auf die glatte Muskulatur kann über drei Signalwege erfolgen. Endotheliale NO-Synthasen produzierten Stickstoffmonoxid, welcher in die glatte Muskulatur diffundiert

und dort die lösliche Guanylat-Cyclase aktiviert, wodurch es zur glattmuskulären Dilatation kommt. Der NO-Signalweg ist besonders relevant in großen Arterien. Mit dem NO-Donor Natriumnitroprussid (SNP) kann die NO-Wirkung auf die glatte Muskulatur endothelunabhängig untersucht werden. In der Mikrozirkulation wird die endothelabhängige Vasodilatation jedoch vorrangig durch den noch nicht genau geklärten EDHF-Mechanismus vermittelt [104]. Die Wirkung des EDHF ist abhängig von zwei endothelialen Calcium-gesteuerten Kaliumkanälen, KCa3.1 und KCa2.3 [26], welche durch die Substanz SKA-31 aktiviert werden können [77]. Durch Stimulation des Endothels mit SKA-31 gelingt daher die direkte Simulation des EDHF Signalwegs ohne Beteiligung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren und G-Proteinen. Als dritte Kopplung zwischen Endothel und glatter Muskulatur stehen die Cyclooxygenasen mit den von ihnen produzierten Eikosanoiden zur Verfügung, welche jedoch aufgrund der geringeren Relevanz in der Mikrozirkulation in dieser Arbeit nicht untersucht wurden. Unabhängig vom Endothel besteht die Möglichkeit der direkten Stimulation der glatten Muskelzellen, beispielsweise durch Adenosin. Dieser Signalweg wurde in einigen Protokollen untersucht.

In den CreER^{Tam}-Mäusen war die Wirkung und Effektivität von SNP, Bradykinin und SKA-31 nach Deletion unverändert von den Kontrolltieren. Der Verlust des M3-Rezeptors hat hier also keine Veränderung in der intrazellulären Signalkaskade und der EDHF-mediierten Dilatation ausgelöst. Da SKA-31 nicht wasserlöslich ist, wurde zusätzlich die Wirkung des Lösungvermittlers (Cremophor) untersucht. Cremophor führte selbst in hoher Konzentration nicht zu einem messbaren vaskulären Effekt.

In Tieren mit Verlust des M3-Rezeptors durch die Tie2 kontrollierte Cre-Rekombinase zeigten sich in der Wirkung von Bradykinin, SNP und SKA-31 hingegen mehrere Unterschiede zum Wildtyp. Am auffälligsten war die geringfügige Reduktion der Bradykinin-induzierten Dilatation (um ca. 30%), da dieser Effekt in zwei von drei Konzentrationen zu beobachten war. Ursächlich hierfür kann entweder eine erniedrigte

Rezeptorexpression oder aber eine Beeinträchtigung des intrazellulären Signalwegs sein, welchen sich der Bradykininrezeptor mit dem M3R teilt. Die Beeinflussung der Rezeptorexpression erscheint wenig plausibel, da die maximale Effektivität, aber offensichtlich nicht die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) verändert war. Vielmehr ist denkbar, dass es aufgrund der ausbleibenden Acetylcholin-induzierten Endothelstimulation zu einer Herabregulation des intrazellulären Signalwegs kommt. Die Stimulation des Bradykininrezeptors führt dann eventuell durch Substratmangel zu einem geringer potenzierten Signal als im Wildtyp.

Auch die Wirkung von SKA-31 ist in hoher Konzentration in den rekombinanten Tieren gegenüber dem Wildtyp reduziert. Es lässt sich ebenfalls argumentieren, dass aufgrund fehlender Stimulation durch Acetylcholin die Dichte der Calcium-gesteuerten Kaliumkanäle abnimmt. Somit scheint durch den Verlust der M3-Rezeptoren die EDHF vermittelte Vasodilatation etwas reduziert zu werden.

Schließlich findet sich auch in der Wirkung des SNP ein Unterschied zwischen Wildtyp und M3R-defizienten Tieren. Bei Zugabe von niedrigen SNP Konzentrationen dilatietren die Gefäße der Tiere ohne M3-Rezeptor signifikant weniger, während bei der hohen Konzentration die Dilatation unverändert war. Abermals kann diskutiert werden, ob es mangels physiologischer Stimulation zu einer reduzierten NO-Wirkung kommt, beispielsweise durch Herunterregulation der Guanylat-Cyclase. Die aus der klinischen Versorgung bekannte Nitrattoleranz, welche im Umkehrschluss bei Nitratabstinenz eine verstärkte Wirkung impliziert, basiert allerdings auf Substratmangel der NO-freisetzenden Enzyme, die Wirkung des NO selbst erzeugt keine Toleranz [82].

Die permanente Ausschaltung des M3-Rezeptors scheint daher Mechanismen der Vasodilatation über die Acetylcholinwirkung hinaus einzuschränken. Bei vermeintlich stärkerer Restaktivität des M3-Rezeptors, wie in $CreER^{Tam}$-Tieren, zeigte sich dieser Effekt nicht.

4.3 $G_{q/11}$-Defizienz führt zu reduzierter Vasodilatation

Nach Stimulation der muscarinergen Acetylcholinrezeptoren wird die intrazelluläre Signaltransduktion über G-Proteine aktiviert. Die für die endotheliale Vasodilatation relevanten Subtypen M1, M3 und M5, sowie Rezeptoren anderer vasodilatierender Liganden (beispielsweise Bradykinin und ATP) sind an $G_{q/11}$-Proteine gekoppelt [40, 124]. Für diese Arbeit wurde die Mikrozirkulation in Mäusen mit Defizienz des $G_{q/11}$-Proteins im gleichen experimentellen Aufbau wie für Tiere mit Defizienz des Acetylcholinrezeptors untersucht.

In den $G_{q/11}$-defizienten Tieren zeigte sich nach Acetylcholingabe eine deutlich reduzierte Vasodilatation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Darüberhinaus konnte die verbliebene Vasodilatation nicht durch höhere Acetylcholinkonzentrationen gesteigert werden. Unabhängig davon, ob die Acetylcholinwirkung nur durch den M3-Rezeptor oder auch durch die Rezeptorsubtypen M1 und M5 vermittelt wird, wäre bei Fehlen des koppelnden $G_{q/11}$-Proteins allerdings ein völliges Ausbleiben der Vasodilatation auf Acetylcholin zu erwarten gewesen.

Im Anbetracht der Ergebnisse der M3R-defizienten Tiere, muss daher auch für die Deletion der $G_{q/11}$-Proteine die Möglichkeit der unvollständigen Rekombination in Betracht gezogen werden, wodurch es zu der verbliebenen Dilatation kommen könnte. Des Weiteren ist auch eine Acetylcholinwirkung an anderen Rezeptoren, insbesondere die direkte Stimulation der Acetylcholinrezeptoren der glatten Muskulatur denkbar. Wie bereits diskutiert führt Acetylcholin dort aber üblicherweise zu einer Vasokonstriktion [43, 95], welche in den Versuchsreihen dieser Arbeit nicht zu beobachten war.

Eine weitere mögliche Erklärung für die verbliebene Vasodilatation ist die Signalweiterleitung durch alternative G-Proteine. An GPCR vom $G_{q/11}$ Typ können nicht nur $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ koppeln, sondern auch andere $G\alpha$-Untereinheiten, für die die untersuchten Mäuse nicht defizient waren. Zur Familie der G_q-Proteine gehören

beispielsweise auch die α-Untereinheiten Gα_{14} und Gα_{15}, welche allerdings nur in wenigen Zelltypen synthetisiert werden und bisher nicht im vaskulären System beschrieben wurden. Relevant hingegen sind die Untereinheiten Gα_{12} und Gα_{13}, welche zwar eine eigene Gα-Familie bilden, jedoch aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit durch $G_{q/11}$-koppelnde GPCR aktiviert werden können. Sie kommen wie G$\alpha_{q/11}$ ubiquitär vor. In welchem Umfang spezifische GPCR andere Gα-Untereinheiten aktivieren können, variiert deutlich zwischen den unterschiedlichen Rezeptorgruppen [124]. Im Falle der muscarinergen Acetylcholinrezeptoren erscheint die Signaltransduktion über alternative Gα-Untereinheiten in abgeschwächter Form möglich zu sein.

Betrachtet man die Auswirkungen des $G_{q/11}$-Verlusts auf die Funktion anderer endothelialer $G_{q/11}$ koppelnder Rezeptoren, ergibt sich ein ähnliches Bild. Innerhalb dieser Versuchsreihe wurde aufgrund weiterer Fragestellungen der Arbeitsgruppe ATP statt Bradykinin untersucht. ATP bindet als Ligand an den endothelialen $P2Y_2$-Rezeptor, der über die $G_{q/11}$-Proteine vergleichbar zu den Acetylcholin- und Bradykininrezeptoren ebenfalls zu einer Vasodilatation führt [118]. In Tieren mit Defizienz des $G_{q/11}$ Proteins löste ATP vergleichbar zu Acetylcholin in der Mikrozirkulation eine Vasodilatation aus, welche sich nicht durch Erhöhung der Konzentration steigern ließ. Im Wildtyp nahm die Dilatation hingegen konzentrationsabhängig zu und unterschied sich dadurch in der höchsten Konzentration signifikant von den defizienten Tieren. Durch den $G_{q/11}$ Verlust wird, wie zuvor bei Acetylcholin, die Ligandenwirkung deutlich eingeschränkt aber nicht vollständig aufgehoben. Die möglichen Ursachen hierfür wurden bereits in Bezug auf die Acetylcholinwirkung diskutiert. Denkbar sind wiederum eine inkomplette Deletion des $G_{q/11}$-Proteins oder eine direkte Wirkung von ATP an der glatten Muskulatur (wobei auch bei ATP vorrangig eine Konstriktion zu erwarten wäre [6]). Alternativ bleibt weiterhin die Vermutung, dass andere Gα-Proteine die Funktion des $G_{q/11}$-Proteins in Endothelzellen der Arteriolen partiell übernehmen können.

4.4 Makrohämodynamische Veränderungen

Veränderungen des Gefäßdurchmessers in Arteriolen spielen wegen ihrer Funktion als Widerstandsgefäße eine wichtige Rolle zur Einstellung des arteriellen Blutdrucks. Die Auswirkungen des Verlusts des M3-Rezeptors für die Mikrozirkulation in vivo können daher durch Untersuchung systemischer Kreislaufparameter sinnvoll ergänzt werden und die physiologische Relevanz für das Herzkreislaufsystem dadurch besser beurteilt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde an sechs Tieren der CreER^{Tam} Gruppe für zweimal 24 Stunden eine invasive Blutdruck- und Herzfrequenzmessung durchgeführt und mit sieben Tieren der Kontrollgruppe verglichen. Gemittelt über den gesamten Messzeitraum ergab sich dabei kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Schlüsselt man diese Daten in Tag- und Nachtwerte auf, so ergibt sich ebenfalls kein Unterschied, weder für die aktive Nachtzeit noch für die Ruhephase am Tag. Da Acetylcholin an intakten Arteriolen, wie in den Mikrozirkulationsversuchen gezeigt wurde, zu einer Vasodilatation führt, müsste ein Verlust der muscarinergen Rezeptoren zu einer verminderten Acetylcholinwirkung und damit eher zu einer Gefäßkonstriktion führen. In Betrachtung des gesamten Gefäßsystems würde man in der Folge eine Blutdruckerhöhung erwarten, welche sich in den vorliegenden Daten nicht zeigt.

Obwohl Acetylcholin den Goldstandard zur Charakterisierung der endothelialen Funktion darstellt, so ist dennoch bis heute die Relevanz im Herzkreislaufsystem in vivo kaum erforscht. Es gibt Hinweise darauf, dass Acetylcholin, welches an der (motorischen) Endplatte durch Nervenzellen synthetisiert wurde, auch das Endothel der Arteriolen erreicht und dort über muscarinerge Rezeptoren zu einer Vasodilatation führt [1, 119]. Ob diese Effekte allerdings kreislaufrelevant sind konnte bisher nicht überzeugend dargelegt werden. Die vorliegende Untersuchung zeigt während des Messzeitraums keine Blutdruckänderung, so dass der endotheliale M3 Rezeptor für die Blutdruckregulation

nicht wichtig erscheint. Warum Endothelzellen ACh-Rezeptoren exprimieren, welche zu einer ausgeprägten Dilatation führen, bleibt somit weiterhin unklar.

Wie dargestellt muss zudem davon ausgegangen werden, dass die Tamoxifen-induzierte Ausschaltung des M3 Rezeptors nur partiell effektiv war. Die fehlende Blutdruckänderung in den M3-defizienten Tieren kann daher auch durch eine inkomplette Deletion erklärt werden und die physiologische Rolle der Acetylcholin-induzierten Dilatation kann bei verminderter Rezeptordichte aufrecht erhalten werden.

4.5 Stärken und Schwächen der Untersuchungsmethode:

Die in dieser Arbeit gewählten in vivo Untersuchungsmethoden ermöglichen reale, physiologische Vorgänge experimentell darzustellen und dadurch Rückschlüsse auf die Relevanz des untersuchten M3-Rezeptors und der gekoppelten $G_{q/11}$-Proteine für den lebenden Organismus zu ziehen. Allerdings werden durch den Versuchsaufbau am lebenden Tier die experimentellen Bedingungen im Vergleich zu in vitro Modellen komplexer.

Besonderes Augenmerk in Bezug auf Fehleranfälligkeit während der Versuchsdurchführung gilt der Präparation des M. cremaster und der anschließenden Vitalität des Präparats sowie des Tiers. Trotz vorsichtiger Präparation nach einem festgelegten Standard, kommt es durch die individuelle Anatomie immer zu Abweichungen zwischen den Präparaten. Beispielsweise kann es durch die Fixierung des M. cremaster an den Haltefäden zu unterschiedlicher Spannungsverteilung im Gewebe kommen, welche möglicherweise die Funktion der glatten Gefäßmuskulatur verändert. Ebenso können nicht muskuläre Gewebereste und natürliche Schwankungen der Muskeldicke des Cremasters zu ungleicher Verteilung der in der Superfusion gelösten vasoaktiven Substanzen führen oder die Auswaschung lokal verzögern. Die Methode ist jedoch trotz dieser Einschränkungen seit vielen Jahren etabliert und durch das

Versuchsprotokoll werden die bekannten Fehlerquellen bereits optimiert, beispielsweise durch einen hohen Fluss des Superfusats.

Im Unterschied zum physiologischen Zustand und zu in vitro Versuchen muss bedacht werden, dass die verwendeten Narkotika in geringem Maße vasoaktiv sind und die Untersuchungsergebnisse beeinflussen können.

Die lange Untersuchungsdauer, welche mit jeder getesteten Konzentration weiter zunimmt, kann nicht sinnvoll weiter reduziert werden. In einigen Tieren waren im Untersuchungsverlauf deutliche Flusseinschränkungen oder eine dauerhafte Vasodilatation zu beobachten, die zum Abbruch des Versuchs führten. Durch die limitierte Versuchsdauer ist die Anzahl der Substanzapplikationen begrenzt. So konnten entweder weniger Substanzen oder weniger Konzentrationen getestet werden, wodurch die Aussagekraft mancher Konzentrationswirkungskurven eingeschränkt wird, oder einzelne Substanzen gar nicht erst untersucht wurden.

Die Superfusion des M. cremaster bleibt trotz genauer Kontrolle der Temperatur und des Salz- und Gasgehalts nur eine Imitation des physiologischen Milieus und es ist anzunehmen, dass die Qualität des Präparats im Versuchsverlauf abnimmt. Folge davon sind möglicherweise zu Versuchsbeginn agilere Gefäße und dadurch relevantere Ergebnisse. In der vorliegenden Arbeit wurde auf einen Ausgleich diesen Effekts durch Rotation der Substanzgaben zwischen den Versuchstieren verzichtet, und stattdessen aufgrund der hohen Relevanz für die avisierte Fragestellung immer mit der Konzentrationswirkungskurve von Acetylcholin begonnen. Da die Veränderung der Vasoaktivität durch die Versuchsdauer individuell und nicht quantifizierbar ist, erschien es nicht sinnvoll einen zeitlich berechneten Korrekturwert anzuwenden. Ein solches Vorgehen ist auch bei der Untersuchung und dem Vergleich unterschiedlicher Genotypen, in denen immer jeweils mit Acetylcholin begonnen wurde, nicht notwendig.

4.5.1 Fehlende Charakterisierung der genetischen Ausschaltung

Die in dieser Arbeit untersuchten Tiere wurden anhand des in der Zucht mittels PCR bestimmten Genotyps für die Versuchsdurchführung ausgewählt. Es erfolgte jedoch keine nachträgliche Quantifizierung, in welchem Umfang der tatsächliche Verlust des M3-Rezeptors in den jeweiligen Genotypen einherging. In Anbetracht der Ergebnisse der CreER^{Tam}-Gruppe, welche im Vergleich zu der Tie2-Gruppe eine inkomplette Rekombination implizieren, wäre dies aber besonders wünschenswert gewesen. Aus mehreren Gründen konnten übliche Kontrollmethoden in dieser Studie nicht angewandt werden: An muscarinergen Acetylcholinrezeptoren ist eine spezifische immunohistochemische Anfärbung bisher nicht möglich. Jositsch et al. konnten in einer umfangreichen Untersuchung mit 24 mACh-Rezeptor-Antikörpern keine Unterschiede bezüglich der Bindungsaffinität an die Subtypen feststellen [64]. Auf eine Anfärbung der muscarinergen Rezeptoren mittels der vorhandenen Antikörper wurde aufgrund des mangelnden Erkenntnisgewinns verzichtet, da zu erwarten war, dass die verbliebenen Subtypen weiterhin zur einer Markierung führen würden. Ebenfalls denkbar ist die Erfolgskontrolle mittels quantitativer rtPCR zur Messung der mRNA des M3 Rezeptors. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Genotypen handelt es sich jedoch um endothelspezifische Ausschaltungen, womit die Untersuchung größerer Gewebeproben durch die M3 Rezeptoren anderer Zellen zu falsch positiven Ergebnissen in der PCR führen würde. Die Untersuchung einzelner Endothelzellen als single cell rtPCR wäre wegen des vermuteten Mosaiks ebenfalls nicht aussagekräftig.

Aufgrund der Einschränkungen der konventionellen Kontrollmöglichkeiten, sollten für zukünftige Studien bereits bei Züchtung der Tiere Kontrollmethoden implementiert werden. Eine gute Möglichkeit dafür wären Reportergene, welche erst bei erfolgreicher Rekombination abgelesen werden können und beispielsweise zur Produktion eines spezifisch anfärbbaren Proteins oder aber zur Produktion des grün

fluoreszierenden Proteins (GFP) führen. Dadurch wird eine einfache histologische oder fluoreszensmikroskopische Kontrolle des Rekombinationsergebnisses möglich.

In Anbetracht der Tatsache, dass auch die genetische Rekombination nicht immer zu einer zuverlässige Ausschaltung der muscarinergen Acetylcholinrezeptoren führt, sollten für zukünftige Untersuchungen auch wieder spezifische Antagonisten bedacht werden. Zwar wurde dieser Weg in den 1990er Jahren von den meisten Arbeitsgruppen verlassen, da keine spezifischen Antagonisten für muscarinerge Acetylcholinrezeptoren gefunden werden konnten. Heute gibt es aber vielversprechende Berichte, dass neue Wirkstoffe durchaus in der Lage sind, den M3-Rezeptor in Teilen spezifisch zu antagonisieren. Mit dem Wirkstoff Darifenacin existiert ein, zumindest im Vergleich zum M2-Rezeptor, spezifischer Antagonist des M3-Rezeptors [128]. Dieser ermöglicht zwar keine Unterscheidung zwischen dem M1 und M3 Rezeptor und ist somit für diese Arbeit nicht hilfreich, es ist aber wünschenswert, die durchgeführten Versuche mit zukünftigen besseren Antagonisten zu überprüfen.

4.6 Zukünftige Fragestellungen

Die vorliegende Arbeit unterstreicht die Wichtigkeit des M3 Rezeptors für die endothelabhängige Vasodilatation in der Mikrozirkulation und erweitert damit das Wissen über die muscarinergen Rezeptoren auf die Ebene der Arteriolen. Im Gegensatz zu bisherigen Studien an den großen Arterien, steht in der Mikrozirkulation der EDHF-Weg und nicht die NO-Wirkung bei der Kopplung von Endothelzellen und glatter Gefäßmuskulatur im Vordergrund. Somit zeigen die präsentierten Daten eindrücklich, dass auch die EDHF-mediierte Vasodilatation abhängig vom M3-Rezeptor ist. Entgegen den an großen Arterien gewonnenen Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, führte der Verlust des M3-Rezeptors in dieser Arbeit allerdings nicht zu einer vollständigen Aufhebung der Acetylcholinwirkung, sodass die Wirkung weiterer muscarinerger

Rezeptoren wie beispielsweise des M1 Rezeptors vermutet werden kann. Daraus leiten sich mehrere Fragestellungen für nachfolgende Untersuchungen ab. Primär muss geklärt werden, ob die durchgeführten Deletionsmethoden tatsächlich zu einem kompletten Verlust des endothelialen M3 Rezeptors führen. Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der beiden Deletionsgruppen ist bereits ein deutlicher Hinweis darauf, dass zumindest in der CreER^{Tam}-Gruppe keine vollständige Deletion erfolgte. Hierbei sollten in zukünftige Versuchstiere zusätzliche Reportergene (beispielsweise das grün fluoreszierende Protein) integriert werden, durch die einfache Kontrollen der Deletion ermöglicht werden. Zu erwarten ist auch, dass demnächst zumindest spezifischere Antikörper gegen den M3-Rezeptor erhältlich sein werden, durch die ebenfalls eine Anfärbung möglich wird [50, 102]. Nach Bestätigung der Deletion des M3-Rezeptors sollte untersucht werden, welche Rezeptoren für die verbliebene Restaktivität verantwortlich sind. Eine gute Möglichkeit hierfür bietet die Nutzung von mehrfach deletierten Tieren, mit sowohl eines Verlusts des M3-, als auch des M1- oder M5 Rezeptors.

Die Ausschaltung des M3 Rezeptors erfolgte in dieser Arbeit spezifisch in den Endothelzellen. Es ist somit denkbar, dass Acetylcholin auch direkt an der glatten Gefäßmuskulatur wirken konnte und zu der verbleibenden Dilatation führte. In der Literatur sind dabei bisher unterschiedlich starke Effekte (und teilweise auch Konstriktionen) beschrieben worden. Zwar konnte eine direkte, glattmuskuläre Wirkung des Acetylcholins in der Mikrozirkulation in vivo in einer anderen Studie nicht gezeigt werden [15], allerdings wäre es wünschenswert auch die Genotypen dieser Arbeit daraufhin zu untersuchen. Eine Möglichkeit hierfür ist die pharmakologische Inhibierung der Kopplung zwischen Endothel und glatter Muskulatur durch Blockierung der Calciumabhängigen Kaliumkanäle $K_{Ca}2.3$ und $K_{Ca}3.1$ durch Apamin und Charybdotoxin oder TRAM-34 [20, 35, 84], sowie Hemmung der eNOS und der Cyclooxygenasen

durch L-NNA respektive Indometacin. Die Acetylcholinwirkung sollte dabei ohne und in Anwesenheit der Inhibitoren untersucht werden.

Besondere Relevanz in Hinblick auf die physiologische Bedeutung der Ergebnisse hat die Betrachtung der makrohämodynamischen Funktion. In dieser Arbeit kam es zu keinen signifikanten Effekten, jedoch wurden die Untersuchungen an Tieren der $CreER^{Tam}$-Gruppe durchgeführt mit den oben beschriebenen Einschränkungen. Hier ist eine Wiederholung an Tieren der Tie2Cre-Gruppe besonders wünschenswert und lässt spannende Ergebnisse erwarten. Ergänzend sollte die Aktivität im Laufrad gemessen werden, um Effekte unter körperlicher Belastung besser zu differenzieren als dies durch die grobe Trennung in Tag- und Nachtwerte möglich ist.

Die Untersuchung der Mikrozirkulation in vivo eignet sich hervorragend um die Vasomotorik kleinster Gefäße experimentell darzustellen und zu modulieren. Dadurch konnte in dieser Arbeit die besondere Bedeutung des endothelialen M3 Rezeptors sowie der gekoppelten $G_{q/11}$-Proteine für die acetylcholinabhängige Vasodilatation in Arteriolen eindrucksvoll gezeigt werden. Die physiologische Relevanz der acetylcholininduzierten Vasodilatation im lebenden Organismus bleibt allerdings auch viele Jahre nach den Entdeckungen Furchgotts unklar [115]. Das Modell bietet trotz der dargestellten Schwächen sehr gute Möglichkeiten zur weiteren Differenzierung der Rezeptorfunktion, welche in folgenden Untersuchungen genutzt werden sollten.

5 Zusammenfassung

Muscarinerge Acetylcholinrezeptoren spielen eine zentrale Rolle in der Regulation vaskulärer Motorik. Von den fünf bekannten Subtypen führen die M1, M3 und M5 Rezeptoren nach Aktivierung durch Acetylcholin über die intrazelluläre Kopplung an $G_{q/11}$-Proteine zu einer potenten, endothelabhängigen Vasodilatation. Frühere Untersuchungen ergaben die Vermutung, dass in peripheren Arterien ausschließlich der M3-Rezeptor funktionell relevant ist, jedoch liegen keine Daten für Arteriolen in vivo vor. Die Charakterisierung der Bedeutung der muscarinergen Rezeptoren wird dadurch erschwert, dass aktuell keine pharmakologische Antagonisierung der einzelnen Rezeptorsubtypen möglich ist. Dies kann durch genetisch modifizierte Tiere mit Deletion einzelner Subtypen umgangen werden. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die arterioläre Mikrozirkulation eines Skelettmuskels mittels Intravitalmikroskopie in Mäusen mit genetischer Deletion des M3-Rezeptors dargestellt werden. Die Deletion erfolgte endothelspezifisch mit zwei unterschiedlichen Methoden, einerseits über eine Tamoxifen induzierbare, andererseits durch eine bereits embryonal aktive Cre-Rekombinase. In einem dritten Schritt wurden die Auswirkungen durch den Verlust des nachgeschalteten $G_{q/11}$-Proteins untersucht. Zur Darstellung der makrohämodynamischen Relevanz wurde in Tieren aus der Tamoxifen-Gruppe zusätzlich die Messung von Herzfrequenz und Blutdruck im nicht narkotisierten Tier durchgeführt.

Der Verlust des M3-Rezeptors führte in beiden Gruppen zu einer deutlichen Reduktion der konzentrationsabhängigen Vasodilatation nach Acetylcholin im Vergleich zum

Wildtyp, es blieb jedoch eine Restantwort. Besonders auffällig war die Diskrepanz zwischen den Deletionsmethoden: In Tieren mit Tie2-gesteuerter Cre-Rekombinase war die Acetylcholinwirkung deutlich stärker reduziert und erreichte weniger als ein Drittel der Dilatation im Vergleich zum Wildtyp. Allerdings war auch die Wirkung anderer endothelabhängiger Vasodilatatoren wie Bradykinin in dieser Gruppe reduziert. Die Untersuchung der Makrohämodynamik in Tieren der Tamoxifen-Gruppe zeigte hingegen keine wesentliche Veränderung zu dem untersuchten Wildtyp.

Der Verlust des $G_{q/11}$-Proteins führte analog ebenfalls zu einer Reduktion - jedoch nicht zur Aufhebung der Acetylcholinwirkung, sowie in geringerem Maße zu einer Einschränkung weiterer $G_{q/11}$-Protein abhängiger Vasodilatatoren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die Dominanz des M3 Rezeptors in der Vermittlung endothelialer Vasodilatation durch Acetylcholin und seiner Abhängigkeit von $G_{q/11}$-Proteinen erstmals auch für die arterioläre Mikrozirkulation. Im Vergleich zu den großen Arterien erfolgt die Kopplung zwischen Endothel und glatter Gefäßmuskulatur in der Mikrozirkulation nicht durch NO und Prostaglandinen, sondern beinahe ausschließlich durch EDHF. Somit ist der M3 Rezeptor ein potenter Aktivator der endothelialen Hyperpolarisation und der daraus resultierenden Vasodilatation. Da Atropin die Acetylcholinwirkung vollständig aufhebt, impliziert die inkomplette Inhibierung in den untersuchten M3-defizienten Tieren eine Beteiligung anderer Rezeptorsubtypen (zum Beispiel M1). Diese wurde für größere Arterien durch frühere Studien weitestgehend ausgeschlossen. In Anbetracht der zwischen den Genotypen variierenden Ergebnissen sollte der Erfolg der Deletion in zukünftigen Untersuchungen durch Färbemethoden kontrolliert werden. Um Aussagen über die physiologische Bedeutung Acetylcholins und der muscarinergen Rezeptoren zu erhalten, sollte zudem die Makrohämodynamik erneut in Tieren mit gesicherter Deletion untersucht werden.

Literaturverzeichnis

[1] R. Andriantsitohaina und A. Surprenant. „Acetylcholine released from guinea-pig submucosal neurones dilates arterioles by releasing nitric oxide from endothelium.“ In: *The Journal of Physiology* 453.1 (1992), S. 493–502.

[2] J. A. Angus und T. M. Cocks. „Endothelium-derived relaxing factor.“ In: *Pharmacology & therapeutics* 41.1-2 (1989), S. 303–52.

[3] S. Baez. „An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy.“ In: *Microvascular research* 5.3 (1973), S. 384–94.

[4] D. J. Beech. „Endothelial Piezo1 channels as sensors of exercise“. In: *Journal of Physiology* 596.6 (2018), S. 979–984.

[5] J. C. Behrends, J. Bischofberger, R. Deutzmann, H. Ehmke, S. Frings, S. Grissmer, M. Hoth, A. Kurtz, J. Leipziger, F. Müller, C. Pedain, J. Rettig, C. Wagner und E. Wischmeyer. *Duale Reihe Physiologie, Kapitel 5 Blutkreislauf, S. 111ff*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2010.

[6] C. D. Benham. „ATP-gated channels in vascular smooth muscle cells“. In: *Ann N Y Acad Sci* 603 (1990), S. 275–276.

[7] J.-L. Bény, M. N. Nguyen, M. Marino und M. Matsui. „Muscarinic receptor knockout mice confirm involvement of M3 receptor in endothelium-dependent vasodilatation in mouse arteries.“ In: *Journal of cardiovascular pharmacology* 51.5 (2008), S. 505–12.

[8] G. Berstein, J. L. Blank, A. V. Smrcka, T. Higashijima, P. C. Sternweis, J. H. Exton und E. M. Ross. „Reconstitution of agonist-stimulated phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis using purified m1 muscarinic receptor, Gq/11, and phospholipase C-b1“. In: *Journal of Biological Chemistry* 267.12 (1992), S. 8081–8088.

[9] G. H. Biddlecome, G. Berstein und E. M. Ross. „Regulation of phospholipase C-beta1 by Gq and m1 muscarinic cholinergic receptor. Steady-state balance of receptor-mediated activation and GTPase-activating protein-promoted deactivation.“ In: *The Journal of biological chemistry* 271.14 (1996), S. 7999–8007.

[10] N. J. Birdsall, E. C. Hulme, J. Stockton, A. S. Burgen, C. P. Berrie, R. Hammer, E. H. Wong und M. J. Zigmond. „Muscarinic receptor subclasses: evidence from binding studies.“ In: *Advances in biochemical psychopharmacology* 37 (1983), S. 323–9.

[11] M. Boettcher und C. De Wit. „Distinct endothelium-derived hyperpolarizing factors emerge in vitro and in vivo and are mediated in part via connexin 40-dependent myoendothelial coupling“. In: *Hypertension* 57.4 (2011), S. 802–808.

[12] T. B. Bolton, R. J. Lang und T. Takewaki. „Mechanisms of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery.“ In: *The Journal of physiology* 351 (1984), S. 549–572.

[13] T. I. Bonner, N. J. Buckley, a. C. Young und M. R. Brann. „Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes.“ In: *Science (New York, N.Y.)* 237.4814 (1987), S. 527–532.

[14] T. I. Bonner, a. C. Young, M. R. Brann und N. J. Buckley. „Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes.“ In: *Neuron* 1.5 (1988), S. 403–10.

[15] S. Brähler, A. Kaistha, V. J. Schmidt, S. E. Wölfle, C. Busch, B. P. Kaistha, M. Kacik, A. L. Hasenau, I. Grgic, H. Si, C. T. Bond, J. P. Adelman, H. Wulff, C. De Wit, J. Hoyer und R. Köhler. „Genetic deficit of SK3 and IK1 channels disrupts the endothelium-deerived hyperpolarizing factor vasodilator pathway and causes hypertension“. In: *Circulation* 119.17 (2009), S. 2323–2332.

[16] J. C. Brasen, C. de Wit und C. M. Sorensen. „Myoendothelial coupling through Cx40 contributes to EDH-induced vasodilation in murine renal arteries: evidence from experiments and modelling“. In: *Acta Physiologica* 222.1 (2018), S. 1–12.

[17] C. van Breemen und K. Saida. „Cellular mechanisms regulating [Ca2+]i smooth muscle.“ In: *Annual review of physiology* 51.23 (1989), S. 315–29.

[18] F. Brunner, E. Kühberger, K. Groschner, G. Poch und W. R. Kukovetz. „Characterization of muscarinic receptors mediating endothelium-dependent relaxation of bovine coronary artery“. In: *European Journal of Pharmacology* 200.1 (1991), S. 25–33.

[19] E. Bungardt, E. Vockert, R. Feifel, U. Moser, R. Tacke, E. Mutschler, G. Lambrecht und A. Surprenant. „Characterization of muscarinic receptors mediating vasodilation in guinea-pig ileum submucosal arterioles by the use of computer-assisted videomicroscopy“. In: *European Journal of Pharmacology* 213.1 (1992), S. 53–61.

[20] R. Busse, G. Edwards, M. Félétou, I. Fleming, P. M. Vanhoutte und A. H. Weston. „EDHF: Bringing the concepts together“. In: *Trends in Pharmacological Sciences* 23.8 (2002), S. 374–380.

[21] M. P. Caulfield und N. J. Birdsall. „International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors.“ In: *Pharmacological reviews* 50.2 (1998), S. 279–290.

[22] M. P. Caulfield. „Muscarinic Receptors-Characterization, coupling and function“. In: *Pharmacology and Therapeutics* 58.3 (1993), S. 319–379.

[23] D. E. Clapham und E. J. Neer. „G protein beta gamma subunits.“ In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 37 (1997), S. 167–203.

[24] R. Constien, A. Forde, B. Liliensiek, H. J. Gröne, P. Nawroth, G. Hämmerling und B. Arnold. „Characterization of a novel EGFP reporter mouse to monitor Cre recombination as demonstrated by a Tie2 Cre mouse line.“ In: *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* 30.1 (2001), S. 36–44.

[25] H. H. Dale. „The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine“. In: *American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* 6.2 (1914), S. 147–190.

[26] M. Damkjaer, G. Nielsen, S. Bodendiek, M. Staehr, J. B. Gramsbergen, C. De Wit, B. L. Jensen, U. Simonsen, P. Bie, H. Wulff und R. Köhler. „Pharmacological activation of KCa3.1/KCa2.3 channels produces endothelial hyperpolarization and lowers blood pressure in conscious dogs“. In: *British Journal of Pharmacology* 165.1 (2012), S. 223–234.

[27] F. Dauphin und E. Hamel. „Muscarinic receptor subtype mediating vasodilation in feline middle cerebral artery exhibits M3 pharmacology“. In: *European Journal of Pharmacology* 178.2 (1990), S. 203–213.

[28] C. De Wit, F. Roos, S. S. Bolz, S. Kirchhoff, O. Krüger, K. Willecke und U. Pohl. „Impaired conduction of vasodilation along arterioles in connexin40- deficient mice“. In: *Circulation Research* 86.6 (2000), S. 649–655.

[29] G. B. Downes und N. Gautam. „The G protein subunit gene families.“ In: *Genomics* 62.3 (1999), S. 544–552.

[30] S. P. Duckles. „Vascular muscarinic receptors: pharmacological characterization in the bovine coronary artery.“ In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 246.3 (1988), S. 929–34.

[31] R. M. Eglen, S. S. Hegde und N. Watson. „Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function.“ In: *Pharmacological reviews* 48.4 (1996), S. 531–65.

[32] R. M. Eglen und R. L. Whiting. „Heterogeneity of vascular muscarinic receptors“. In: *Journal of Autonomic Pharmacology* 10.4 (1990), S. 233–246.

[33] F. M. Faraci und C. D. Sigmund. „Vascular biology in genetically altered mice : smaller vessels, bigger insight.“ In: *Circulation research* 85.12 (1999), S. 1214–25.

[34] S. Feil, N. Valtcheva und R. Feil. „Inducible Cre mice.“ In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 530.February (2009), S. 343–63.

[35] M. Félétou, J. R. Falck, P. M. Vanhoutte, A. H. Weston, G. Edwards und P. Gluais. „ Role of SK Ca and IK Ca in endothelium-dependent hyperpolarizations of the guinea-pig isolated carotid artery “. In: *British Journal of Pharmacology* 144.4 (2005), S. 477–485.

[36] M. Félétou und P. M. Vanhoutte. „EDHF: an update.“ In: *Clinical science (London, England)* 117.4 (2009), S. 139–55.

[37] M. Félétou und P. M. Vanhoutte. „Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now?“ In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26.6 (2006), S. 1215–25.

[38] F. A. Fernándes, J. AMarín und M. Salaices. „M3-Muscarinic Receptor Mediates Prejunctional Inhibition of Noradrenaline Release and the Relaxation in Cat Femoral Artery“. In: *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 43.9 (1991), S. 644–649.

[39] C. D. Figueroa, A. Marchant, U. Novoa, U. Förstermann, K. Jarnagin, B. Schölkens und W. Müller-Esterl. „Differential Distribution of Bradykinin B(2) Receptors in the Rat and Human Cardiovascular System.“ In: *Hypertension* 37.1 (2001), S. 110–120.

[40] B. B. Fredholm, M. P. Abbracchio, G. Burnstock, G. R. Dubyak, T. K. Harden, K. A. Jacobson, U. Schwabe und M. Williams. „Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors.“ In: *Trends in pharmacological sciences* 18.3 (1997), S. 79–82.

[41] R. Fredriksson und H. B. Schio. „The Repertoire of G-Protein – Coupled Receptors in Fully“. In: *Molecular Pharmacology* 67.5 (2005), S. 1414–1425.

[42] R. F. Furchgott. „The Role of Endothelium in the Responses of Vascular Smooth Muscle to Drugs“. In: *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol* 24.6 (1984), S. 175–197.

[43] R. F. Furchgott und J. V. Zawadzki. „The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.“ In: *Nature* 288.5789 (1980), S. 373–376.

[44] K. Fuxe und G. Sedvall. „The Distribution of Adrenergic Nerve Fibres to the Blood Vessels in Skeletal Muscle“. In: *Acta Physiologica Scandinavica* 64.1-2 (1965), S. 75–86.

[45] G. Gabella. „Structural apparatus for force transmission in smooth muscles.“ In: *Physiological reviews* 64.2 (1984), S. 455–477.

[46] C. J. Garland und G. A. McPherson. „Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery.“ In: *British journal of pharmacology* 105.2 (1992), S. 429–35.

[47] C. J. Garland und K. A. Dora. „EDH: endothelium-dependent hyperpolarization and microvascular signalling“. In: *Acta Physiologica* 219.1 (2017), S. 152–161.

[48] A. Gericke, V. G. A. Mayer, A. Steege, A. Patzak, U. Neumann, F. H. Grus, S. C. Joachim, L. Choritz, J. Wess und N. Pfeiffer. „Cholinergic responses of ophthalmic arteries in M3 and M5 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice“. In: *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 50.10 (2009), S. 4822–4827.

[49] A. Gericke, J. J. Sniatecki, V. G. A. Mayer, E. Goloborodko, A. Patzak, J. Wess, N. Pfeiffer, J. Wess und N. Pfeiffer. „Role of M 1 , M 3 , and M 5 muscarinic acetylcholine receptors in cholinergic dilation of small arteries studied with gene-targeted mice“. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 300 (2011), H1602–H1608.

[50] S. Grol, C. J. Nile, P. Martinez-Martinez, G. van Koeveringe, S. de Wachter, J. de Vente und J. I. Gillespie. „M3 muscarinic receptor-like immunoreactivity in sham operated and obstructed guinea pig bladders.“ In: *The Journal of urology* 185.5 (2011), S. 1959–66.

[51] P.-J. D. F. Guns, A. Korda, H. M. Crauwels, T. Van Assche, B. Robaye, J.-M. Boeynaems und H. Bult. „Pharmacological characterization of nucleotide P2Y receptors on endothelial cells of the mouse aorta“. In: *British Journal of Pharmacology* 146.2 (2009), S. 288–295.

[52] S. W. Halvorsen und N. M. Nathanson. „In vivo regulation of muscarinic acetylcholine receptor number and function in embryonic chick heart“. In: *Journal of Biological Chemistry* 256.15 (1981), S. 7941–7948.

[53] S. E. Hamilton, M. D. Loose, M. Qi, A. I. Levey, B. Hille, G. S. McKnight, R. L. Idzerda und N. M. Nathanson. „Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94.24 (1997), S. 13311–13316.

[54] G. Hansmann, R. Bültmann, F. Tuluc und K. Starke. „Characterization by antagonists of P2-receptors mediating endothelium-dependent relaxation in the rat aorta.“ In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 356.5 (1997), S. 641–52.

[55] C. Heeschen, M. Weis, A. Aicher, S. Dimmeler und J. P. Cooke. „A novel angiogenic pathway mediated by non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors“. In: *Journal of Clinical Investigation* 110.4 (2002), S. 527–536.

[56] J. R. Hepler und a. G. Gilman. „G proteins.“ In: *Trends in biochemical sciences* 17.October (1992), S. 383–387.

[57] J. R. Hepler, G. H. Biddlecome, C. Kleuss, L. A. Camp, S. L. Hofmann, E. M. Ross und A. G. Gilman. „Functional importance of the amino terminus of Gq??“ In: *Journal of Biological Chemistry* 271.1 (1996), S. 496–504.

[58] A. J. Hobbs. „Soluble guanylate cyclase: The forgotten sibling“. In: *Trends in Pharmacological Sciences* 18.12 (1997), S. 484–486.

[59] E. C. Hulme, N. J. Birdsall und N. J. Buckley. „Muscarinic receptor subtypes.“ In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 30 (1990), S. 633–73.

[60] M. R. Hynes, W. Banner, H. I. Yamamura und S. P. Duckles. „Characterization of muscarinic receptors of the rabbit ear artery smooth muscle and endothelium.“ In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 238.1 (1986), S. 100–5.

[61] W. F. Jackson. „Boosting the signal: Endothelial inward rectifier K+channels“. In: *Microcirculation* 24.3 (2017), S. 1–21.

[62] J. M. Janz und D. L. Farrens. „Rhodopsin activation exposes a key hydrophobic binding site for the transducin alpha-subunit C terminus“. In: *Journal of Biological Chemistry* 279.28 (2004), S. 29767–29773.

[63] A. Jobs, K. Schmidt, V. J. Schmidt, I. Lübkemeier, T. A. van Veen, A. Kurtz, K. Willecke und C. de Wit. „Defective Cx40 Maintains Cx37 Expression but Intact Cx40 Is Crucial for Conducted Dilations Irrespective of Hypertension“. In: *Hypertension* 60.6 (2012), S. 1422–1429.

[64] G. Jositsch, T. Papadakis, R. V. Haberberger, M. Wolff, J. Wess und W. Kummer. „Suitability of muscarinic acetylcholine receptor antibodies for immunohistochemistry evaluated on tissue sections of receptor gene-deficient mice.“ In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 379.4 (2009), S. 389–95.

[65] P. Kameritsch, K. Pogoda, A. Ritter, S. Münzing und U. Pohl. „Gap junctional communication controls the overall endothelial calcium response to vasoactive agonists“. In: *Cardiovascular Research* 93.3 (2012), S. 508–515.

[66] K. E. Kamm und J. T. Stull. „The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle.“ In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 25.25 (1985), S. 593–620.

[67] A. Kapela, E. J. Behringer, S. S. Segal und N. M. Tsoukias. „Biophysical properties of microvascular endothelium: Requirements for initiating and conducting electrical signals“. In: *Microcirculation* 25.2 (2018), S. 1–15.

[68] R. Khaddaj-Mallat, C. Mathew John und A. P. Braun. „SKA-31, an activator of endothelial Ca2+-activated K+ channels evokes robust vasodilation in rat mesenteric arteries.“ In: *European journal of pharmacology* 831 (2018), S. 60–67.

[69] T. Kitazono, Y. Kansui, T. Seki, K. Kiyohara, Y. Haga, T. Ohtsubo, K. Goto, N. Murakami und K. Matsumura. „ Downregulation of Endothelial Transient Receptor Potential Vanilloid Type 4 Channel and Small-Conductance of Ca 2+ -Activated K + Channels Underpins Impaired Endothelium-Dependent Hyperpolarization in Hypertension “. In: *Hypertension* 69.1 (2016), S. 143–153.

[70] T. Kleppisch und M. T. Nelson. „Adenosine activates ATP-sensitive potassium channels in arterial myocytes via A2 receptors and cAMP-dependent protein kinase.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92.26 (1995), S. 12441–12445.

[71] E. A. Kowaluk, P. Seth und H. L. Fung. „Metabolic activation of sodium nitroprusside to nitric oxide in vascular smooth muscle.“ In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 262.3 (1992), S. 916–922.

[72] W. R. Kukovetz, S. Holzmann, A. Wurm und G. Pöch. „Prostacyclin increases cAMP in coronary arteries.“ In: *Journal of cyclic nucleotide research* 5.6 (1979), S. 469–76.

[73] K. G. Lamping, J. Wess, Y. Cui, D. W. Nuno und F. M. Faraci. „Muscarinic (M) receptors in coronary circulation: Gene-targeted mice define the role of M2 and M3 receptors in response to acetylcholine“. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24.7 (2004), S. 1253–1258.

[74] A. J. A. Leloup, C. E. Van Hove, A. Heykers, D. M. Schrijvers, G. R. Y. De Meyer und P. Fransen. „Elastic and muscular arteries differ in structure, basal NO production and voltage-gated Ca2+-channels“. In: *Frontiers in Physiology* 6.DEC (2015), S. 1–9.

[75] S. W. Leung und P. M. Vanhoutte. „Endothelium-dependent hyperpolarization: age, gender and blood pressure, do they matter?“ In: *Acta Physiologica* 219.1 (2017), S. 108–123.

[76] K. D. Macklin, a. D. Maus, E. F. Pereira, E. X. Albuquerque und B. M. Conti-Fine. „Human vascular endothelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors.“ In: *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 287.1 (1998), S. 435–9.

[77] R. C. Mishra, J. R. Mitchell, C. Gibbons-Kroeker, H. Wulff, I. Belenkie, J. V. Tyberg und A. P. Braun. „A pharmacologic activator of endothelial KCa channels increases systemic conductance and reduces arterial pressure in an anesthetized pig model“. In: *Vascular Pharmacology* 79 (2016), S. 24–31.

[78] J. V. Mombouli, I. Bissiriou, V. D. Agboton und P. M. Vanhoutte. „Bioassay of endothelium-derived hyperpolarizing factor.“ In: *Biochemical and biophysical research communications* 221.2 (1996), S. 484–8.

[79] J. V. Mombouli und P. M. Vanhoutte. „Kinins and endothelial control of vascular smooth muscle.“ In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 35 (1995), S. 679–705.

[80] J. V. Mombouli und P. M. Vanhoutte. „Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): Updating the unknown“. In: *Trends in Pharmacological Sciences* 18.7 (1997), S. 252–256.

[81] A. Monvoisin, J. A. Alva, J. J. Hofmann, A. C. Zovein, T. F. Lane und M. L. Iruela-Arispe. „VE-cadherin-CreERT2 transgenic mouse: A model for inducible recombination in the endothelium“. In: *Developmental Dynamics* 235.12 (2006), S. 3413–3422.

[82] T. Münzel, A. Daiber und A. Mülsch. „Explaining the phenomenon of nitrate tolerance“. In: *Circulation Research* 97.7 (2005), S. 618–628.

[83] C. L. Murrant, I. R. Lamb und N. M. Novielli. „Capillary endothelial cells as coordinators of skeletal muscle blood flow during active hyperemia“. In: *Microcirculation* 24.3 (2017), S. 1–10.

[84] J. S. Naik und B. R. Walker. „Endothelial-dependent dilation following chronic hypoxia involves TRPV4-mediated activation of endothelial BK channels“. In: *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 470.4 (2018), S. 633–648.

[85] N. M. Nathanson. „Synthesis, trafficking, and localization of muscarinic acetylcholine receptors“. In: *Pharmacology & Therapeutics* 119.1 (2008), S. 33–43.

[86] M. T. Nelson, Y. Huang, J. E. Brayden, J. Hescheler und N. B. Standen. *Arterial dilations in response to calcitonin gene-related peptide involve activation of K+ channels.* 1990.

[87] M. T. Nelson, J. B. Patlak, J. F. Worley und N. B. Standen. „Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone.“ In: *The American journal of physiology* 259.1 Pt 1 (1990), S. C3–C18.

[88] S. Offermanns, E. Heiler, K. Spicher und G. Schultz. „Gq and G11 are concurrently activated by bombesin and vasopressin in Swiss 3T3 cells“. In: *FEBS Letters* 349.2 (1994), S. 201–204.

[89] W. M. Oldham und H. E. Hamm. „How do Receptors Activate G Proteins?“ In: *Advances in Protein Chemistry* 74.07 (2007), S. 67–93.

[90] E. M. Parker, K. Kameyama, T. Higashijima und E. M. Ross. „Reconstitutively active G protein-coupled receptors purified from baculovirus-infected insect cells“. In: *Journal of Biological Chemistry* 266.1 (1991), S. 519–527.

[91] L. R. Pelc, G. J. Gross und D. C. Warltier. „Mechanism of coronary vasodilation produced by bradykinin“. In: *Circulation* 83.6 (1991), S. 2048–2056.

[92] G. Pfitzer. „Signal Transduction in Smooth Muscle: Invited Review: Regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle“. In: *J Appl Physiol* 91.1 (2001), S. 497–503.

[93] U. Pohl, J. Holtz, R. Busse und E. Bassenge. „Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo“. In: *Hypertension* 8 (1986), S. 37–44.

[94] B. M. Radu, A. M. M. Osculati, E. Suku, A. Banciu, G. Tsenov, F. Merigo, M. Di Chio, D. D. Banciu, C. Tognoli, P. Kacer, A. Giorgetti, M. Radu, G. Bertini und P. F. Fabene. „All muscarinic acetylcholine receptors (M1-M5) are expressed in murine brain microvascular endothelium“. In: *Scientific Reports* 7.1 (2017), S. 1–15.

[95] L. M. Ren, T. Nakane und S. Chiba. „Muscarinic receptor subtypes mediating vasodilation and vasoconstriction in isolated, perfused simian coronary arteries.“ In: *Journal of cardiovascular pharmacology* 22.6 (1993), S. 841–6.

[96] S. G. Rhee. „Regulation of Phosphoinositide-Specific Phospholipase C*“. In: *Annual Review of Biochemistry* 70.1 (2001), S. 281–312.

[97] W. I. Rosenblum. „Endothelial dependent relaxation demonstrated in vivo in cerebral arterioles“. In: *Stroke* 17.3 (1986), S. 494–497.

[98] W. I. Rosenblum, G. H. Nelson und J. T. Povlishock. „Laser-induced endothelial damage inhibits endothelium-dependent relaxation in the cerebral microcirculation of the mouse.“ In: *Circulation research* 60.2 (1987), S. 169–176.

[99] Y. Saito, T. Yamagishi, T. Nakamura, Y. Ohyama, H. Aizawa, T. Suga, Y. Matsumura, H. Masuda, M. Kurabayashi, M. Kuro-o, Y. Nabeshima und R. Nagai. „Klotho protein protects against endothelial dysfunction.“ In: *Biochemical and biophysical research communications* 248.2 (1998), S. 324–9.

[100] B. Saltin, G. Rådegran, M. D. Koskolou und R. C. Roach. „Skeletal muscle blood flow in humans and its regulation during exercise“. In: *Acta Physiologica Scandinavica* 162.3 (1998), S. 421–436.

[101] A. Sankaranarayanan, G. Raman, C. Busch, T. Schultz, P. I. Zimin, J. Hoyer, R. Köhler und H. Wulff. „Naphtho[1,2-d]thiazol-2-ylamine (SKA-31), a new activator of KCa2 and KCa3.1 potassium channels, potentiates the endothelium-derived hyperpolarizing factor response and lowers blood pressure.“ In: *Molecular pharmacology* 75.2 (2009), S. 281–95.

[102] H. C. Saternos, D. A. Almarghalani, H. M. Gibson, M. A. Meqdad, R. B. Antypas, A. Lingireddy und W. A. AbouAlaiwi. „Distribution and function of the muscarinic receptor subtypes in the cardiovascular system“. In: *Physiological Genomics* 50.1 (2018), S. 1–9.

[103] T. M. Schlaeger, S. Bartunkova, J. A. Lawitts, G. Teichmann, W. Risau, U. Deutsch und T. N. Sato. „Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94.7 (1997), S. 3058–63.

[104] H. Shimokawa, H. Yasutake, K. Fujii, M. K. Owada, R. Nakaike, Y. Fukumoto, T. Takayanagi, T. Nagao, K. Egashira, M. Fujishima und A. Takeshita. „The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation.“ In: *Journal of cardiovascular pharmacology* 28.5 (1996), S. 703–11.

[105] J. C. Shryock und L. Belardinelli. „Adenosine and Adenosine Receptors in the Cardiovascular System: Biochemistry, Physiology, and Pharmacology“. In: *The American Journal of Cardiology* 79.12 (1997), S. 2–10.

[106] M. I. Simon, M. P. Strathmann und N. Gautam. „Diversity of G proteins in signal transduction.“ In: *Science (New York, N.Y.)* 252.5007 (1991), S. 802–8.

[107] A. P. Somlyo, X. Wu, L. A. Walker und A. V. Somlyo. „Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases.“ In: *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 134 (1999), S. 201–34.

[108] A. P. Somlyo und A. V. Somlyo. „Signal transduction and regulation in smooth muscle.“ In: *Nature* 372.6503 (1994), S. 231–236.

[109] R. Tabrizchi und S. Bedi. „Pharmacology of adenosine receptors in the vasculature“. In: *Pharmacology and Therapeutics* 91.2 (2001), S. 133–147.

[110] P. Tangsucharit, S. Takatori, Y. Zamami, M. Goda, P. Pakdeechote, H. Kawasaki und F. Takayama. „Muscarinic acetylcholine receptor M1 and M3 subtypes mediate acetylcholine-induced endothelium-independent vasodilatation in rat mesenteric arteries“. In: *Journal of Pharmacological Sciences* 130.1 (2016), S. 24–32.

[111] M. Theis, C. de Wit, T. M. Schlaeger, D. Eckardt, O. Krüger, B. Döring, W. Risau, U. Deutsch, U. Pohl und K. Willecke. „Endothelium-specific replacement of the connexin43 coding region by a lacZ reporter gene.“ In: *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* 29.1 (2001), S. 1–13.

[112] W. R. Tracey und M. J. Peach. „Differential muscarinic receptor mRNA expression by freshly isolated and cultured bovine aortic endothelial cells.“ In: *Circulation research* 70.2 (1992), S. 234–40.

[113] M. Tsukada und S. Chiba. „Bradykinin-induced vascular responses in dog isolated lingual artery“. In: *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 26.5-6 (1999), S. 456–460.

[114] P. M. Vanhoutte. „'Endothelium-derived relaxing and contracting factors“'. In: *European Journal of Pharmacology* 183.6 (1990), S. 2088–2089.

[115] P. M. Vanhoutte, H. Shimokawa, M. Feletou und E. H. Tang. „Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th anniversary update“. In: *Acta Physiologica* 219.1 (2017), S. 22–96.

[116] S. A. Waldman und F. Murad. „Cyclic GMP synthesis and function.“ In: *Pharmacological reviews* 39.3 (1987), S. 163–96.

[117] L. Wang, L. Karlsson, S. Moses, A. Hultgårdh-Nilsson, M. Andersson, C. Borna, T. Gudbjartsson, S. Jern und D. Erlinge. „P2 receptor expression profiles in human vascular smooth muscle and endothelial cells“. In: *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 40.6 (2002), S. 841–853.

[118] S. Wang, A. Iring, B. Strilic, J. Albarrán Juárez, H. Kaur, K. Troidl, S. Tonack, J. C. Burbiel, C. E. Müller, I. Fleming, J. O. Lundberg, N. Wettschureck und S. Offermanns. „$P2Y_2$ and Gq/G_{11} control blood pressure by mediating endothelial mechanotransduction.“ In: *The Journal of clinical investigation* 125.8 (2015), S. 3077–86.

[119] D. G. Welsh und S. S. Segal. „Coactivation of resistance vessels and muscle fibers with acetylcholine release from motor nerves.“ In: *The American journal of physiology* 273.1 Pt 2 (1997), H156–63.

[120] J. Wess. „Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors.“ In: *Critical reviews in neurobiology* 10.1 (1996), S. 69–99.

[121] J. Wess. „Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function.“ In: *Trends in pharmacological sciences* 14.8 (1993), S. 308–13.

[122] J. Wess. „Muscarinic Acetylcholine Receptor Knockout Mice: Novel Phenotypes and Clinical Implications“. In: *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 44.1 (2004), S. 423–450.

[123] J. Wess, D. Gdula und M. R. Brann. „Site-directed mutagenesis of the m3 muscarinic receptor: identification of a series of threonine and tyrosine residues involved in agonist but not antagonist binding.“ In: *The EMBO journal* 10.12 (1991), S. 3729–3734.

[124] N. Wettschureck und S. Offermanns. „Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions“. In: *Physilological Review* (2005), S. 1159–1204.

[125] A.-K. Wihlborg, M. Malmsjö, A. Eyjolfsson, R. Gustafsson, K. Jacobson und D. Erlinge. „Extracellular nucleotides induce vasodilatation in human arteries via prostaglandins, nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarising factor“. In: *British Journal of Pharmacology* 138.8 (2003), S. 1451–1458.

[126] T. M. Wilkie, P. a. Scherle, M. P. Strathmann, V. Z. Slepak und M. I. Simon. „Characterization of G-protein alpha subunits in the Gq class: expression in murine tissues and in stromal and hematopoietic cell lines.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88.22 (1991), S. 10049–10053.

[127] M. Yamada, K. G. Lamping, A. Duttaroy, W. Zhang, Y. Cui, F. P. Bymaster, D. L. McKinzie, C. C. Felder, C. X. Deng, F. M. Faraci und J. Wess. „Cholinergic dilation of cerebral blood vessels is abolished in M(5) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98.24 (2001), S. 14096–101.

[128] S. Yamada, S. Maruyama, Y. Takagi, S. Uchida und T. Oki. „In vivo demonstration of M3 muscarinic receptor subtype selectivity of darifenacin in mice“. In: *Life Sciences* 80.2 (2006), S. 127–132.

[129] W. Zhang, A. S. Basile, J. Gomeza, L. A. Volpicelli, A. I. Levey und J. Wess. „Characterization of central inhibitory muscarinic autoreceptors by the use of muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice.“ In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22.5 (2002), S. 1709–1717.

[130] Q. Zou, S. W. S. Leung und P. M. Vanhoutte. „Activation of Nicotinic Receptors Can Contribute to Endothelium-Dependent Relaxations to Acetylcholine in the Rat Aorta“. In: *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 341.3 (2012), S. 756–763.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Jakob Speiser, an Eides statt, dass ich die Dissertation mit dem Titel: „Charakterisierung endothelabhängiger arteriolärer Dilatationen in vivo und des Blutdrucks in der Maus nach Deletion des muscarinergen Rezeptors M3 oder des G-Proteins $G_{q/11}$ im Endothel“ selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel habe ich nicht benutzt. Die den herangezogenen Werken wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Hamburg, 22.03.2019 Jakob Speiser

Anhang

Tierschutz

Die Versuchsdurchführung erfolgte nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes und war durch das Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung des Landes Schleswig-Holstein genehmigt worden (V242.7224.122-2).

Datum der Versuchsgenehmigung:

A: 06.11.2014 und Modifikation vom 09.03.2015.

B: 30.03.2011 und Verlängerung vom 23.03.2015.

Verwendete Substanzen und Lösungen

Substanz	**Hersteller**
Acetylcholin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Adenosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Adenosintriphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Atropin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bradykinin	Bachem AG, Bubendorf, Schweiz
Cremophor	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fentanyl	Mepha Pharma AG, Basel, Schweiz
Gasgemisch 95% N_2, 5% CO_2	Linde AG, Pullach
Medetomidin	Zoetis Deutschland GmbH, Berlin
Midazolam	Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen
Nitroprussid-Natrium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pentobarbital	Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein
Salze (siehe Krebslösung)	Merck KGaA, Darmstadt
SKA-31	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Entionisiertes Wasser	SG-Reinstwassersystem Typ RS 90-4/US, Hamburg

Lösung	**Zusammensetzung**
Krebslösung	143mmol/L Na^+
(Salze gelöst in entionisiertem Wasser)	6mmol/L K^+
	2,5mmol/L Ca^{2+}
	1,2mmol/L Mg^{2+}
	128mmol/L Cl^-
	25mmol/L HCO_3^-
	1,2mmol/L SO_4^{2-}
	1,2mmol/L $H_2PO_4^-$

Danksagung

Bei Professor Cor de Wit möchte ich mich bedanken für die Überlassung des spannenden Themas, die ausgezeichnete Betreuung und die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Seine wertvollen Erfahrungen, Anregungen und Tipps sowohl in der wissenschaftlichen Diskussion als auch während der experimentellen Durchführung der Arbeit waren für mich sehr lehrreich. Über den Tellerrand der Mikrozirkulation hinaus waren unsere gemeinsamen Gespräche für mich auch immer ein Augenöffner hinsichtlich der größeren naturwissenschaftlichen Zusammenhänge und des wissenschaftlichen Denkens und Arbeitens - Erfahrungen welche mir seitdem im (Berufs-) Leben überaus hilfreich sind.

Dank Dr. Kjestine Schmidt waren die Stunden im Labor immer kurzweilig. Die freundschaftliche Zusammenarbeit und die gemeinsamen Gespräche während unserer Kaffeepausen behalte ich in guter Erinnerung. Für ihre Geduld und Hilfe beim Erlernen der Methoden bin ich ihr ebenfalls sehr dankbar.

Der Laboralltag bekam durch Rita Meuer seine ganz besondere Atmosphäre. Neben der hervorragenden fachlichen Vorbereitung und Organisation des Labors hatte sie auch immer ein offenes Ohr für die nicht-wissenschaftlichen Dinge im Leben.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und insbesondere meiner Frau Johanna danken für all die Unterstützung und Hilfe in den letzten Jahren. Ohne euch hätte ich das nicht geschafft!

Lebenslauf

Jakob David Speiser

Geboren 23. Juli 1988 in Reutlingen

Akademische Ausbildung

10/2009 - 12/2015	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
04/2012 - 12/2015	Experimentelle Arbeiten am Institut für Phyisiologie der Universität zu Lübeck unter der Leitung von Prof. Dr. de Wit
11/2014 - 10/2015	Praktisches Jahr, Wahlfach Pädiatrie. Aufenthalt an der University of Sheffield und University of Namibia

Berufliche Laufbahn

Seit 04/2016	Assistenzarzt in der Klinik für Gefäßmedizin, Universitäres Herzzentrum Hamburg GmbH

Stipendien

08/2013 - 01/2015	Promotionsstipendium „Exzellenzmedizin" der Universität zu Lübeck
03/2015	Reisestipendium Universität zu Lübeck für das PJ Tertial an der University of Namibia, Windhoek

Publikationen

Originalarbeiten:

A. Rhoden, **J. Speiser**, B. Geertz, J. Uebeler, K. Schmidt, C. de Wit, T. Eschenhagen. Preserved cardiovascular homeostasis despite blunted acetylcholine-induced dilation in mice with endothelial muscarinic M3 receptor deletion. *Acta Physiologica* (in press)

Posterpräsentation

J. Speiser, K. Schmidt, A. Eder, D. Atzler, T. Eschenhagen, C. de Wit. ACh-induced arteriolar dilations are partially dependent on the muscarinic M3 receptor in mice in vivo. 2nd Joint Meeting of the German Society for Microcirculation and Vascular Biology and the Swiss Society for Microcirculation and Vascular Research, Dresden.

Vorträge:

J. Speiser, C. de Wit. Characterisation of endothelium-dependent arteriolar dilations after deletion of M3 muscarinic receptors or endothelial G-Protein Gq/11 in mice in vivo. Treffen der Ostseephysiologen 2013, Greifswald

J. Speiser, C. de Wit. Characterisation of endothelium-dependent arteriolar dilations after deletion of M3 muscarinic receptors or endothelial G-Protein Gq/11 in mice in vivo. Workshop on Smooth Muscle Function 2013, Lübeck