

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie
und Toxikologie der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. Markus Schwaninger

Die Bedeutung des gehirndothelialen P₂Y₂- Rezeptors in der neurovaskulären Einheit

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der
Universität zu Lübeck

-Aus der Sektion Medizin-

Vorgelegt von

Josefine Brands aus Coesfeld

Lübeck 2019

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Markus Schwaninger

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Cor de Witt

Tag der mündlichen Prüfung: 02.12.2020

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 02.12.2020

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhalt

Inhalt	4
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung und Aufgabenstellung	10
1.1 Zerebraler Blutfluss.....	10
1.2 Neurovaskuläre Einheit.....	11
1.3 Gehirnendothelzellen	12
1.4 Scherstress.....	13
1.5 Neurovaskuläre Kopplung.....	14
1.6 CO ₂ -induzierte Durchblutungssteigerung	17
1.7 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.....	19
1.8 P _{2y2} -Rezeptoren und die Beteiligung von ATP.....	22
1.9 Fragestellung	24
2 Material und Methoden	25
2.1 Material.....	25
2.2 Ethische Stellungnahme	25
2.3 Mauslinien.....	25
2.3.1 P _{2y2} ^{beKO}	25
2.3.2 Gα _{12/13} ^{beKO}	26
2.4 Quantitative PCR	27
2.4.1 RNA-Isolation aus PBECs.....	27
2.4.2 cDNA-Synthese.....	27
2.4.3 Quantitative PCR	28
2.5 Verhaltensversuche	28
2.5.1 Open Field	29
2.5.2 Elevated Plus Maze	30
2.6 Anlegen einer Endothelzellkultur aus primären Gehirnendothelzellen.....	30
2.7 Calcium Imaging	32
2.8 Laser Speckle Contrast Imaging (LSCI)	34
2.9 Zerebrale Blutflussmessung unter neuronaler Stimulation (NVC) und Hyperkapnie.....	35
2.10 Anfertigen von unfixierten Kryoschnitten	40
2.11 Immunfluoreszenzfärbung von unfixierten Kryoschnitten	40
2.12 Mikroskopie und Auswertung der Gehirnschnitte	41

2.13	Statistik	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Verifizierung des Erfolgs der Cre-Induktion	43
3.2	Charakterisierung der $P_{2Y_2}^{beKO}$ -Linie	46
3.3	CO ₂ -induzierte Durchblutungssteigerung	49
3.4	Neurovaskuläre Kopplung	54
3.5	Immunhistochemie und String Vessels	56
4	Diskussion und Ausblick	60
4.1	Knockoutverifikation der $P_{2Y_2}^{beKO}$ -Linie	60
4.2	Charakteristika und Verhalten der $P_{2Y_2}^{beKO}$ -Linie	61
4.3	Endotheliale Signalwege in der CO ₂ -induzierten Durchblutungssteigerung	62
4.4	Beteiligung des P_{2Y_2} -Rezeptors an der NVC	64
4.5	Veränderungen der Gehirngefäßstruktur unter einem P_{2Y_2} -Rezeptorknockout	66
4.6	Fazit	67
5	Zusammenfassung	70
6	Literaturverzeichnis	72
7	Anhänge	77
7.1.1	Geräte	77
7.1.2	Verbrauchsmaterialien	79
7.1.3	Chemikalien	80
7.1.4	Puffer und Lösungen	82
7.1.5	Kits	84
7.1.6	Antikörper	84
7.1.7	Primer	84
7.1.8	Software	85
8	Danksagungen	86

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die neurovaskuläre Einheit.....	12
Abbildung 2: Zusammenspiel der NVE [1].....	17
Abbildung 3: GPCRs [64]	21
Abbildung 4: Aufbau des Open Field Test und des Elevated Plus Maze Test.....	30
Abbildung 5: Messaufbau Laser Speckle.....	38
Abbildung 6: Gehirnperfusion im Speckle Imaging	39
Abbildung 7: qPCR der kultivierten PBECs.....	43
Abbildung 8: Calcium Imaging	45
Abbildung 9: Gewichtsverlauf der $P_{2Y_2}^{beKO}$ -Linie	46
Abbildung 10: Open Field Test mit der $P_{2Y_2}^{beKO}$ -Linie	48
Abbildung 11: Elevated Plus Maze Test mit der $P_{2Y_2}^{beKO}$ -Linie.....	49
Abbildung 12: CO ₂ -Versuche mit der $P_{2Y_2}^{beKO}$ -Linie	51
Abbildung 13: CO ₂ -Versuche mit der $G\alpha_{12/13}^{beKO}$ -Linie	53
Abbildung 14: Die NVC der $P_{2Y_2}^{beKO}$ -Linie.....	55
Abbildung 15: NVC der $G\alpha_{12/13}^{beKO}$ -Linie	56
Abbildung 16: Immunhistochemische Untersuchungen der $P_{2Y_2}^{beKO}$ -Linie	58
Abbildung 17: String Vessels bei der $P_{2Y_2}^{beKO}$ -Linie	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Abkürzungen.....	8
Tabelle 2 Geräte.....	77
Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien	79
Tabelle 4 Chemikalien	80
Tabelle 5 Puffer und Lösungen.....	82
Tabelle 6 Kits	84
Tabelle 7 Antikörper	84
Tabelle 8 Primer	84
Tabelle 9 Software	85

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1 Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
[Ca ²⁺] _i	Intrazelluläre Calciumkonzentration
Ct	Cycle threshold
AA	Arachidonsäure
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Kurve (Area under the curve)
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BOLD fMRT	Blood oxygen level dependent funktionelle Magnet Resonanz-Tomographie
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CA	Carboanhydrase
CD	Cluster of differentiation
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
Cre	Causes recombination
DAG	Diacyl glycerol
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium - Nutritient Mixture F12
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement
EET	Epoxyeicosatrienoic acid
eNOS	endotheliale NO Synthase
I.E.	Internationale Einheiten
i.p.	intraperitoneal
IgG	Immunglobulin G
IP ₃	Inositol (1,4,5)-trisphosphat
LBD	Ligand binding domain
loxP	locus of X-over of P1
LSCI	Laser Speckle Contrast Imaging

mGLUR	Metabotroper Glutamat-Rezeptor
MLCP	Myosin leichte Ketten Phosphatase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	Neuronale NO Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NVC	Neurovaskuläre Kopplung (Neurovascular coupling)
NVE	Neurovaskuläre Einheit
PBEC	Primary brain endothelial cells
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PGE ₂	Prostaglandin E2
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PPADS	Pyridoxalphosphat-6-Azophenyl-2',4'-Disulfon Säure
qPCR	Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion
ROI	Region of interest
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
U	Units
UTP	Uridintriphosphat
#	Anzahl
Δ	Differenz

1 Einleitung und Aufgabenstellung

1.1 Zerebraler Blutfluss

Die strukturelle und funktionale Integrität des Gehirns hängt von einer kontinuierlichen Blutzufuhr mit Sauerstoff und Glucose ab, da im Gehirn kaum Energie gespeichert werden kann. Wenn der zerebrale Blutfluss unterbrochen wird, geben Neurone ihre Funktion auf und sterben schnell [1]. Die Versorgung eines so essenziellen Organs wie des Gehirns wird über mehrere Wege sichergestellt und fein reguliert. Dazu tragen mehrere Mechanismen bei. Zum einen der Aufbau des Gefäßsystems mit vier großen Zugängen und einer Verteilung über den Circulus Willisii und zum anderen eine Gefäßregulation, die dem Gehirn in einem großen Bereich unabhängig von Blutdruckschwankungen und anderen Faktoren eine gesicherte Versorgung ermöglicht.

Die parenchymalen Arteriolen gehören zu den Widerstandsgefäßen, sind maßgeblich an der Durchblutungsregulation beteiligt [2] und werden durch ein komplexes Zusammenspiel von zahlreichen Faktoren reguliert. Zum überwiegenden Teil sind intrinsische Faktoren, also vom Gehirngewebe und dessen Gefäßen vor Ort entstammende Faktoren, beteiligt. Diese sind die Kohlenstoffdioxid (CO_2)- und Sauerstoff (O_2)-Partialdrücke, Metabolite des Stoffwechsels sowie eine Menge andere Faktoren, wie z.B. Neurotransmitter oder Prostaglandine. Bei der Aktivität von Neuronen und Astrozyten werden beispielsweise Adenosintriphosphat (ATP) oder Laktat freigesetzt [3, 4], die einen Einfluss auf die Durchblutungsregulation haben. Außerdem gibt es die myogene Autoregulation innerhalb des Parenchyms. Diese basiert auf der Fähigkeit der glatten Gefäßmuskulatur, sich bei erhöhtem arteriellen Blutdruck zu kontrahieren und bei erniedrigtem arteriellen Blutdruck zu relaxieren [1]. Im Gegensatz dazu steht die extrazerebrale Durchblutungsregulation über extrinsische, also von außerhalb des Gehirns entstammende Faktoren. Diese findet vor allem in den pialen Gefäßabschnitten statt und beinhaltet die vegetative Innervation, also Signale von gefäßversorgenden Nerven, und Botenstoffe wie z.B. Noradrenalin oder Serotonin, die anderen Organen wie der Nebennierenrinde entstammen können [5].

Zahlreiche Erkrankungen, wie ein lang bestehender Diabetes mellitus und/oder arterielle Hypertonie, führen zu einer endothelialen Dysfunktion [6, 7]. Die endotheliale Dysfunktion ist der krankhafte Funktionsverlust bzw. die Funktionsveränderung von Endothelzellen hin zu einer reduzierten Vasodilatation, einer verstärkten Entzündungsaktivität und prothrombotischen Eigenschaften [8]. Krankheiten wie beispielsweise die vaskuläre Demenz, Alzheimer Demenz und ischämische Schlaganfälle sind die Folge einer endothelialen Dysfunktion und in der Bevölkerung weit verbreitet [9-12]. Die genannten Erkrankungen sind mit erheblichen Beeinträchtigungen verbunden. Folglich stellen sie durch die Kombination aus weiter Verbreitung in der Bevölkerung und hohen Einschränkungsgarden auch gesundheitsökonomisch ein hoch relevantes Thema dar. Zwar ist es möglich über die medikamentöse Einstellung des arteriellen Bluthochdrucks, der Fettstoffwechselstörung und des Diabetes mellitus präventiv gegen manche dieser Erkrankungen einzuwirken. Es gibt jedoch nur wenige Medikamente, über die positive Beeinflussung der endothelialen Funktion, langfristig einen klinischen Nutzen bringen [13]. Um neue therapeutische Konzepte entwickeln zu können, ist ein Verständnis der physiologischen Mechanismen unerlässlich. Da in diesem Themenfeld noch viele Fragen ungeklärt sind, ist es wichtig, diese zu erforschen.

1.2 Neurovaskuläre Einheit

Das Konzept der neurovaskulären Einheit (NVE) beschreibt eine Gruppe von Zelltypen, die zusammen interagieren und für die Funktion der Bluthirnschranke (BHS) und der zerebralen Durchblutungsregulation sorgen (Abbildung 1). Je nach neuronaler Aktivität wird der Blutbedarf adäquat gedeckt. Dieses Zusammenspiel wird NVC genannt. Die NVE besteht aus Endothelzellen, Neuronen, Astrozyten und Perizyten, die in enger nachbarschaftlicher Anordnung vorzufinden sind. Kommt es zu einem Funktionsverlust einer Komponente, führt dies zu Störungen der BHS und in der NVC. Dieses Konzept wurde 2001 auf dem Stroke Progress Review Group meeting of the National Institute of Neurological Disorders and Stroke im Rahmen eines integrativen Ansatzes zum Verständnis der Physiologie und Pathophysiologie der BHS und der Durchblutungsregulation im Gehirn entworfen [14].

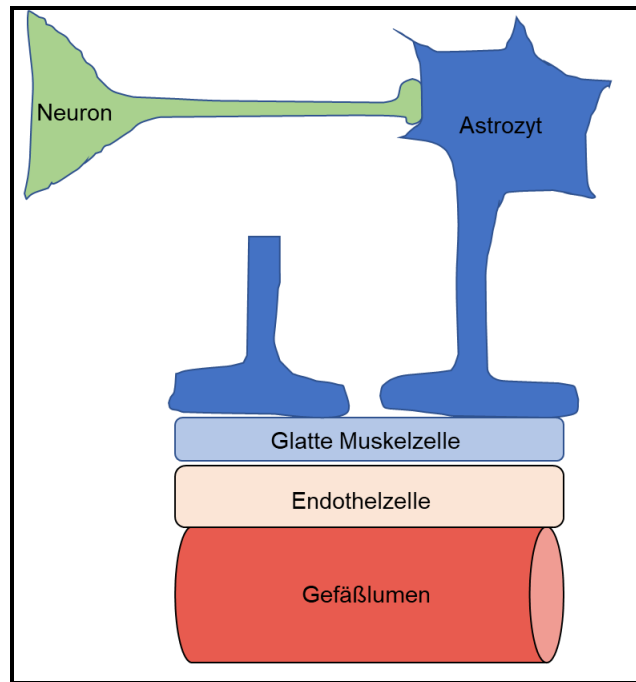


Abbildung 1: Die neurovaskuläre Einheit

Diese schematische Darstellung verdeutlicht die Anordnung der Beteiligten Zelltypen der NVE bei einer Arteriole. In Grün ist ein Neuron dargestellt, in Dunkelblau ein Astrozyt und ein Ausläufer eines weiteren Astrozyten, in Hellblau eine glatte Muskelzelle, in Hellrot eine Endothelzelle und in Dunkelrot das Gefäßlumen.

1.3 Gehirnendothelzellen

In dieser Arbeit wird die Rolle der Gehirnendothelzellen untersucht, die, wie oben beschrieben, eine Komponente der NVE sind und eine essenzielle Rolle in der Regulation der Blutversorgung spielen [15, 16]. Endothelzellen kleiden Gefäße von innen aus. Durch ihren direkten Kontakt zum Blut und zum Gehirn sind sie in der Lage, Stoffwechselprodukte dieser beiden Kompartimente wahrzunehmen, zu verarbeiten und eine Antwort z.B. in Form einer Änderung des Gefäßtonus auszulösen. Sie sind also als sensorisches System in der Lage, verschiedene Signale wahrzunehmen, zu verarbeiten und wiederum verschiedene andere zu senden [17].

Durch Gap Junctions können Signale direkt von Endothelzelle zu Endothelzelle weitergeleitet werden [3]. Gap Junctions bestehen aus mehreren Connexin-Proteinen, die zusammen einen Kanal bilden und so die Endothelzellen untereinander verbinden. Durch die Gap Junctions können Ionen und niedermolekulare Stoffe wie beispielsweise Ca^{2+} und IP_3 frei diffundieren [18]. Einen

noch größeren Stellenwert nimmt die para- und autokrine Stimulation mit z.B. NO, Prostaglandinen, Endothelin, Wachstumsfaktoren, ATP und vielen weiteren Signalmolekülen, über die die Endothelzellen miteinander kommunizieren können, ein. Doch Endothelzellen sind nicht nur in der Lage miteinander zu kommunizieren, sondern auch mit den benachbarten Zellen in der NVE [15], mit Blutzellen, Bakterien und Viren. Außerdem reagieren sie auf Hormone, Neurotransmitter, Blutgase und Scherstress [17]. Dabei werden in vielen Fällen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren an der Zelloberfläche der Endothelzellen aktiviert, die zu einer intrazellulären Signalkaskade führen. Bei $G_{\alpha/11}$ -gekoppelten GPCRs kommt es beispielsweise zu einem Ca^{2+} -Anstieg in der Zelle, die als Ca^{2+} -Welle beschrieben wird [19]. Eine weitere wichtige Funktion liegt in der Angiogenese und dem Erhalt der Gefäße [20, 21].

Gehirndothelzellen unterscheiden sich von peripheren Endothelzellen durch diverse Eigenschaften. So haben sie z.B. einen erhöhten Mitochondrien-Gehalt [22], der für einen erhöhten Energiestoffwechsel spricht. Da sie keine Fenestrierung (Fensterung) haben [23], nur geringe pinozytische Aktivität aufweisen [24] und durch Tight Junctions eng miteinander verknüpft sind, sind sie undurchlässig für viele Stoffe im Blut. Außerdem sind sie in der Lage, die Permeabilität selektiv für die einzelnen Stoffe zu regulieren. Durch u.a. diese Eigenschaften sind sie ein grundlegender Teil der BHS [25, 26]. Die Endothelzellen sind also eine zentrale kommunikative Schnittstelle mit zahlreichen Funktionen, die noch zu Teilen unerforscht sind.

1.4 Scherstress

Scherstress (Synonym Schubspannung τ) ist die Kraft, die pro Fläche benötigt wird, um eine bewegte Platte mit einer konstanten Geschwindigkeit über der Flüssigkeit zu bewegen. Er ist abhängig vom Geschwindigkeitsgradienten, der wiederum vom Radius des Gefäßes und der Geschwindigkeit des Blutes abhängig ist. Durch die Reibungskräfte der Schichten untereinander sind bei laminarer Strömung die Schichten gleicher Geschwindigkeit konzentrisch angeordnet, sodass es zu einem parabolischen Geschwindigkeitsprofil kommt [27]. Das bedeutet, dass dementsprechend die Schicht der höchsten Geschwindigkeit in der Mitte eines Gefäßes ist und die Schicht mit dem größten Scherstress direkt am Endothel ist. Der

Scherstress tritt als visköser Längszug (viscous drag) des strömenden Blutes am Endothel auf und sorgt im Endothel u.a. für die Bildung von antiatherosklerotischen und vasodilatierenden Substanzen wie NO und Prostazyklinen [27], sowie von ATP [19, 28]. Sogar Proteine der Gap Junctions werden durch ihn regulatorisch beeinflusst [29]. Außerdem ist der Scherstress ein wichtiger Stimulus für das Überleben von Endothelzellen [21]. Wenn es zu turbulenter Strömung kommt, führt das zu einem sehr geringen Scherstress, was wiederum zu einem atherosklerotischen Umbau der Gefäßwände beiträgt [27]. Durch diese Effekte am Endothel ist der Scherstress eine wichtige Komponente in der Blutflussregulation.

1.5 Neurovaskuläre Kopplung

Die NVC beschreibt eine enge zeitliche und räumliche Verbindung zwischen neuronaler Aktivität und zerebraler Blutflussantwort [30]. Aktive Neurone steigern ihre Energieversorgung, indem sie benachbarte Arteriolen und Kapillaren dilatieren. Dies ist ein komplexer Vorgang, der noch nicht vollständig verstanden ist und wozu verschiedene Erklärungsansätze existieren. Es wird außerdem davon ausgegangen, dass in Kapillaren und Arteriolen unterschiedliche Mechanismen vorliegen [31]. Folgende Mechanismen und Wege werden diskutiert (Abbildung 2):

Zunächst kann das Neuron betrachtet werden, das an primärer Stelle steht und direkt seine Energieversorgung sichern will. Exzitatorische Neurone schütten Glutamat aus, was den N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor eines anderen (Inter-)Neurons aktivieren kann, wodurch über einen transienten intrazellulären Calciumanstieg die neuronale NO Synthase (nNOS) und die Cyclooxygenase 1 (COX1) aktiviert werden [31]. Das gebildete NO sowie die Metabolite der COX1 können direkt zur glatten Muskelzelle diffundieren und dort zur Relaxation führen [30].

Außerdem wird häufig behauptet, dass das ausgeschüttete Glutamat einen Gq-gekoppelten metabotropen Glutamat Rezeptor (mGLUR) von Astrozyten aktivieren kann [1, 30-32], was über eine gesteigerte intrazelluläre Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ zur Aktivierung der Phospholipase A2 (PLA₂) führt. Dadurch kommt es zur Spaltung von Arachidonsäure (AA) in ihre Metabolite sowie über die weitere Prozessierung über die COX1 und Cytochrom P450 zu der Bildung von Prostaglandin E2 (PGE₂) und Epoxyeicosatriensäure (EET), die in der glatten Muskelzelle zur Relaxation

führen [1, 30, 31]. Auch NO kann in Astrozyten gebildet werden, was ebenfalls direkt in die glatte Muskelzelle diffundieren kann und dort zur Vasodilatation führt [1].

Andererseits wurde gezeigt, dass die Expression des mGLUR5 entwicklungsabhängig ist und dieser G_{α_q} -gekoppelte Rezeptortyp bei erwachsenen Tieren nicht mehr exprimiert wird. Der im erwachsenen Tier verbleibende mGLUR3 ist $G_{i/o}$ gekoppelt und führt dementsprechend nicht zu einem Ca^{2+} -Anstieg [33, 34].

Es gibt außerdem auch viele andere Stimuli, die einen Signalweg in den Astrozyten auslösen können, der zu einem Ca^{2+} -Anstieg führt, wie z.B. ATP über den P_2Y_2 -Rezeptor, Endocannabinoide, Norepinephrin oder Acetylcholin [34, 35].

Bei diesen Mechanismen handelt es sich um Feedforward-Hypothesen, in denen die neuronale Aktivität direkt für einen gesteigerten zerebralen Blutfluss sorgt, sodass Energie bereitgestellt wird. Es gibt jedoch auch Ansätze, bei denen ein Feedback-Mechanismus besteht. Dabei sorgt der hohe Energieverbrauch der Neurone für eine Stoffwechsellage, in der Mangel an Sauerstoff besteht, weshalb die weitere Energiegewinnung auf die anaerobe Glykolyse ausweicht, sodass z.B. vermehrt Laktat anfällt [32, 36]. Jedoch besteht auch die Hypothese vom Laktat-Shuttle zwischen Astrozyten und Neuronen, die besagt, dass Neurone generell sehr wenig Glykolyse betreiben und hauptsächlich das Laktat der Astrozyten verstoffwechseln, wenn sie aktiv sind. Dabei fungiert das Laktat nicht nur als Abbauprodukt, sondern sorgt als Signalmolekül zwischen den Zellen der NVC für eine neuro-gliale Kopplung [37]. Das Laktat kann z.B. auch die PGE_2 -Wiederaufnahme in die Astrozyten hemmen, sodass mehr PGE_2 im Extrazellularraum bleibt und zur Relaxation in den glatten Muskelzellen führt [32, 36]. Außerdem kommt es zu einer Akkumulation von Adenosin, dem Abbauprodukt von ATP, welches die Wirkung der 20-Hydroxyeicosatetraensäure (20-HETE) hemmt, die zur Vasokonstriktion führen würde [32]. Des Weiteren kann es den A_{2A} -Rezeptor, einen G-Protein gekoppelten Adenosinrezeptor, auf glatten Muskelzellen aktivieren, was dort zu einer Relaxation führen würde [38]. Beide Mechanismen tragen so zur Vasodilatation bei.

Wie zuvor schon erläutert, spielen auch Endothelzellen eine Rolle in der NVC. Wenn $G_{\alpha_{q/11}}$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren auf den Endothelzellen aktiviert werden, kann dies unter anderem zu einem transienten Ca^{2+} -Anstieg der Zelle führen. Dieser führt wiederum zur Aktivierung der endothelialen NO Synthase (eNOS), sodass vermehrt NO gebildet wird, welches in die glatte Muskelzelle diffundieren kann und dort zur Relaxation führt [15]. Dabei ist nicht klar, welche G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

daran beteiligt sind. Astrozyten können ebenfalls über einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration ATP ausschütten [39] und auch Braet et al. kommen zu dem Schluss, dass Astrozyten und Endothelzellen über schnelle Ca^{2+} -Signale innerhalb von Sekunden (Sek.) über verschiedene Wege miteinander kommunizieren können, zum einen mit Hilfe von Gap Junctions und zum anderen über purinerge Rezeptoren [40]. Doch obwohl die astrozytäre Stimulation ausreicht, um eine NVC-Antwort auszulösen, ist unklar, ob die Astrozyten wirklich für die NVC essenziell nötig sind. Sie produzieren eine „slow-Start“-Hyperämie 3-4 Sek. nach Stimulation. Das reicht für eine basale neuronale Aktivität aus, erklärt aber nicht die sofortige Antwort in weniger als einer Sekunde nach Stimulation [30]. Außerdem scheinen die astrozytären Signale zu klein [33]. Es muss also einen anderen Weg geben, der für die schnelle Antwort zuständig ist.

Eine weitere wichtige Komponente ist der Scherstress. Als Antwort auf Scherstress schütten Endothelzellen ATP aus und können sich über diesen Signaltransmitter ebenfalls auto- und parakrin stimulieren und so eine vasodilatatorische Antwort amplifizieren [1, 19, 39]. Genauso schütten Erythrozyten bei Scherstress ATP aus, das die luminal gelegenen P_{2Y_2} -Rezeptoren der Endothelzellen erreichen kann und den gleichen Effekt auslöst [41].

Die NVC muss an einer Stelle des Gefäßbaumes beginnen und sich von dort aus so ausbreiten, dass auch die höher gelegenen Arterien und Arteriolen dilatiert werden, um keinen Druckabfall im Kapillarbett oder ein Steal-Phänomen aus Nachbarregionen auszulösen [1]. Einerseits kann es über den systemischen Blutdruck, vegetative Innervation und humorale Faktoren zu einer Dilatation der großen Arterien und den pialen Arteriolen kommen, was so über einen gesteigerten Blutfluss zu einer passiven Dilatation der distalen Gefäße führt [42]. Andererseits wurde gezeigt, dass eine Ausbreitung der Dilatation retrograd, d.h. beginnend bei den Kapillaren und weiter ausbreitend bis zu den großen Arteriolen, erfolgt [43].

Die NVC beginnt demnach in der Tiefe auf Ebene der Kapillaren bzw. der präkapillären Arteriolen [43, 44]. Dabei spielen die Perizyten vermutlich eine große Rolle, da sie in enger Nachbarschaft zwischen Neuronen und Gefäßen vorzufinden sind und sich kontrahieren können, womit sie den Durchmesser der Kapillaren beeinflussen können [45].

Wenn diese Hypothese stimmt, muss es auch Mechanismen geben, die die retrograde Dilatation ermöglichen. Dabei werden Gap Junctions zwischen den glatten

Muskelzellen sowie zwischen den Endothelzellen als auch parakrine Fortleitung mittels purinergener Signalfortleitung entlang der Endothelzellen und mechanische Einflüsse über den Scherstress an Endothelzellen diskutiert [19, 44].

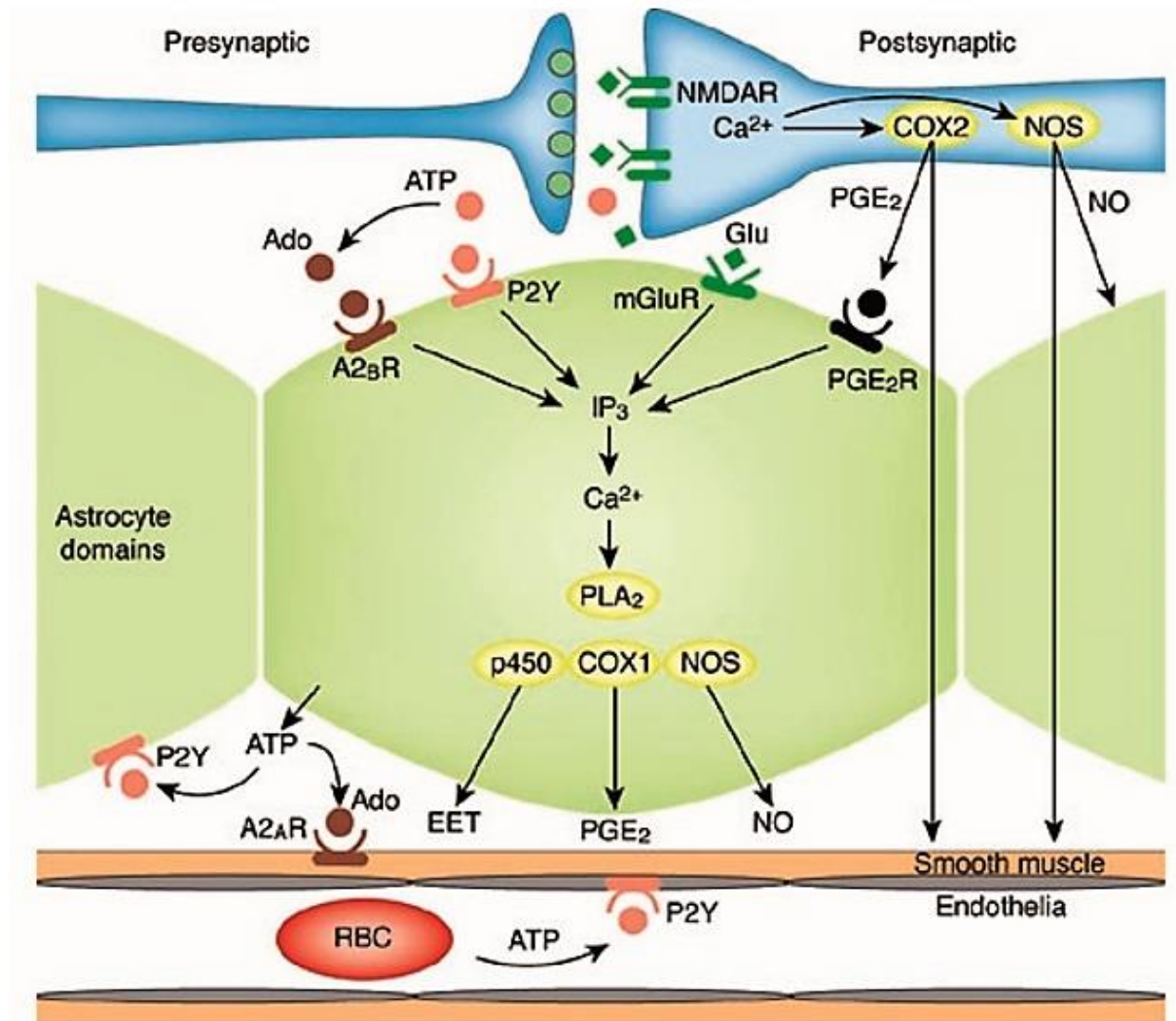


Abbildung 2: Zusammenspiel der NVE [1]

Dargestellt sind die diskutierten Mechanismen, über die die neurovaskuläre Kopplung vermutlich funktioniert. RBC = Red Blood Cell, Ado = Adenosin, p450 = Cytochrome p450, A2xR = Adenosinrezeptoren

1.6 CO₂-induzierte Durchblutungssteigerung

Der zerebrale Blutfluss ist besonders sensitiv gegenüber den arteriellen CO₂-Partialdrücken (P_{aCO₂}), was sich darin äußert, dass 1 mmHg Anstieg bzw. Abfall der eupnoeischen Partialdrücke zu einer 3-6 %igen Steigerung bzw. 1-3 %igen Reduktion des zerebralen Blutflusses führen [30]. Dabei ist die vaskuläre Reaktion

auf CO₂ nicht linear, sondern unter Hyperkapnie mit einem größeren Blutflussanstieg verbunden als der Blutflussabfall unter Hypokapnie [46, 47]. Das CO₂ reagiert im Blut mit Wasser, erleichtert durch die Carboanhydrase (CA), über Carbonsäure zu Bicarbonat und Protonen, wobei das Gleichgewicht auf der rechten Seite liegt [48]. $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$. Dieser Mechanismus zeigt, dass Bicarbonat, welches den Hauptpuffer für den Säure-Base-Haushalt im Blut ausmacht, und Protonen, die den pH-Wert bestimmen, auch eine wichtige Rolle spielen könnten [48].

Auch mit der respiratorischen Antwort ist die zerebrovaskuläre Reaktivität auf CO₂ eng verknüpft. Das zeigt sich einerseits dadurch, dass eine Erhöhung des PaCO₂ um 1 mmHg zu einer Ventilationssteigerung von 20-30 % bzw. eine Erhöhung um 4 mmHg zu einer Ventilationssteigerung von 177 % führt [48]. Andererseits ist eine Reduktion in der zerebrovaskulären Regulierbarkeit mit einer instabilen Atmung bei dem zentralen Schlafapnoe Syndrom, bei Herzinsuffizienz und in großen Höhen assoziiert [49, 50].

Ebenfalls lässt sich ein Zusammenhang zwischen der zerebrovaskulären Reaktivität auf CO₂ und dem Verhalten finden. Zunächst führt das Einatmen von CO₂ zu Angst und Panikreaktionen [51]. Zusätzlich führt eine Einschränkung der zerebrovaskulären Reaktivität auf CO₂ zu einem gesteigerten Ängstlichkeitsverhalten, wie in den Vorergebnissen gezeigt wurde (siehe unten).

Primär lässt sich der Reflexbogen zur Ventilationsantwort über die Effekte von CO₂ auf Ebene der zentralen Chemorezeptoren im Retrotrapezoiden Nucleus und der ventrolateralen Medulla oblongata erklären [48, 52, 53]. Es wurde aber auch gezeigt, dass die Reaktion der zerebralen Gefäße selbst essenziell dazu beiträgt [53].

Der PaCO₂ im Blut hat also einen großen Einfluss auf diverse Funktionen im Gehirn, wobei die Mechanismen hinter diesen Effekten bisher noch nicht endgültig geklärt sind. Das trifft auch auf die CO₂-induzierte Durchblutungssteigerung zu. Zum einen könnten die glatten Muskelzellen der Gefäße diese Reaktion vermitteln. Dabei aktivieren Protonen Kaliumkanäle der glatten Muskelzelle und führen über eine Hyperpolarisation zu einer Schließung der Ca²⁺_v-Kanäle. Damit kommt es dann über eine verminderte [Ca²⁺]_i zur Muskelrelaxation [54, 55]. Zum anderen könnten Endothelzellen an der CO₂-induzierten Durchblutungssteigerung beteiligt sein, was sich dadurch zeigt, dass diese bei einer endothelialen Dysfunktion eingeschränkt ist [56]. Des Weiteren setzen Erythrozyten unter Hyperkapnie ATP frei, welches dann an

purinerge Rezeptoren auf Astrozyten und Endothelzellen binden kann [57]. Dabei kommt es, wie oben erläutert, zu einem transienten Ca^{2+} -Anstieg der Endothelzelle, der wiederum zur Aktivierung der endothelialen NO Synthase (eNOS) führt. Dadurch wird vermehrt NO gebildet, welches in die glatte Muskelzelle diffundieren kann und dort zur Relaxation führt [15]. Generell scheint ATP ein wichtiges Signalmolekül in der CO_2 -Reaktivität zu sein [58-60].

Außerdem könnten G-Protein-gekoppelte Rezeptoren an der CO_2 -Antwort im Gehirn beteiligt sein [61, 62]. Zuvor wurde in der Arbeitsgruppe Cerebral Perfusion and Metabolism, die $\text{G}\alpha_{q/11}^{\text{beKO}}$ -Linie untersucht. Diese Mauslinie trägt einen mit Tamoxifen induzierbaren Knockout des G-Proteins $\text{G}\alpha_q$ in Gehirndothelzellen auf dem Hintergrund eines Gesamt-Knockouts des G-Proteins $\text{G}\alpha_{11}$, wodurch eine Deletion des $\text{G}\alpha_{q/11}$ -Signalwegs in Gehirndothelzellen erreicht wird. Bei der $\text{G}\alpha_{q/11}^{\text{beKO}}$ -Linie wurde die Durchblutungssteigerung im Gehirn unter Hyperkapnie untersucht. Außerdem wurde das Ängstlichkeitsverhalten untersucht. Dabei hatte sich herausgestellt, dass die Knockoutmäuse unter der Stimulation mit CO_2 einen deutlich geringeren Anstieg des Blutflusses als die Mäuse der Kontrollgruppe zeigten. Ebenfalls waren die Ergebnisse bei den Verhaltenstests Open Field und Elevated Plus Maze (siehe Methoden) auffällig. Hier zeigte die Knockoutgruppe ein verstärktes Ängstlichkeitsverhalten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das lässt vermuten, dass ein endothelialer G-Protein-gekoppelter Rezeptor an CO_2 -induzierten Durchblutungssteigerung beteiligt ist.

1.7 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) beinhalten eine große Superfamilie an Rezeptoren, die evolutionär weit verbreitet sind und viele Prozesse regulieren [63]. GPCR sind membranständige Rezeptorproteine, die aus sieben transmembranären Helices besteht und eine extrazelluläre oder zwischen den Helices befindliche Ligandenbindungsstelle besitzen. Intrazellulär ist mit diesen Proteinen ein heterotrimeres Guanin-Nukleotid-bindendes Protein (G-Protein) assoziiert [64]. Die G-Proteine übertragen das Signal, nachdem ein Ligand extrazellulär gebunden hat, weiter in die Zelle. G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten (α , β , und γ), die eng miteinander assoziiert sind. Bei Aktivierung des Rezeptors wird ein GDP durch ein GTP an der α -Untereinheit ausgetauscht, woraufhin die α -Untereinheit von der β -

und γ -Untereinheit dissoziiert und eine nachgeordnete Signalkaskade auslöst. Es gibt vier Hauptklassen der GPCR-induzierten Signalwege, die durch ihre α -Untereinheit bestimmt werden: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_{12/13}$ [63]. $G\alpha_s$ und $G\alpha_i$ wirken auf das Enzym Adenylatcyclase und damit die Bildung des second messengers cAMP ein, $G\alpha_s$ aktiviert sie und $G\alpha_i$ wirkt inhibitorisch. $G\alpha_{q/11}$ aktiviert die Phospholipase C (PLC) und $G\alpha_{12}$ wirkt auf Rho ebenfalls aktivierend ein. Zur Verdeutlichung dieser Signalkaskaden siehe auch Abbildung 3.

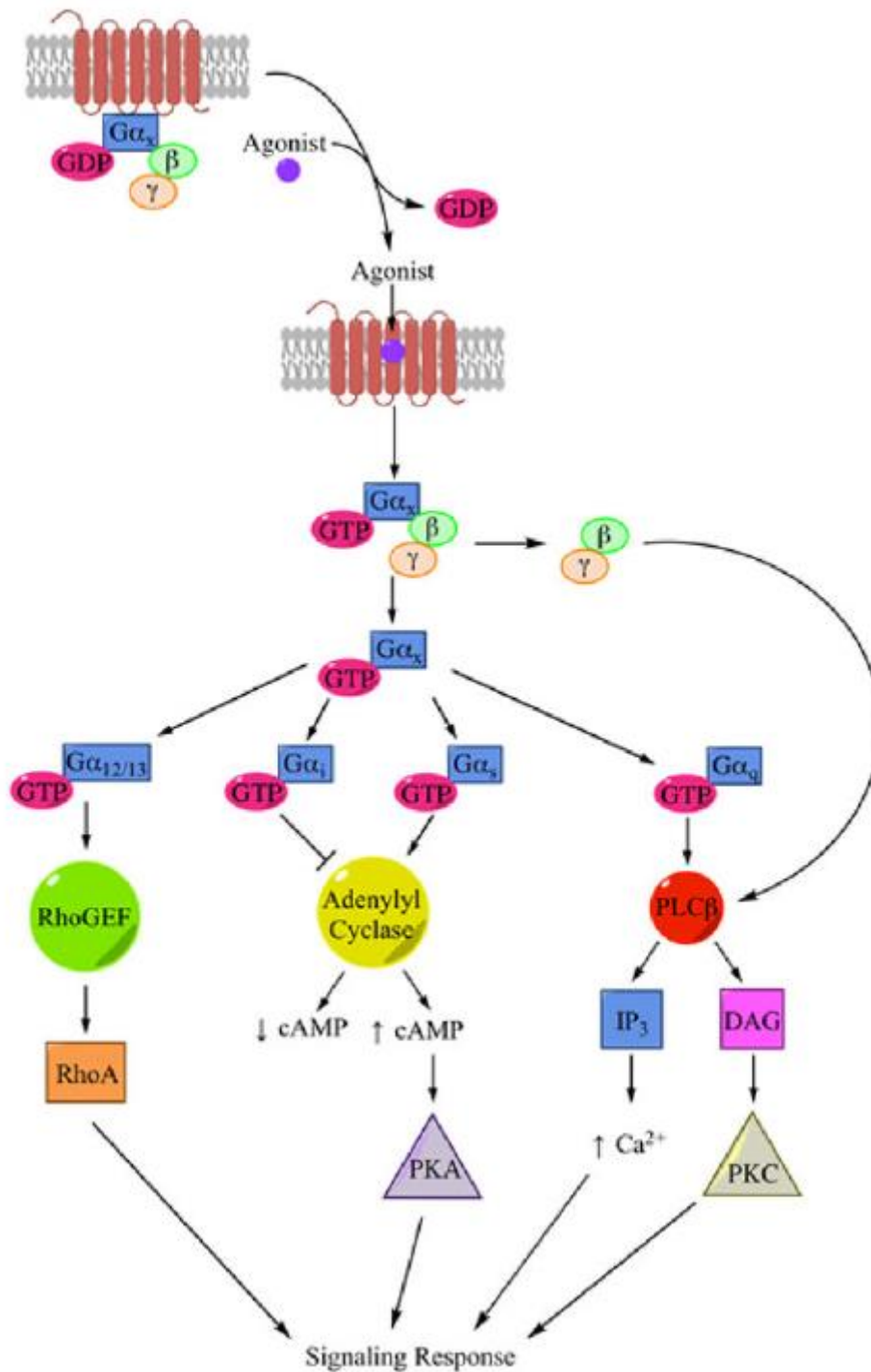


Abbildung 3: GPCRs [64]

Dargestellt ist ein Beispiel für die Aktivierung eines GPCR und der jeweils darauffolgende Signalweg der vier Hauptklassen an G-Proteinen. Durch die Bindung eines Liganden wird an der α -Untereinheit GDP durch GTP ausgetauscht, gefolgt von der Dissoziation der $G\alpha$ -Untereinheit von $G\beta\gamma$ -Dimer. Beide Untereinheiten $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ können nun nachgeordnete Second Messenger aktivieren oder inhibieren. $G\alpha_x$ repräsentiert eine allgemeine $G\alpha$ -Untereinheit, gefolgt von den Diagrammen für die Signalwege von $G\alpha_{12/13}$, $G\alpha_i$, $G\alpha_s$, und $G\alpha_{q/11}$ [64].

Der in dieser Arbeit untersuchte P_{2Y_2} -Rezeptor ist hauptsächlich $G_{\alpha_{q/11}}$ -gekoppelt [65]. Die Proteine G_{α_q} und $G_{\alpha_{11}}$ haben biochemisch, pharmakologisch und genetisch sehr ähnliche, wenn auch nicht identische Charakteristika und können sich so auch gegenseitig zum Teil ersetzen [66]. $G_{\alpha_{q/11}}$ kann unter anderem einen Signalweg aktivieren, der zu einem Ca^{2+} -Anstieg in der Zelle führt. Daraufhin bilden sich Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexe, die in der Lage sind, die eNOS zu aktivieren [28, 67]. Das gebildete NO ist flüchtig und kann in die glatten Muskelzellen diffundieren und dort die Guanylatzyklase aktivieren. Diese bildet daraufhin zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), welches über Aktivierung der Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) und Hemmung des Ca^{2+} -Einstroms aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) zur Muskelrelaxation und damit zur Vasodilatation führt [68]. Wird der $G_{\alpha_{q/11}}$ -Signalweg blockiert, ist defekt oder nicht vorhanden, kommt es folglich zu einer Einschränkung der Vasodilatation auf Stimuli, die durch diesen endothelialen Signalweg eine Relaxation auslösen. In vorherigen Versuchen der Arbeitsgruppe wurde festgestellt, dass ein Knockout des $G_{\alpha_{q/11}}$ -Signalwegs in Gehirndothelzellen zu einer Verminderung der Blutflusssteigerung bei der NVC und unter Hyperkapnie führt, was die Rolle dieses Signalwegs in der Durchblutungsregulation bestätigt.

Der $G_{\alpha_{q/11}}$ -gekoppelte Weg kann auch mit anderen Signalwegen interagieren, u.a. mit dem $G_{\alpha_{12/13}}$ -gekoppelten Signalweg. Dieser Signalweg wird von den G_{α} -Proteinen 12 und 13 vermittelt und stellt einen alternativen Signalweg zum $G_{\alpha_{q/11}}$ -gekoppelten Signalweg dar. Beide G_{α} -Proteine ($G_{\alpha_{12}}$ und $G_{\alpha_{13}}$) gehören zu der gleichen $G_{\alpha_{12}}$ -Subfamilie und haben viele ähnliche Eigenschaften [69]. Sie können u.a. das monomere GTP-bindende Protein Rho aktivieren. Rho und die unter $G_{\alpha_{q/11}}$ aktivierte PKC können beide auf gleiche Zielproteine einwirken [70]. Einige Rezeptoren sind außerdem in der Lage, beide Signalwege, also die von $G_{\alpha_{q/11}}$ und $G_{\alpha_{12/13}}$ gekoppelten Signalwege auszulösen. So gibt es P_{2Y_2} -Rezeptoren, die $G_{\alpha_{12/13}}$ gekoppelt sind, weshalb es wichtig ist, die Effekte der $G_{\alpha_{12/13}}$ -Proteine auf die NVC und die CO_2 -induzierte Durchblutungssteigerung zu untersuchen [65].

1.8 P_{2Y_2} -Rezeptoren und die Beteiligung von ATP

Der P_{2Y_2} -Rezeptor gehört zur Gruppe der purinergen Rezeptoren. Die Gruppe der Purinorezeptoren teilt sich auf in die metabotropen (Signalkaskade auslösenden)

(P₂y) und die ionotropen (Ionen leitenden) (P₂x) purinergen Rezeptoren, von denen jeweils mehrere Subtypen in vielen verschiedenen Geweben vorkommen [71]. So ist er beispielsweise auf Astrozyten, Leukozyten, Epithelzellen, Endothelzellen, endokrinen und exokrinen Drüsenzellen, Hepatozyten, vaskulären und viszeralen glatten Muskelzellen zu finden [65]. Der P₂y₂-Rezeptor, als metabotroper Subtyp, ist primär G_{q/11}-gekoppelt [44, 65, 70] und sekundär G_{i/o} sowie G_{12/13} [65]. ATP und UTP (Uridintriphosphat) binden mit etwa gleich starker Affinität an den P₂y₂-Rezeptor [71]. Es gibt jedoch auch Hinweise, dass UTP mit stärkerer Affinität bindet als ATP [69]. Dabei kommt aber nur ATP in nennenswerten Konzentrationen in vivo vor [72] und vor allem kann durch ATP und nicht durch UTP eine Vasorelaxation vermittelt werden [73].

Für eine Beteiligung von ATP in der NVC spricht, dass ATP und dessen enzymatische Abbauprodukte ADP (Adenosindiphosphat) und AMP (Adenosinmonophosphat) die BOLD fMRT (blood-oxygen-level-dependent functional magnetic resonance imaging) Signale hemmen [39]. Ebenfalls wurde gezeigt, dass unter erhöhter neuronaler Aktivität auch Astrozyten ATP freisetzen, welches ebenfalls an endotheliale P₂y₂-Rezeptoren binden kann [39].

Für eine Beteiligung von ATP bei der CO₂-induzierten Durchblutungssteigerung spricht, dass ATP bei der CO₂/H⁺-Chemorezeption in der rostralen ventrolateralen Medulla als Transmitter beteiligt ist und dort von Astrozyten freigesetzt wird [74]. Hawkins et al. zeigten, dass die CO₂/H⁺-induzierte Vasodilatation von kortikalen Gefäßen in Anwesenheit eines Antagonisten von ATP-Rezeptoren abgeschwächt war [53]. Dagegen war im retrotrapezoiden Nukleus, einer CO₂-sensitiven Region, die purinerge Signaltransduktion für eine Vasokonstriktion verantwortlich. Außerdem wurde gezeigt, dass ATP je nach Region, Rezeptorausstattung und -verteilung zur Dilatation und auch zur Kontraktion führen kann, wovon auch Horiuchi und Kollegen 2001 berichtet haben [53, 72]. Ein weiterer Hinweis zeigt sich in der Beobachtung, dass Erythrozyten unter Hypoxie und unter Hyperkapnie ATP abgeben [57]. Dieses ATP kann einerseits an purinergen Rezeptoren der Erythrozyten binden und diese zu weiterer ATP-Freisetzung stimulieren und andererseits an purinergen Rezeptoren der Endothelzellen binden, welche daraufhin ebenfalls ATP und NO freisetzen, was zur auto-/parakrinen Stimulation bzw. zur Vasodilatation führt [28]. Die Hinweise auf eine Beteiligung von einem endothelialen G_{q/11}-gekoppelten GPCR in den Vorergebnissen lassen in Kombination mit den Hinweisen auf die große Bedeutung von ATP

vermuten, dass ein endothelialer purinerge Rezeptor die CO₂-induzierte Durchblutungssteigerung vermitteln kann.

1.9 Fragestellung

Es gibt also zahlreiche Hinweise darauf, dass ATP bei beiden Mechanismen beteiligt ist. Daher stellt sich die Frage, welcher purinerge Rezeptor am wahrscheinlichsten eine Vasodilatation in der NVC und CO₂-induzierten Durchblutungssteigerung vermittelt. P₂Y₂-Rezeptoren werden nachweislich in Gehirndothelzellen exprimiert [75]. Des Weiteren führte eine Blockade des P₂Y₂-Rezeptors sowie des P₂Y₄-Rezeptors zu einer verminderten vaskulären Reaktivität [53]. Außerdem wurde gezeigt, dass der P₂Y₂-Rezeptor auch funktionell bei der ATP-induzierten Vasodilatation eine Rolle spielt [76].

Daher lässt sich vermuten, dass ATP über eine Aktivierung des gehirndothelialen P₂Y₂-Rezeptors zu einer Vasodilatation bei der NVC und CO₂-induzierten Durchblutungssteigerung beteiligt ist. Der Frage, ob diese Hypothese stimmt, soll nun im Folgenden nachgegangen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Siehe Anhang.

2.2 Ethische Stellungnahme

Die beschriebenen Tierversuche wurden von der Tierschutzkommission des Ministeriums für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Bundeslandes Schleswig-Holstein genehmigt. Die Mäuse waren in der separaten Tierhaltung mit einem 12-h-Tag-Nacht-Rhythmus sowie mit Futterpellets und Trinkwasser zur freien Verfügung in Kleingruppen von zwei bis fünf Tieren pro Käfig untergebracht. Alle Behandlungen der Mäuse wie die Tamoxifen-Injektionen und die Tötung der Tiere wurden ausschließlich von mir durchgeführt. Aktenzeichen: V 242-22822-2016 (38-3/16); V 242-22814-2016 (41-4/16)

2.3 Mauslinien

Es kamen zwei Mauslinien zum Einsatz: P_{2y2}^{beKO} und $G\alpha_{12/13}^{beKO}$. Dabei steht beKO für brain endothelial knockout. Bei der P_{2y2}^{beKO} -Linie und der $G\alpha_{12/13}^{beKO}$ -Linie handelt es sich um Mauslinien, die bisher noch nicht beschrieben sind. Zu jeder verwendeten Maus fand eine Nachgenotypisierung statt, um sicherzustellen, dass die genotypische Zuordnung korrekt war und die Ergebnisse sicher interpretierbar sind. Dazu wurde nach Tötung der Maus die Schwanzspitze entnommen, bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und nach Beendigung der Versuchsreihe mittels PCR der Genotyp festgestellt.

2.3.1 P_{2y2}^{beKO}

Um P_{2y2}^{beKO} -Mäuse zu generieren, wurde sich das Cre-loxP-System zu Nutzen gemacht. Die CreERT² ist eine optimierte DNA-Rekombinase, die von der Bakteriophage P1 abstammt und ein 34-bp-Sequenz-Motiv erkennt, auch loxP-Sequenz (locus of X-over of P1) genannt. Die Sequenz, die von zwei dieser Motive flankiert wird, wird in diesem Fall deletiert. Die Cre ist an die Ligand Binding Domain (LBD) des Estrogenrezeptors gekoppelt, sodass das Cre über den

Estrogenrezeptormodulator Tamoxifen und dessen aktiven Metaboliten 4-Hydroxytamoxifen (4-HT) aktiviert wird und im gebundenen Zustand in den Zellkern translozieren kann, wo es an die loxP-Sequenz bindet und diese aktiviert [77].

In diesem Fall wurde eine durch eine Mutation optimierte LBD verwendet, die sehr spezifisch für Tamoxifen ist und kaum durch endogenes Estrogen aktiviert werden kann. Diese optimierte Form wird T2 genannt.

Für die $P_{2y_2}^{beKO}$ -Linie wurden zwei Linien miteinander gekreuzt. Die erste Mauslinie (P_{2y_2} -flox-Linie) besaß dabei die loxP-Stellen im P_{2y_2} -Gen aller Zellen. Die zweite Mauslinie ($Slco1c1$ -CreER^{T2}-Linie) exprimiert die Cre-Rekombinase. Durch die Rekombination des P_{2y_2} -flox-Gens entsteht der induzierbare Knockout [28].

Um eine Spezifität für Gehirnendothelzellen zu erreichen, wurde sich der Genlocus des Solute carrier organic anion transporter 1c1 ($Slco1c1$) zu Nutze gemacht. $Slco1c1$ ist ein Transportprotein für Thyroxin und kommt ausschließlich in Gehirnendothelzellen und in Epithelzellen des Plexus Choroideus vor. Die Sequenz der Cre-Rekombinase wurde in diesen Locus gesetzt, sodass das Zielgen unter der Kontrolle dieses Promoters exprimiert wird. Dabei wurden der Genlocus und die Gensequenz der CreER^{T2} mit Hilfe eines bacterial artificial chromosomes (BAC) eingebracht. So entstand die $Slco1c1$ -CreER^{T2}-Linie [78].

Dadurch konnten Mäuse generiert werden, denen der P_{2y_2} -Rezeptor lediglich in den Gehirnendothelzellen fehlt. Die Linie P_{2y_2} -flox x $Slco1c1$ -CreER^{T2} wird im Folgenden $P_{2y_2}^{beKO}$ genannt. Als Kontrolle wurden Mäuse verwendet, die homozygot für die loxP-Stellen sind und damit ein gefloxtes P_{2y_2} haben und Cre-negativ sind. Die Kontrollmäuse wurden gleichermaßen mit Tamoxifen behandelt wie die Knockoutmäuse. Um den Knockout zu induzieren, wurde über einen Zeitraum von fünf Tagen zwei Mal täglich im Abstand von 12 Stunden 1 mg Tamoxifen pro 20 g Körpergewicht i.p. verabreicht. Die Lagerung der Tamoxifenlösung über höchstens sieben Tage fand bei +4 °C und Dunkelheit statt. Die Mäuse wurden in einem Zeitraum von vier bis zwölf Wochen nach Cre-Induktion verwendet.

2.3.2 $G\alpha_{12/13}^{beKO}$

Die $G\alpha_{12/13}^{beKO}$ ist auf Basis einer Mauslinie mit einem Gesamt-Tier-Knockout für das $Gna12$ -Gen ($G\alpha_{12}^{-/-}$) entstanden [69]. Da sich $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ gegenseitig ersetzen würden, müssen folglich, um einen Effekt dieses Signalwegs erkennen zu können,

beide G-Proteine ausgeschaltet werden. Für das Einfügen eines induzierbaren und gehirndothelspezifischen Knockouts wurde wieder das Cre-loxP-System, wie es zuvor beschrieben wurde, verwendet (Slco1c1-CreER^{T2}). Dabei flankierten die loxP-Stellen das Gna13-Gen [79]. Somit besteht ein Einfachknockout in allen Zellen für $G\alpha_{12}$ und ein Doppelknockout in den Gehirndothelzellen für $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$.

Um den Knockout im Gehirndothel für das Gna13-Gen zu induzieren, mussten die Mäuse mit Tamoxifen behandelt werden. Als Kontrolltiere wurden jeweils Geschwistertiere verwendet, die keine Cre-Rekombinase exprimierten und heterozygot für Gna12-Gen waren. Beide Genotypen erhielten Tamoxifen.

2.4 Quantitative PCR

2.4.1 RNA-Isolation aus PBECs

Erst erfolgte die RNA-Gewinnung aus den in der Endothelzellkultur konfluent gewachsenen Endothelzellen mit dem RNA-Nucleo-Spin-Kit[®] (Macherey & Nagel). Dazu wurde 300 μ l des RA1-Lysepuffers abweichend von der Anleitung des Herstellers ohne β -Mercaptoethanol auf die PBECs in einem Well gegeben, die Suspension in Reaktionsgefäße überführt, auf Eis gelegt und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die weiteren Schritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.4.2 cDNA-Synthese

Nach der RNA-Isolation erfolgte die Herstellung von cDNA mittels reverser Transkription. Dazu wurden 200 ng RNA pro Ansatz eingesetzt, welcher dann jeweils auf 35 μ l mit ddH₂O aufgefüllt wurde. Zu jedem Ansatz kamen 15 μ l Mastermix, bestehend aus 10 μ l Mouse Moloney murine leukemia virus (M-MLV) - Puffer (Promega), 1 μ l M-MLV-Transkriptase (Promega), 1 μ l Random Primer (Promega), 1 μ l RNasin (40 U/ μ l, Promega) und 2 μ l dNTPS (100 mM, Promega). Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine 90-minütige Inkubation bei 37 °C. Die gewonnene cDNA wurde bei -20 °C bis zur PCR-Durchführung gelagert.

2.4.3 Quantitative PCR

Die quantitative PCR wurde mit der real-time Methode durchgeführt und basiert auf der Detektion fluoreszierender Signale, die proportional zum PCR-Produkt generiert werden, sodass aus der Fluoreszenzstärke auf die ursprüngliche mRNA-Menge geschlossen werden kann. Dazu wurde der Farbstoff SYBR® Green I verwendet, der sich unspezifisch an Doppelstränge anlagert und zum Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG with ROX Invitrogen Cat. 11744-500 Kit gehört, das für die Durchführung der quantitativen PCR verwendet wurde. Alle Schritte fanden nach Anleitung des Kits statt. Dabei wurde eine cDNA-Probenmenge von 2 µl, das Primerpaar mP2ry2_Forward und mP2ry2_Reverse in einem Ansatz, sowie das Primerpaar mPpia_Forward und mPpia_Reverse des Housekeeping-Gens Cyclophilin A in einem anderen parallel mitgeführten Ansatz verwendet. Das Protein Cyclophilin A ist in allen Zellen in gleicher Menge vorhanden und konnte somit als Referenzgen eingesetzt werden. Außerdem kamen zu jedem Ansatz 3,0 mM MgCl₂. Begonnen wurde mit einer Inkubation von 2 Minuten bei 50 °C und danach 2 Minuten bei 95 °C. Daraufhin folgten 40 Zyklen mit 15 Sekunden bei 95 °C und folgenden 30 Sekunden bei 60 °C.

Zur Auswertung wurde jeweils der Zeitpunkt bestimmt, bei dem eine festgelegte Fluoreszenzstärke überschritten wurde, der cycle threshold-Wert (Ct-Wert). Der Ct-Wert einer parallel mitgelaufenen cDNA eines Referenzgens, in diesem Fall von Ppia, wurde daraufhin von dem Ct-Wert des Zielgens subtrahiert, sodass man den Δ Ct-Wert erhielt. Angegeben wurde der Wert $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2.5 Verhaltensversuche

Um mögliche Auswirkungen des Knockouts auf das Verhalten zu charakterisieren, wurden zwei verschiedene Verhaltensversuche durchgeführt. Zum einen das Open Field und zum anderen der Elevated Plus Maze Test. Durch die Verwendung von zwei Tests, die ähnliche Aussagen treffen, aber unterschiedlichen Störfaktoren haben, konnte eine zuverlässigere Schlussfolgerung gezogen werden.

Zu Beginn des Versuchstages und nach jeder Verschiebung des Gestells, was durch eingezeichnete Bodenmarkierungen überprüft werden konnte, wurde eine kurze Videoaufnahme zur Einstellung des Auswertungsprogramms gemacht. Bevor mit den Versuchen begonnen wurde, blieben die Mäuse nach dem Transport für eine halbe

Stunde in ihren eigenen Käfigen zur Akklimationierung im Versuchsraum. Außerdem wurde vor jedem Einzelversuch das Gestell mit dem Oberflächendesinfektionsmittel Virugard® gereinigt und gewartet, bis dieses vollständig verdampft war, um eine Reizung der Maus zu vermeiden. Lichtstärke, Raumtemperatur und Umgebungsgeräusche wurden konstant gehalten. Dann wurde eine Maus in die Mitte der Apparatur gesetzt und über eine Fernbedienung die Aufnahme gestartet. Beim Open Field wurde jede Maus 10 Minuten gefilmt, beim Elevated Plus Maze 5 Minuten. Währenddessen hat sich die messende Person möglichst ruhig verhalten und alle möglichen Störgeräusche notiert.

Die Auswertung der Filmaufnahmen fand über Videotracking mit Hilfe des Programms AnyMaze statt, wobei die Kategorien Distanz, mittlere Geschwindigkeit, Zeit in Immobilität und Zeit im Freezing im gesamten Feld, sowie Eintritte, Zeit, Distanz, Zeit immobil, Zeit freezing in den offenen Arm oder in der inneren Zone und in den geschlossenen Armen oder in der äußeren Zone separat untersucht wurden. Das Freezing ist die Zeit in der Angststarre, die von der Immobilität zu unterscheiden ist, bei der die Maus nicht läuft, aber noch natürliche Bewegungen, wie Kopf- oder Schwanzbewegungen zeigt. Die Zonen wurden mit AnyMaze virtuell festgelegt.

2.5.1 Open Field

Das Open Field ist eine 50 cm x 50 cm große, von 40 cm hohen Wänden eingegrenzte Fläche. Das Verhalten im Open Field ist ein geeigneter Test, um das Erkunden neuer Umgebungen bzw. Neugier, generelle Bewegungsaktivität und im ersten Screening ängstlichkeitsbezogene Verhaltensweisen validiert in Nagetieren zu erfassen [80]. Die Maus wird in einen Konflikt gestellt zwischen der natürlichen Intention, die neue Umgebung nach Futter und Paarungspartnern zu erkunden und sich vor Fressfeinden zu schützen, was physiologischen Stress verursacht. Die soziale Isolation, das helle Licht und die ungeschützte unbekannte Umgebung sind dabei zusätzliche Stressfaktoren [80, 81]. Demnach würde sich eine ängstliche Maus vermehrt in den wandnahen Randbereichen aufhalten, die im Versuch als äußere Zone definiert ist (Abbildung 4). Außerdem würde eine längere Zeit im Freezing auffallen. Eine gewöhnliche Maus würde wegen ihrer Neugier die Umgebung erkunden und deshalb weite Laufwege haben und sich zudem auch mehr in der inneren Zone aufhalten (Abbildung 4).

2.5.2 Elevated Plus Maze

Das Elevated Plus Maze ist ein Gestell in 50 cm Höhe mit vier aufeinander zulaufenden Armen, das 70 cm x 70 cm breit ist. Zwei gegenüberliegende Arme sind mit 15 cm hohen Wänden umgeben. Es ist ein gut etablierter Test, um Ängstlichkeitsverhalten in Mäusen zu erfassen [81]. Dabei wird die Maus ebenfalls in einen Konflikt gestellt zwischen ihrer natürlichen Intention, die neue Umgebung zu erkunden und Schutz vor Fressfeinden in dunklen Räumen zu suchen, was physiologischen Stress verursacht. In beiden Versuchsaufbauten existieren Bereiche, die Schutzraum bieten. Im Elevated Plus Maze sorgen die geschlossenen Arme für einen abgedunkelten und geschlossenen Raum (Abbildung 3). Demnach würden ängstliche Mäuse mehr Zeit und Strecke in den geschlossenen Armen verbringen als in den ungeschützten offenen Armen.

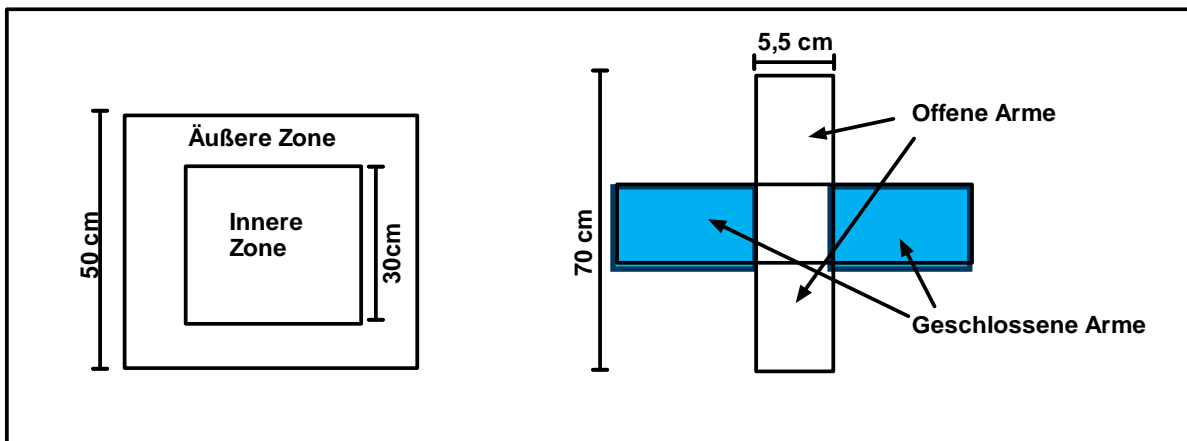


Abbildung 4: Aufbau des Open Field Test und des Elevated Plus Maze Test

Die linke Zeichnung zeigt den schematischen Aufbau des Open Field Test. Dabei stellt der äußere Kasten die Begrenzung des eigentlichen Feldes dar, während der innere Kasten eine gedachte Linie darstellt, die das Feld in eine innere und eine äußere Zone einteilt. Die rechte Zeichnung zeigt den schematischen Aufbau des Elevated Plus Maze Test. Der vertikale Kasten verdeutlicht den Bereich, der ohne Wände aufgebaut ist und somit die offenen Arme darstellt. Davon zur Seite abgehend sind horizontale Arme, die von einer 15 cm hohen Wand umgeben sind und somit die geschlossenen Arme darstellen.

2.6 Anlegen einer Endothelzellkultur aus primären Gehirndothelzellen

Die primären Gehirndothelzellen (Primary Brain Endothelial Cells, PBECS) wurden für die in vitro Calcium Imaging-Messungen und den quantitativen RNA-Nachweis

angefertigt [82]. In der ersten Kohorte wurden für jede Präparation ein bis zwei Mausgehirne des gleichen Genotyps gepoolt und auf sechs Wells einer 24-Well-Platte verteilt. Dabei wurden immer gleich viele Kontroll- und Knockout-Tiere verwendet. Es wurden immer zwei Präparationen parallel angefertigt, eine Kontrollgruppe und eine Knockoutgruppe. Bis auf die Entnahme der Gehirne erfolgten alle Schritte unter einer sterilen Sicherheitswerkbank. Außerdem gab es eine strikte Trennung aller verwendeten Materialien zwischen den Genotypen. Zur Vorbereitung wurde zuerst eine 24-Well-Platte mit runden, 12 mm breiten Deckgläschen bestückt und mit Kollagen beschichtet. Für die Beschichtung wurde zu dem Kollagen 0,05 M HCL (50 µg / ml) als Lösungsmittel gegeben und danach mindestens zehn Sekunden mit dem Vortex-Gerät gemischt. Dann wurden in jedes benötigte Well 200 µl dieser Lösung gegeben, die Platte für mindestens eine Stunde auf den Schüttler bei 25 rpm gestellt und dann bis zum Gebrauch bei 4 °C kühl gelagert. Die Medien wurden nach dem Mischungsverhältnis in Tabelle 5 angesetzt, wobei die Mengenangaben für zwei Präparationen vorgesehen sind und die Lagerung bis zum Gebrauch bei 4 °C stattfand.

Die Beschichtung der Platte und das Ansetzen der Medien erfolgten am gleichen Tag. Ab Beginn der Präparation wurden die Dextranlösung, das Arbeitsmedium und zwei Mal 25 ml PBS in einem Becherglas auf Eis gelagert. Zur Gewinnung der Gehirne wurde die Maus mit Isofluran narkotisiert, der Kopf mit einer Schere abgetrennt und in 70 %ige Ethanollösung getaucht. Danach wurde das Gehirn entnommen und in dem kalten PBS gelagert.

Das Cerebellum und der olfaktorische Bulbus wurden mit einem Skalpell abgetrennt. Danach wurden die Meningen und die größeren Gefäße durch Rollen über Whatmanpapier entfernt. Dieser Prozess wurde für alle Gehirne wiederholt.

Die Gehirne eines Pools wurden zusammen mit 5 ml Arbeitsmedium in einen Homogenisator überführt. Es erfolgten 30 Stöße mit dem schmalen Stößel A und 25 mit dem breiteren Stößel B des Homogenisators. Das Homogenisat wurde nun in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, weitere 5 ml Arbeitsmedium zum Ausspülen des Homogenisators verwendet und ebenfalls überführt. Als nächstes wurden die Proben bei 3500 rpm 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Dann wurde das Pellet in 15 ml Dextranlösung resuspendiert und mindestens zwei Minuten mit dem Vortex-Gerät gemischt, woraufhin bei 8000 rpm für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert wurde. In der Zwischenzeit wurde das Verdaumedium vervollständigt

(s.o.). Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 10 ml zimmerwarmem Verdaumedium resuspendiert und für 75 Minuten in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt, wobei die Proben alle 15 Minuten mit der Hand geschwenkt wurden. Daraufhin wurde die Zellsuspension bei 24 °C mit 3500 rpm 5 Minuten zentrifugiert, wonach der Überstand wieder abgesaugt und das Pellet dieses Mal in 10 ml zimmerwarmem PBS resuspendiert wurde. Die folgende Zentrifugation erfolgte zu den gleichen Bedingungen. In der Zwischenzeit wurde die beschichtete 24-Well-Platte zwei Mal mit PBS gewaschen. Außerdem wurde die benötigte Menge an Vollmedium (500 µl/Well) abgenommen und mit 16 µl Puromycin pro Well (entspricht 8 µg/ml) supplementiert. Da Endothelzellen das P-Glycoprotein im Gegensatz zu anderen Zellen der neurovaskulären Einheit stark exprimieren, können diese das zytotoxische Puromycin aus der Zelle hinaustransportieren und haben damit einen Überlebens- und Wachstumsvorteil, wodurch die Verunreinigung mit anderen Zellen verhindert wird. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet im Vollmedium resuspendiert, woraufhin 500 µl dieser Zellsuspension in jedes Well gegeben wurde. Die Platte kam daraufhin in den Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Am Folgetag wurden die Wells 2 Mal mit PBS gewaschen und mit Puromycin zugesetztem Vollmedium aufgefüllt. Die Mengen entsprachen denen vom Vortag. Am dritten Tag wurde das Medium mit Vollmedium ohne Puromycin ersetzt. Nach 5 bis 7 Tagen waren die Zellen konfluent und konnten für das Calcium Imaging und die quantitative PCR verwendet werden [82].

2.7 Calcium Imaging

Das Calcium Imaging beruht auf der Fura-2-Färbung von PBECs. Fura-2 ist ein Farbstoff, der Calciumionen komplexieren kann und je nachdem, ob er mit oder ohne Calcium gebunden vorliegt, ein unterschiedliches Anregungsmaximum hat. Das Anregungsmaximum der Calcium-gebundenen Form liegt bei 340 nm, das der ungebundenen Form bei 380 nm. Die Emission ist bei beiden Formen identisch und liegt maximal bei 510 nm. Somit kann man durch den Vergleich der Emissionsstärke bei den verschiedenen Anregungswellenlängen den intrazellulären Calciumgehalt detektieren [83]. Die Emissionen beider Anregungswellenlängen werden dafür ratiometrisch dargestellt. Das hat den Vorteil, dass unabhängig von der absoluten

Fluoreszenzintensität auf die intrazelluläre Calciumionenkonzentration geschlossen werden kann.

Verwendet wurden Fura-2-gefärbte konfluent gewachsene PBECs auf Deckgläschen, die 7-10 Tage alt waren. Dazu wurde eine Färbelösung angesetzt mit 5 µl Fura-2 einer 1 mM Stammlösung in DMSO, 2,5 µl Pluronic® einer 20 % Stammlösung, 1 ml Messpuffer und 10 µl Probenecid. Außerdem wurde eine Lösung mit 1 ml Messpuffer und 10 µl Probenecid angefertigt. Dabei sorgt Pluronic® als nicht-ionisches Surfactant für eine transiente Reduktion der Oberflächenspannung der Zellmembran, sodass das Fura-2 in die Zelle gelangen kann. Probenecid sorgt für die Hemmung des (renalen) organischen Anionentransporters und von Pannexinen, damit Fura-2 nicht wieder aus der Zelle hinausgelangen kann und somit in der Zelle verbleibt.

Mit dem Vortex-Gerät wurden die Substanzen vermengt und daraufhin unter Lichtschutz gelagert. Die Wells wurden mit PBS gewaschen, wonach 300 µl der Färbelösung auf jedes Well gegeben wurde. Nach 30-minütiger Inkubation im Brutschrank wurde die Färbelösung entfernt und ein weiterer Waschschrift mit PBS durchgeführt, woraufhin die Zellen mit 300 µl Probenecidlösung pro Well nochmals für 30 Minuten inkubiert wurden. Kontrolle und Knockout wurden jeweils parallel gefärbt. In der Zwischenzeit fand die mindestens 15-minütige Vorbeegasung des Puffers mit Carbogen (5 % CO₂ / 95 % O₂) statt. Des Weiteren wurde der Perfusor für die Pufferlösung auf 2 ml/min (entspricht 15 rpm) sowie die Perfusoren für die Stimulationlösungen 1:100 langsamer auf 0,02 ml/min eingestellt, damit die Stimulationlösungen 1:100 verdünnt wurden.

Gemessen wurde mit dem Programm Live Acquisition. Mit dem Programm wurden willkürlich 20 gefärbte Zellen ausgewählt und als Regions of Interest (ROIs) definiert. Diese ROIs wurden nicht ausgewertet, sondern für die Beobachtung des Verlaufs der Messung verwendet, um z.B. mögliche Störungen im Versuchsaufbau direkt erkennen und beheben zu können.

Außerdem wurde die Belichtungszeit der Anregungswellenlängen so verändert, dass die Basallinie des Quotienten der Emissionen bei den Anregungswellenlängen von 340 nm und 380 nm in etwa bei eins lag. Es wurde jeweils über 5 Minuten gemessen und nach einer Minute für 30 Sekunden stimuliert. An einem Ausschnitt der Endothelzellkultur fanden 3 Messungen statt, je eine Messung mit 10 µM ATP, eine mit 100 µM ATP und eine mit 33 µM Carbachol in der angegebenen Reihenfolge.

Zur Auswertung wurden mit dem Programm Fiji 30 ROIs auf die Zellen gelegt, die bei der Stimulation mit Carbachol mit einer optisch erkennbaren Zunahme der Helligkeit reagiert haben, damit man sicher sein konnte, dass die ausgewerteten Zellen noch funktionstüchtig und vital waren und auf $G\alpha_{q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren mit einem Calcium-Anstieg reagieren können. Diese ROIs wurden dann auf die ATP-Bilder übertragen und an diesen Stellen der gemittelte Grauwert für jede Sekunde bestimmt. Um die Reaktivität der Zelle zu quantifizieren, wurde eine Schwelle definiert, ab der eine Zelle als antwortende Zelle galt. Wenn die Zelle über die gemessene Zeit mehr als 10 % im mittleren Grauwert in Bezug zu ihrem Ausgangswert heller wurde, wurde dies als Antwort gewertet. Daraufhin wurde bestimmt, welcher Anteil der 30 betrachteten Zellen diese Schwelle überschritt.

2.8 Laser Speckle Contrast Imaging (LSCI)

Die Laser Speckle Technik wurde erstmals in den 80er Jahren eingeführt und ist eine Methode, um in hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung in Echtzeit in einem großen Feld den relativen Blutfluss zu messen [84].

Das physikalische Prinzip dahinter ist zusammengefasst Folgendes: Mit Laser wird ein Objekt beleuchtet, woraufhin das darauf treffende Licht zu einem Teil absorbiert, aber zu einem großen Teil auch reflektiert wird. Das reflektierte Licht trifft dann auf einen Detektor. Ein Speckle-Muster entsteht durch die Interferenz von Licht der gleichen Frequenz, das verschiedene optische Weglängen hat, um den Detektor zu erreichen, sodass ein Muster von hellen und dunklen Punkten ergibt. Wenn sich ein Objekt nicht bewegt, bleibt dieses Muster statisch mit einem hohen Kontrast zwischen den Punkten. Bewegt sich ein Objekt, entstehen Veränderungen im Speckle-Muster. Für kleine Bewegungen eines soliden Objekts bewegt sich das Speckle-Muster als Ganzes, das heißt die Speckle bleiben in Korrelation und der Kontrast zwischen den Punkten bleibt hoch. Für größere Bewegungen dekorreliert das Speckle-Muster und es kommt zu einer Kontrastabnahme [85]. Das passiert auch, wenn das Licht durch eine große Anzahl von einzelnen Bewegungen, z.B. Partikel einer Flüssigkeit, reflektiert wird.

Daher ist anzunehmen, dass das Frequenzspektrum dieser Fluktuation bzw. die Dekorrelationszeit von der Geschwindigkeit der Bewegung abhängig ist. Die Stromstärke des Blutes und damit die Perfusion eines Organs hängt nach dem

Kontinuitätsgesetz u.a. von der Geschwindigkeit des Blutes ab. Daher kann die abgeleitete Geschwindigkeit des Blutes im LSCI als Maß für die Durchblutungssteigerung verwendet werden. Es handelt sich jedoch um eine relative Veränderung eines Musters, sodass das System vor der Messung auf einen Basiswert kalibriert werden muss und auch nur relative Werte abgeleitet werden können, die lediglich innerhalb des Versuchssystems vergleichbar sind [85].

2.9 Zerebrale Blutflussmessung unter neuronaler Stimulation (NVC) und Hyperkapnie

Für die Untersuchung der NVC und der CO₂-induzierten Durchblutungssteigerung wurde an den Mäusen der zerebrale Blutfluss unter der jeweiligen Stimulation mit dem LSCI untersucht. Das Protokoll für diese Messungen wird im Folgenden erläutert.

Zuerst wurde die Maus in eine Kammer gesetzt, die mit 30 ml/min O₂, 70 ml/min N₂ und 2,5 % Isofluran begast wurde. War die Maus narkotisiert und atmete mit einer deutlich verringerten Frequenz, wurde das Gas auf die Beatmungsmaske am OP-Tisch umgelenkt und die Maus auf den OP-Tisch mit der Schnauze unter die Maske gelegt. Damit die Maus nicht auskühlt, kam eine auf 37,5 °C regulierte Wärmeplatte zum Einsatz. Die Fixierung der Maus erfolgte durch zwei Klebebänder.

Nach Überprüfung des Zwischenzehenreflexes wurde bei dessen Ausfall begonnen, die Haut über dem Hals mit einer kleinen Schere einzuschneiden, sodass das OP-Gebiet zur Tracheotomie frei lag. Dafür wurden die zwei nun offenliegenden Fettpolster stumpf auseinandergesogen und der Musculus strenohyoideus über der Trachea mit der spitzen Seite der Pinzette geteilt. Dann wurde ein OP-Faden unter die Trachea gelegt und zu einem losen Knoten gebunden. Nach dem Einstellen der Beatmungsmaschine wurde die Trachea zur Hälfte eingeschnitten, woraufhin der Luftstrom auf den Endotrachealtubus umgeleitet und dieser in die Trachea eingeführt wurde. Wenn der Tubus richtig lag, was an der Thoraxexkursion und einem CO₂-Gehalt der Ausatemluft von über 30 mmHg feststellbar war, wurde die Ligatur festgezogen, um ein Verrutschen des Tubus zu vermeiden. Die Messungen des Kapnometers wurden mit Hilfe des Programms LabChart7 aufgezeichnet. Um die Narkose auf Ketamin umzustellen und um ein Gegenatmen zu vermeiden, wurde nun

pro Gramm Mausgewicht 10 µl Ketamin-Xylazin-Lösung mit 7 mg/ml Ketamin und 1,63 mg/ml Xylazin i.p. gespritzt.

Dann wurden die Klebestreifen zur Fixierung entfernt, woraufhin die Maus umgedreht und mit den Schneidezähnen in eine dafür vorgesehene Halterung eingehakt wurde. Der Kopf wurde durch zwei seitliche Stäbe fest fixiert. Da die Haare als Quelle für Artefakte stören, wurde die Kopfhaut mit der Schere entfernt. Um die Schädeldecke vor Austrocknung zu schützen, wurde sie mit klarem Paraffinöl bedeckt. Außerdem wurde eine Elektrode am vorderen und eine am hinteren Ende des Whisker pads eingeführt (siehe Abbildung 5).

Da nun alle schmerzhaften Eingriffe erfolgt sind und für eine aussagekräftige Messung des Blutflusses die Maus frei von Isofluran sein sollte, wurde dieses nun abgestellt. Für die weitere Aufrechterhaltung der Narkose wurde alle 30 bis 40 Minuten 5 µl Ketaminlösung mit 7 mg/ml Ketamin pro 1 g Körpergewicht i.p. nachgespritzt.

Für die NVC-Messung wurde eine niedrige Auflösung und dadurch ermöglicht eine hohe Aufnahme rate von 25 Hz gewählt (siehe Abbildung 6 linke Seite). Des Weiteren wurden die ROIs gesetzt. Die Abbildung 6: Gehirnperfusion im Speckle Imaging zeigt die Lokalisation der ROIs. Die ROIs 1, 2 und 3 befanden sich auf dem den Elektroden gegenüberliegenden sensomotorischen Kortex, ROI 4 auf dem Kortex der gleichen Seite und ROI 5 auf dem frontalen Kortex in der Nähe der Elektroden. Im Programm MC Stimulus II wurde zuvor ein Protokoll zur Steuerung des Stimulators gewählt, das 5 Mal im Abstand von einer Minute 5 Sekunden mit 5 Hz und 750 µA stimuliert. Der minimale Abstand zwischen dem Abstellen des Isoflurans und Messung betrug 10 Minuten. Zur genaueren Lokalisation des sensomotorischen Kortex wurde nun probeweise stimuliert und die ROIs 1, 2 und 3 auf die Stellen mit der größten Flusszunahme gelegt. In der Messung wurde eine Minute Basallinie aufgezeichnet und dann die Stimulation gestartet.

Für die CO₂-Versuche wurde eine hohe Auflösung mit einer Aufnahme rate von 0,25 Hz gewählt und die ROIs auf die großen Gefäße gelegt. Nur ROI 1 blieb zum Vergleich an der bisherigen Stelle. Zum Beginn der Messung befand sich kein CO₂ in der Beatmungsluft (70 ml/min N₂ und 30 ml/min O₂). Nach 5 Minuten wurde das Gasgemisch auf 10 % CO₂ umgestellt (10 ml/min CO₂, 60 ml/min N₂ und 30 ml/min O₂), woraufhin nach 15 Minuten Stimulation wieder auf das Ausgangsgasgemisch für eine Auswaschphase von 15 Minuten umgestellt wurde. Dann wurde für 15 Minuten

mit 20 % CO₂ stimuliert (20 ml/min CO₂, 50 ml/min N₂ und 30 ml/min O₂) und daraufhin für 15 Minuten unter dem Ausgangsgasgemisch ausgewaschen.

Am Ende wurde die Narkose vertieft, wonach die Maus mit einer 2 U/ml Heparin-Ringer Lösung transkardial durch den linken Ventrikel bei eröffnetem rechtem Vorhof perfundiert wurde. Dann wurde die Maus durch Dekapitation getötet, das Gehirn entnommen, gewogen und bei -80 °C eingefroren. Außerdem wurde die Schwanzspitze zur Nachgenotypisierung entnommen.

Ausgewertet wurde nachher die Flusskurve des ROIs mit der größten Flusszunahme. Die jeweiligen ROI-Standorte wurden als Bild gespeichert. Bei der NVC wurde der Zeitbereich eine Sekunde vor Stimulation bis 15 Sekunden nach Stimulationsbeginn ausgewertet. Für die relativen Werte wurden die letzten 5 Sekunden vor der Stimulation gemittelt und als Basalwert verwendet. Bei den CO₂-Versuchen wurde der Zeitraum 5 Minuten vor Stimulation, die Stimulationszeit von 15 Minuten und die folgenden 15 Minuten ausgewertet. Für die relativen Werte wurden die Werte der ersten 5 Minuten gemittelt und als Basalwert verwendet. Außerdem wurde aus den Einzelkurven beider Versuche die AUC (Fläche unter der Kurve) und die Maxima bestimmt und aufgetragen. Für die NVC wurde zusätzlich der Zeitpunkt des halben Maximums bestimmt. Dazu wurde manuell der Zeitpunkt des ersten Überschreitens der Hälfte des Maximums nach Stimulationsbeginn bestimmt. Da für die Analyse jeweils ein Bild alle 200 Millisekunden ausgewertet wurde, ist dieser Wert also bis auf 0,2 Sekunden genau.

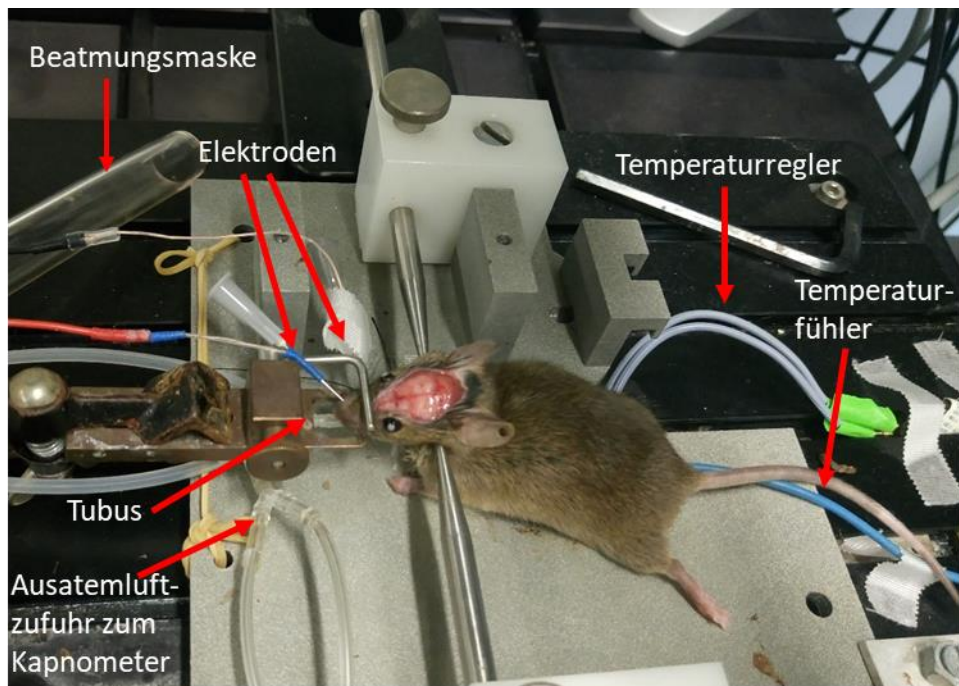


Abbildung 5: Messaufbau Laser Speckle.

Die Elektroden für die Neurovaskuläre Kopplung grenzen das Whiskerpad diagonal ein. Von der linken Bildseite aus verlaufen zwei milchige Schläuche, die das Gasgemisch zum Tubus führen. Diese sind außerdem mit den zwei durchsichtigen Schläuchen verknüpft, die die Ausatemluft zur Messung des CO₂-Gehaltes zum Kapnometer führen (nicht im Bild). Der dickere Schlauch links oben stellt die Beatmungsmaske dar, die vor der Intubation zum Einsatz kommt und unter dem gelben Gummi fixiert werden kann. Die Maus liegt auf einer beheizbaren Platte, die über einen Rückkopplungsmechanismus reguliert wird. Dabei wird die aktuelle Temperatur von dem Temperaturfühler gemessen, woraufhin über den Temperaturregler eine an der Platte angebrachte Heizfolie angesteuert wird. Der Kopf der Maus wird seitlich von verstellbaren Stäben und an der Schnauze von einer Klemme fixiert.

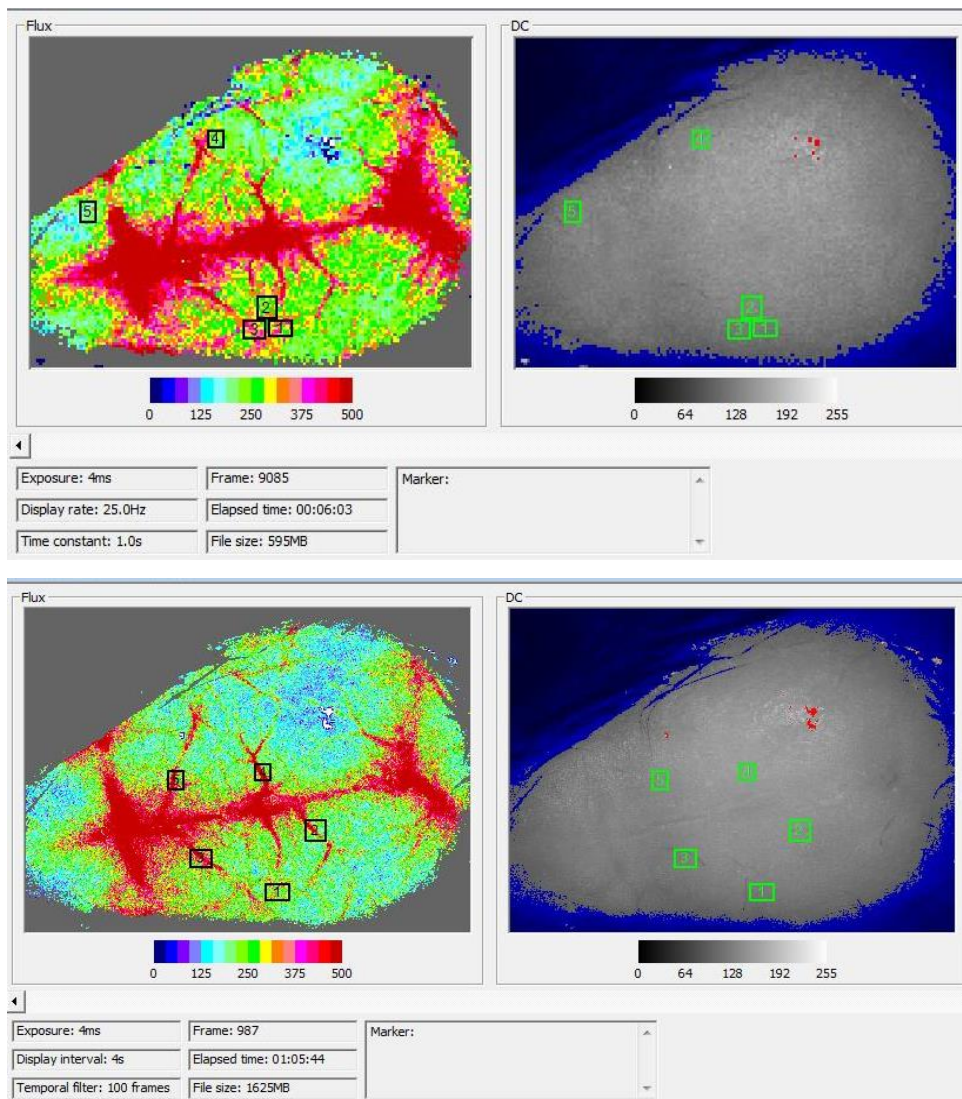


Abbildung 6: Gehirnperfusion im Speckle Imaging

Gezeigt sind Speckle-Kamera-Bilder des Gehirns in dem Bereich, wo die Kopfhaut entfernt ist. Es sind Beispielbilder für die Positionen der ROIs 1-5 während der NVC (oberes Bild) und während der CO₂-Versuche (unteres Bild). Das linke Bild stellt jeweils den relativen Blutfluss, hier Flux genannt, dar. Dabei wird durch vorherige Kalibrierung ein Nullpunkt festgelegt, auf dem eine artifizielle Skala bis zum Wert 500 [-] aufbaut. Die Größe dieser Zahlen ist durch eine Farbe im Bild codiert. Das jeweils rechte Bild zeigt simultan die Kameraaufnahme des Schädels in Graustufen. Außerdem zu entnehmen sind jeweils die Belichtungszeit (Exposure), die Bildgröße (Frame), die Aufnahmezeitpunkt (Elapsed time), der zeitliche Filter (Temporal filter) und die Dateigröße (File size).

2.10 Anfertigen von unfixierten Kryoschnitten

Die Temperatur im Kryoslicer wurde auf -18 °C eingestellt. Die Messerklinge wurde zum Vorkühlen für 10-15 Minuten auf den Objektträgertisch gelegt und die Schnittdicke auf 20 µm eingestellt. Nach dem Einspannen des Messers wurde ein Gehirn mit Hilfe des Einbettmediums von Leica auf einer Trägerplatte befestigt und dabei so hochkant ausgerichtet, dass die bulbi olfactorii nach oben zeigten und die fissura longitudinalis cerebri mittig und im rechten Winkel zur Platte lag. Nach Aushärten des Mediums bei -18 °C wurde die Trägerplatte in die Halterung eingespannt. Der vordere Bereich des Gehirns wurde verworfen, bis der Anfangsbereich des Kortexes erreicht wurde. Die danach folgenden Schnitte wurden auf die Superfrost Plus Objektträger durch leichtes Andrücken übertragen. Die fertigen Objektträger wurden dann bis zur Färbung bei -20 °C gelagert

2.11 Immunfluoreszenzfärbung von unfixierten Kryoschnitten

Zur Beurteilung inwiefern ein fehlender endothelialer P₂Y₂-Rezeptor Einfluss auf die Gefäßstruktur und die Funktion der Blut-Hirn-Schranke (BHS) hat, wurden Immunfluoreszenzfärbungen von Gehirnschnitten angefertigt.

Die zu färbenden Schnitte wurden aus der Lagerung bei -20 °C geholt und 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Daraufhin wurden die Objektträger in eine Küvette gestellt, die dann zur Fixierung der nun aufgetauten Schnitte für 10 Minuten bei -20 °C in ein Methanolbad gestellt wurde. Das Methanol fixiert durch Wasserentzug und hat den Vorteil, dass es z.B. im Gegensatz zu Formalin die Antigenbindungsstellen weniger maskiert [86].

In der Zwischenzeit wurden feuchten Kammern vorbereitet, indem Papiertücher auf den Boden der Zwischenräume der Kammerboxen gelegt und mit Leitungswasser getränkt wurden. Danach erfolgte ein Waschschrift bei Raumtemperatur in PBS für 5 Minuten. Nach Abtrocknen der Ränder wurden je zwei zusammen gefärbte Schnitte mit dem DAKO-Pen umrandet und der Objektträger auf die Stege der feuchten Kammer gelegt. Der DAKO-Pen ist ein Fett-Stift, der dafür sorgt, dass die wässrigen Färbelösungen in dem umrandeten Bereich verbleiben, damit die gewünschte Konzentrationen z.B. des Antikörpers auf dem Schnitt erreicht werden können. Jedes mit dem DAKO-Pen umrandete Feld wurde mit 100 µl 1 %iger BSA-Lösung bedeckt. Die BSA-Lösung blieb bei geschlossener Kammer für mindestens 30 Minuten auf

den Schnitten und sorgte für eine Abdeckung unspezifischer Antigene, sodass der Antikörper nicht daran binden konnte. In der Zwischenzeit wurden die Antikörper in der 1 %igen BSA-Lösung verdünnt. Dabei wurden die Antikörperansätze vor Gebrauch kurz mit dem Vortex-Gerät gemischt, was auch nochmal mit der Verdünnung geschah. Nach 30 Minuten wurde die BSA-Lösung von den Objektträgern abgetropft und 100 µl der Antikörperverdünnung auf das entsprechende umrandete Feld gegeben. In der geschlossenen feuchten Kammer blieben die Schnitte über Nacht bei 4 °C gelagert.

Am nächsten Tag wurde in einem abgedunkelten Raum gearbeitet und die Schnitte wenn möglich im dunklen Schrank oder in der geschlossenen feuchten Kammer gelagert, da der Fluoreszenzfarbstoff, der an die Sekundärantikörper gekoppelt ist, von der Raumbelichtung angeregt werden würde und nach längerer Anregung ausbleichen würde. Es fanden zuerst drei Waschschriffe je 5 Minuten in PBS statt. Währenddessen wurde der sekundäre Antikörper in einer Lösung mit 0,1 µg/ml DAPI für die Kernfärbung und 1 % BSA verdünnt. Danach wurden die Objektträger abgetropft und 100 µl der Verdünnung auf zwei Schnitte gegeben. Nach einer einstündigen Inkubationszeit erfolgten wieder drei Waschschriffe je 5 Minuten in PBS. Zum Schluss wurden nach Abtropfen der Objektträger zwei Tropfen Mowiol/DABCO als Eindeckmedium auf den Objektträger gegeben und ein Deckgläschen blasenfrei aufgebracht.

2.12 Mikroskopie und Auswertung der Gehirnschnitte

Für die Aufnahmen der Bilder wurde das Mikroskop Leica DMI 6000B und das Programm LAS-AF verwendet. Der Objektträgertisch wurde initialisiert, im Setup wurde das 10x Objektiv ausgewählt und so viele Kanäle, wie messbare Farbstoffe vorhanden sind, angewählt.

Die Auswertung mit dem Programm Fiji fand nach vier Parametern statt: IgG-Menge, Gesamtgefäßlänge, der mittlere Gefäßdurchmesser und String Vessels.

Die relative Menge an IgG im Extravasalraum ist ein Indikator für die Dichtigkeit der Bluthirnschranke. Bestimmt wurde die Farbintensität mit dem mittleren Grauwert des Gesamtbildes. Dieser wurde von zwei Gehirnschnitten jeweils mit einem Bild von jeder Hemisphärenseite bestimmt. Die Gesamtgefäßlänge und -anzahl wurde mit Hilfe eines Makros ausgewertet. Dieses hat die Techniken Reduktion des

Rauschens, Segmentierungen und das Skeletonize-Plugin (Definition, Markierung und Ausmessen der Gefäße anhand einer größeren Helligkeit im Vergleich zum Hintergrund) von Fiji automatisiert hintereinander ablaufen lassen. Daraus wurde die Anzahl der Gefäßfragmente und die summierte Länge abgeleitet. Des Weiteren wurde der Durchmesser der 30 dicksten Gefäße ausgemessen und gemittelt.

Außerdem wurden sogenannte String Vessels ausgewertet. String Vessels sind leere Basalmembranhüllen, die nicht mehr durchblutet werden. Diese sind dynamische Gebilde. Durch einen unbekanntem Auslöser gehen die Endothelzellen zugrunde und lassen die Basalmembran zurück, die mit der Zeit aber auch wieder abgebaut werden kann [21]. Für die String Vessel-Auswertung wurde ein Gehirnschnitt pro Gehirn und jeweils ein Bild pro Hemisphärenseite ausgewertet. Dazu wurden die Kollagen IV-Färbung, die die Basalmembranen abbildet, mit der CD31-Färbung, die die Endothelzellen abbildet, verglichen und alle erkennbaren Gefäße und Punkte, die in der Kollagenfärbung, aber nicht in der CD31-Färbung zu sehen waren, der Länge nach markiert und ausgemessen. Die Summe der Längen wurde ins Verhältnis zur Gesamtgefäßlänge und die Anzahl der String Vessels ins Verhältnis zur Gesamtgefäßanzahl gesetzt.

2.13 Statistik

Für die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde das Programm GraphPad Prism 5 zur Hilfe genommen. Damit wurde bei mehr als einer Variable und Normalverteilung ein Two-way-ANOVA mit anschließendem Bonferroni-Postdoc-Test durchgeführt. Wenn es nur eine Variable zu vergleichen galt und eine Normalverteilung vorlag, wurde ein beidseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 0,05$ verwendet. Außerdem kam die Bestimmung der Area unter the curve (AUC) zum Einsatz. Maxima wurden mit Hilfe von Excel bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Verifizierung des Erfolgs der Cre-Induktion

Wenn die Cre-Rekombinase in den Cre-positiven Mäusen erfolgreich mit Tamoxifen induziert wurde und diese die richtige Gensequenz ausgeschnitten hat, müsste die mRNA-Menge dieses Gens und der P_{2Y2}-Rezeptor als Endprodukt in den Endothelzellen nicht mehr bzw. in deutlich geringerer Menge vorliegen. In Abbildung 7 ist zu sehen, dass in der qPCR der PBECs eine signifikante Verringerung der mRNA-Menge des P_{2Y2}-Gens im Vergleich zu den Cre-negativen Mäusen vorlag.

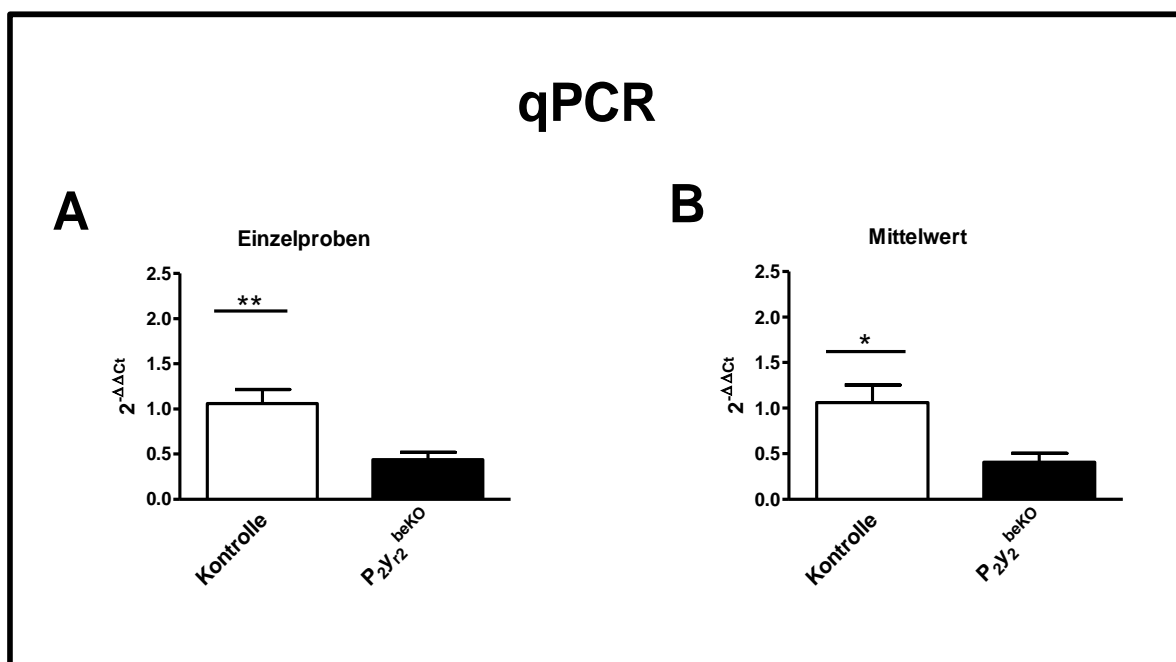


Abbildung 7: qPCR der kultivierten PBECs

In A dargestellt sind die 2^{-ΔΔCt}-Werte der qPCR der fünf bis sechs Einzelproben je Genotyp. In B wurden die 2^{-ΔΔCt}-Werte aller Einzelproben einer Hirnpräparation getrennt nach Genotyp gemittelt und aufgetragen (n=3). Es sind der Mittelwert der Einzelproben bzw. der gepoolten Proben und die Standardfehler vom Mittelwert angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test zu einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$.

Da im Endeffekt der Verlust des Proteins, also des P_{2Y2}-Rezeptors und damit seiner Funktion, von entscheidender Bedeutung war, wurden zum funktionellen Nachweis dieses Verlusts Ca²⁺-Imaging-Experimente an PBECs durchgeführt. Wenn der Agonist ATP an den Rezeptor bindet, löst das eine intrazelluläre Signalkaskade, vermittelt durch die G-proteine der G $\alpha_{q/11}$ -Familie, aus, die durch einen transienten Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration sichtbar wird.

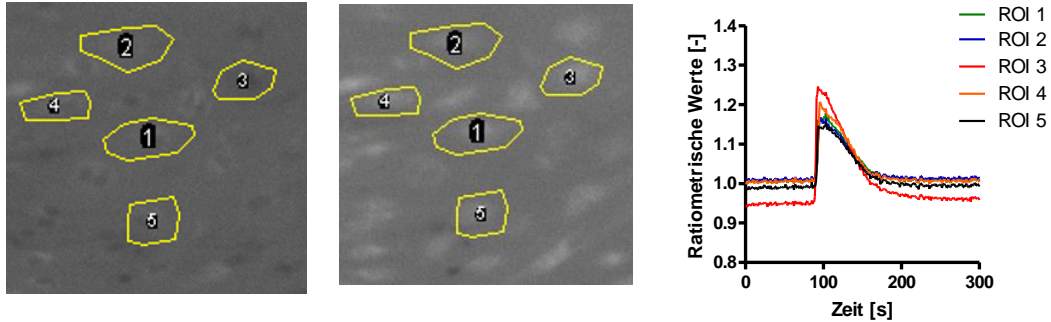
Als Kontrollstimulus, um sicher zu gehen, dass die gemessenen Zellen vital sind, wurde Carbachol verwendet. Carbachol bindet an muskarinerge Rezeptoren und löst bei den M1-, M3- und M5-Subtypen die gleiche Signalkaskade aus, wobei beschrieben wurde, dass u.a. der M5-Rezeptor auf Gehirndothelzellen vorhanden ist [87].

Wie man in Abbildung 8 sehen kann, wurde eine Schwelle festgesetzt, ab der eine Zelle als antwortende Zelle galt. Je mehr freies Calcium in der Zelle vorliegt, desto höher ist der Calcium-gebundene Anteil des Fura-2-Farbstoffes und desto größer ist die Emission und damit die Helligkeit unter der Anregung mit 340 nm Wellenlänge. Dagegen nimmt im Verhältnis dazu die Emission bei einer Anregung bei 380 nm ab. Wenn sich also eine Zelle um mehr als 10% in diesem ratiometrischen Messwert im Verhältnis zu ihrem Basalzustand verändert hat (in Richtung einer Zunahme der Emission bei 340 nm und einer Abnahme der Emission bei 380 nm), wurde diese Schwelle überschritten.

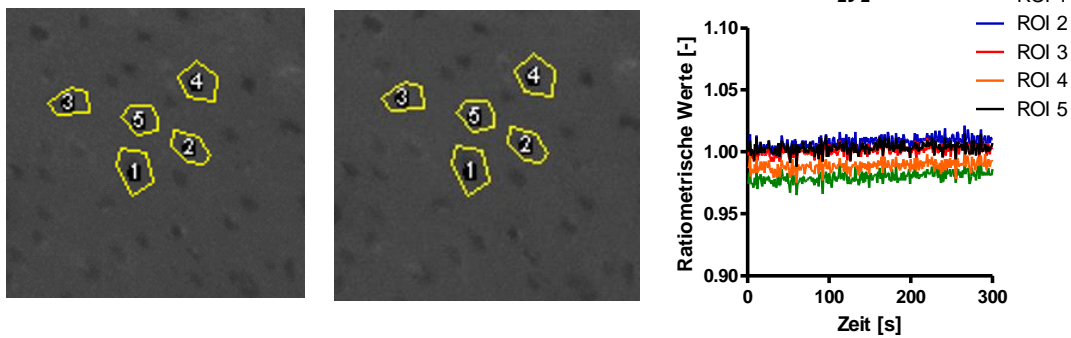
Von 30 auf Carbachol antwortenden und gemessenen Zellen je Probe wurde jeweils der Anteil der auf ATP antwortenden Zellen dargestellt. Die Reaktion war abhängig von der ATP-Konzentration. In Abbildung 8 zeigt sich, dass vor allem bei der geringen Konzentration von 10 μM ATP die Knockout-Zellen kaum bis gar nicht reagierten, sodass sich ein signifikanter Unterschied darstellte. Betrachtet man die Reaktion unter der gleichen Schwelle bei 100 μM ATP, gab es keinen signifikanten Unterschied mehr. Bei Erhöhung der Schwelle auf 20 % antwortete unter 10 μM ATP keine der untersuchten Knockout-Zellen. Hier war die Antwortrate im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls signifikant erniedrigt. Unter 100 μM ATP war unter der 20 %-Schwelle kein Unterschied festzustellen (nicht gezeigt).

Calcium Imaging

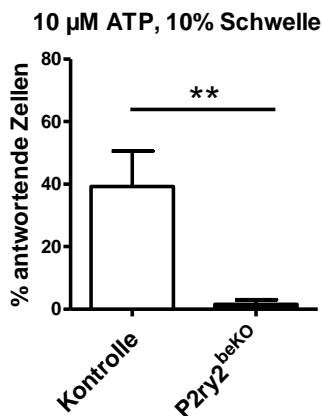
A Beispiel Kontrolle



B Beispiel $P_{2Y_2}^{beKO}$



C



D

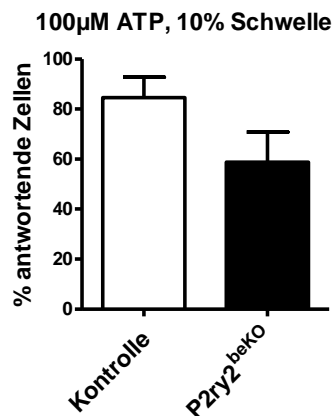


Abbildung 8: Calcium Imaging

In allen Teilen dieser Abbildung handelt es sich um Calcium Imaging-Versuche mit Präparationen von PBECs mit ein bis zwei Gehirnen auf sechs Deckgläschen pro Präparation. Zum Zeitpunkt der Messungen betrug das Alter der PBECs sieben bis zehn Tage. In Teil A und B wird der Analysevorgang verdeutlicht. Dabei wurden die ratiometrischen Bilder verwendet. Beispielhaft wurden fünf ROIs auf die Zellen gelegt und pro Sekunde ein gemittelter Grauwert eines jeden ROIs

aufgetragen (rechts zu sehen). Das jeweils linke Bild zeigt einen Zeitpunkt im Basalzustand, das mittlere Bild im angeregten Zustand unter 10 μM ATP. In dem Versuch wurden jeweils neun bis elf Deckgläschen je Genotyp gemessen. Mit jeder Probe wurden drei Messungen je 5 Minuten durchgeführt. Stimuliert wurde jede Probe von Sekunde 60 bis 90 jeweils mit 10 μM ATP, 100 μM ATP oder 100 μM Carbachol. In C wurde von 30 auf Carbachol antwortenden Zellen je Probe jeweils der prozentuale Anteil der auf 10 μM ATP antwortenden Zellen dargestellt. In D die auf 100 μM antwortenden Zellen. Eine positive Antwort wurde gewertet, wenn sich eine Zelle mehr als 10 % in diesem ratiometrischen Messwert im Verhältnis zu ihrem Basalzustand verändert hat (in Richtung einer Zunahme der Emission bei 340 nm und einer Abnahme der Emission bei 380 nm). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test zu einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$.

3.2 Charakterisierung der $P_2y_2^{\text{beKO}}$ -Linie

Da die $P_2y_2^{\text{beKO}}$ -Linie neu ist und bisher keine Informationen zu dem Phänotyp dieser Linie existieren, wurden grundlegende Daten wie der Gewichtsverlauf dokumentiert. Im Verlauf des Körpergewichts gab es zwischen den Genotypen keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 9). Der Einbruch zu Beginn der Kurve mit anschließender Erholung des Körpergewichts über den Startwert hinaus ist durch die Tamoxifen-Injektionen zu erklären (Abbildung 9).

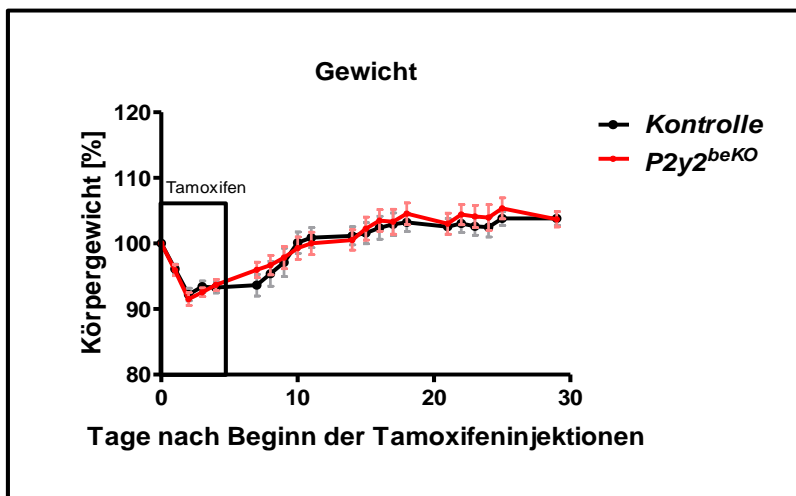


Abbildung 9: Gewichtsverlauf der $P_2y_2^{\text{beKO}}$ -Linie

Diese Abbildung zeigt den relativen Körpergewichtsverlauf im Verhältnis zum Startgewicht (= 100 %) über einen Zeitraum von 30 Tagen. Der eingezeichnete Kasten verdeutlicht den Zeitraum der Tamoxifengabe. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Der transiente Abfall innerhalb der ersten fünf Tage ist ein bekannter Tamoxifen-Effekt. Zur statistischen Analyse wurde das Two-Way-ANOVA mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ verwendet. $n = 11-16$.

In vorausgegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe bei der $G\alpha_{q11}^{\text{beKO}}$ -Linie im Open Field und im Elevated Plus Maze Test wurde ein verstärktes Ängstlichkeitsverhalten beobachtet. Daneben war eine gestörte

Durchblutungsregulation beobachtet worden. Das legt nahe, dass Ängstlichkeitsverhalten und Durchblutungsregulation in einem engen Zusammenhang stehen könnten. Da der P_{2Y2} -Rezeptor u.a. $G_{\alpha q/11}$ -gekoppelt ist und die Forschungshypothese besagt, dass eine Störung der Durchblutungsregulation zu erwarten ist, wäre in diesem Zusammenhang auch eine Störung im Verhalten zu erwarten gewesen. Deshalb wurde die P_{2Y2}^{beKO} -Linie in diesen beiden Tests untersucht.

Die Ergebnisse der zuvor untersuchten $G_{\alpha q/11}^{beKO}$ -Linie zeigte im Vergleich zur Kontrolle mehr Immobilität, sowohl im Open Field Test wie auch im Elevated Plus Maze. Dieses Ergebnis ließ auf ein deutlich verstärktes Ängstlichkeitsverhalten schließen. Betrachtet man die Ergebnisse zur Immobilität bei der P_{2Y2}^{beKO} -Linie in Abbildung 10 A und Abbildung 11 A, so zeigt sich hier keine gesteigerte Immobilität in der Knockoutgruppe. Ebenfalls war bei der $G_{\alpha q/11}^{beKO}$ -Linie auffällig, dass sich die Knockoutmäuse länger in den geschützten Zonen aufhielten, also in der Äußeren Zone im Open Field Test und in den geschlossenen Armen im Elevated Plus Maze, wohingegen die Zeit in der inneren Zone und in den offenen Armen dementsprechend verkürzt war. Die P_{2Y2}^{beKO} -Linie zeigte jedoch in keinem dieser Punkte einen Unterschied zur Kontrolle (Abbildung 10 B, sowie Abbildung 11 B). Zur weiteren allgemeinen Charakterisierung der Aktivität wurden auch noch die Übertritte zwischen den Zonen und die insgesamt zurückgelegte Strecke untersucht, wie in Abbildung 10 C und D sowie Abbildung 11 C und D zu sehen ist. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

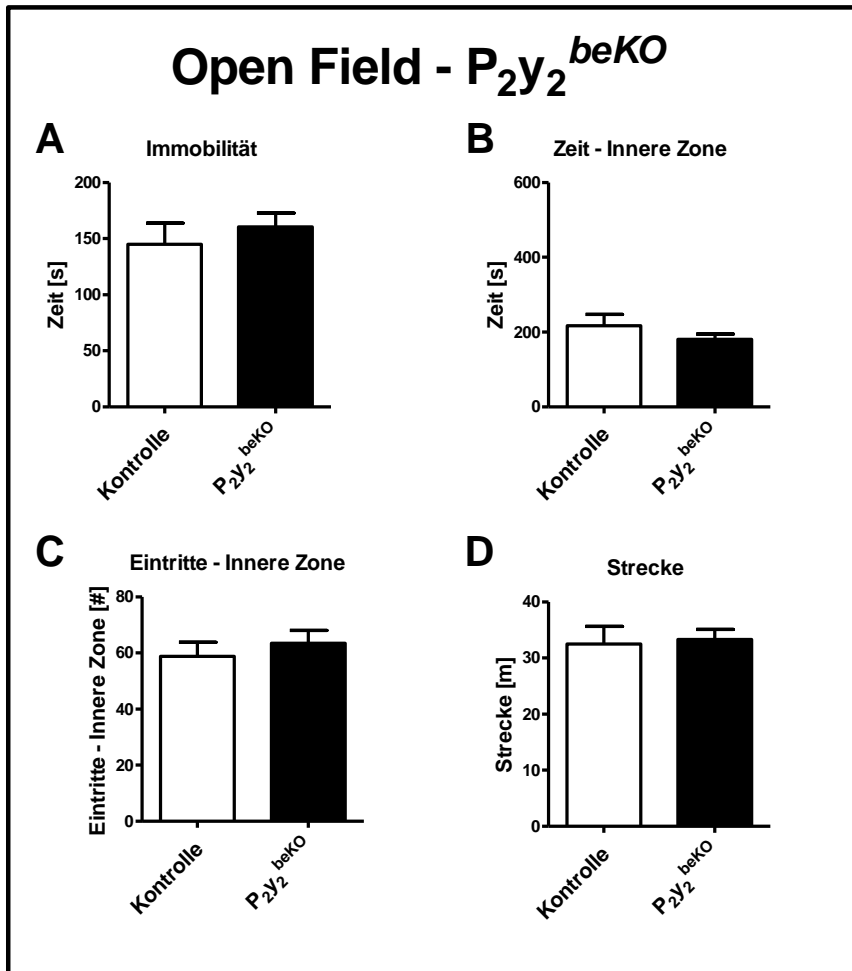


Abbildung 10: Open Field Test mit der $P_2Y_2^{beKO}$ -Linie

Dargestellt sind die analysierten Parameter während einer 10minütigen Aufnahmezeit in der Open Field-Arena. Jeder Parameter wurde zwischen Kontrolle und Knockout verglichen. Der Graph A zeigt die verbrachte Zeit in Immobilität, B die Zeit in der Inneren Zone, C die Anzahl der Eintritte in die Innere Zone und D die insgesamt zurückgelegte Strecke. Die Fehlerbalken zeigen die Standardfehler an. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test zu einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$, $n = 11-12$.

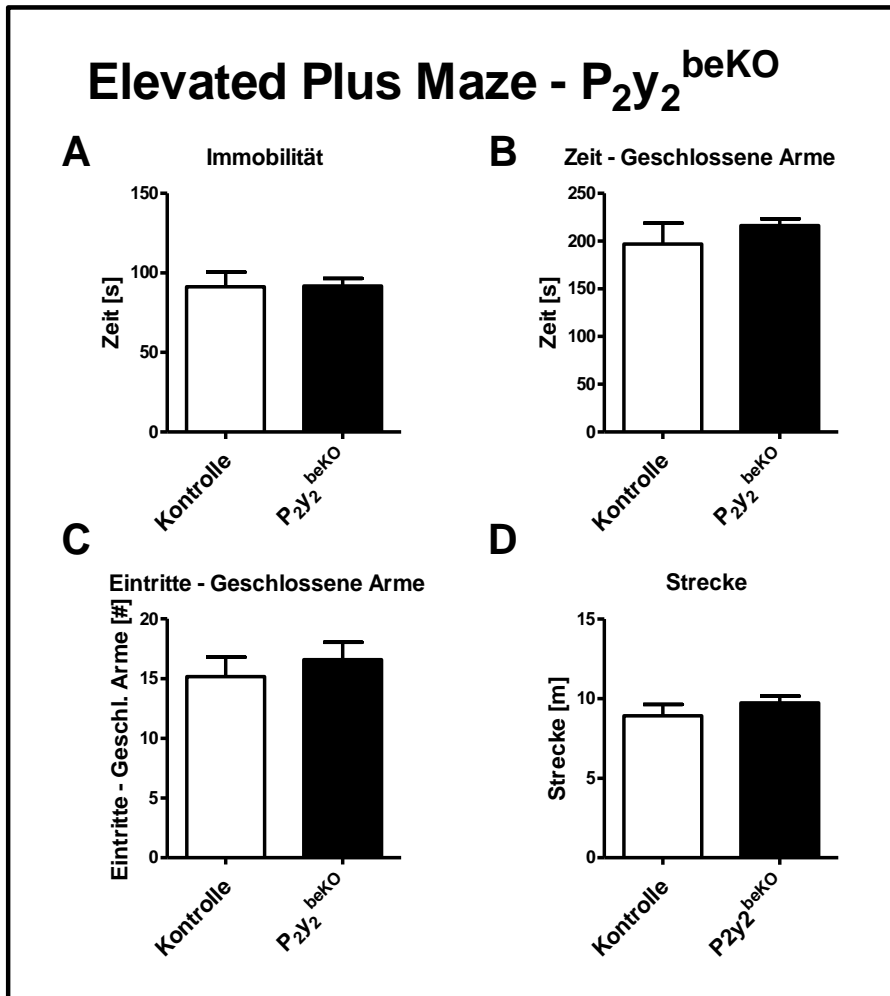


Abbildung 11: Elevated Plus Maze Test mit der P_{2Y2}^{beKO} -Linie

Dargestellt sind die analysierten Parameter während einer 5minütigen Aufnahmezeit in der Elevated Plus Maze-Arena. Jeder Parameter wurde zwischen Kontrolle und Knockout verglichen. Der Graph A zeigt die verbrachte Zeit in Immobilität, B die Zeit in den geschlossenen Armen, C die Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme und D die zurückgelegte Strecke. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test zu einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$, $n = 11-12$.

3.3 CO_2 -induzierte Durchblutungssteigerung

In den Vorergebnissen zeigte sich bei der Untersuchung der zerebralen Durchblutungssteigerung mittels erhöhter CO_2 -Konzentrationen in der Atemluft, dass die $G\alpha_{q/11}^{beKO}$ -Linie im Vergleich zur Kontrolle mit einer geringeren Durchblutungssteigerung reagierte. Da, wie in der Einleitung erläutert, der P_{2Y2} -Rezeptor eine wahrscheinliche Ursache für diesen Effekt sein könnte, wurde mit den folgenden Versuchen untersucht, ob sich diese Hypothese bewahrheitet.

Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, zeigten sich die gemittelten Kurven im Anstieg, in der Amplitude und im Rückgang der Durchblutung annähernd deckungsgleich. Auch bei der statistischen Analyse der Maxima und der AUC kristallisierten sich keine signifikanten Unterschiede heraus. Im Vergleich der Stimulation mit 10 % (A) zu 20 % CO₂ (D) in der Atemluft fällt auf, dass in der ersteren Kurve ein steiler, annähernd linearer Anstieg und nach dem Plateau ein linearer Abfall des Blutflusses zu beobachten ist. Dagegen braucht es in der 20 %-Kurve etwa 10 Minuten, bis nach einer exponentiellen Annäherung ein Plateau erreicht wird. Das Abfallen nach Stopp des Stimulus ist wiederum linear mit einem sehr ähnlichen Verlauf zu der 10 %-Kurve. Bei der Stimulation mit 10 % CO₂ wird eine Steigerung des Blutflusses um etwa 30 % erreicht, wohingegen bei der Stimulation mit 20 % CO₂ eine Steigerung um etwa 160 % erreicht wird. Außerdem war auffällig, dass unter der Stimulation mit 20 % CO₂ beide Genotypen zu Beginn der Stimulation ein Einknicken in der Kurve zeigen, bei dem der Blutfluss erst steil ansteigt, dann nach etwa 3 Minuten fast bis auf den Basalwert zurückkehrt, um dann wieder steil anzusteigen, bis das Plateau erreicht wird. Bei den Messungen der G $\alpha_{12/13}^{beKO}$ -Linie trat dieses Phänomen nicht auf (Abbildung 13 Teil A und C).

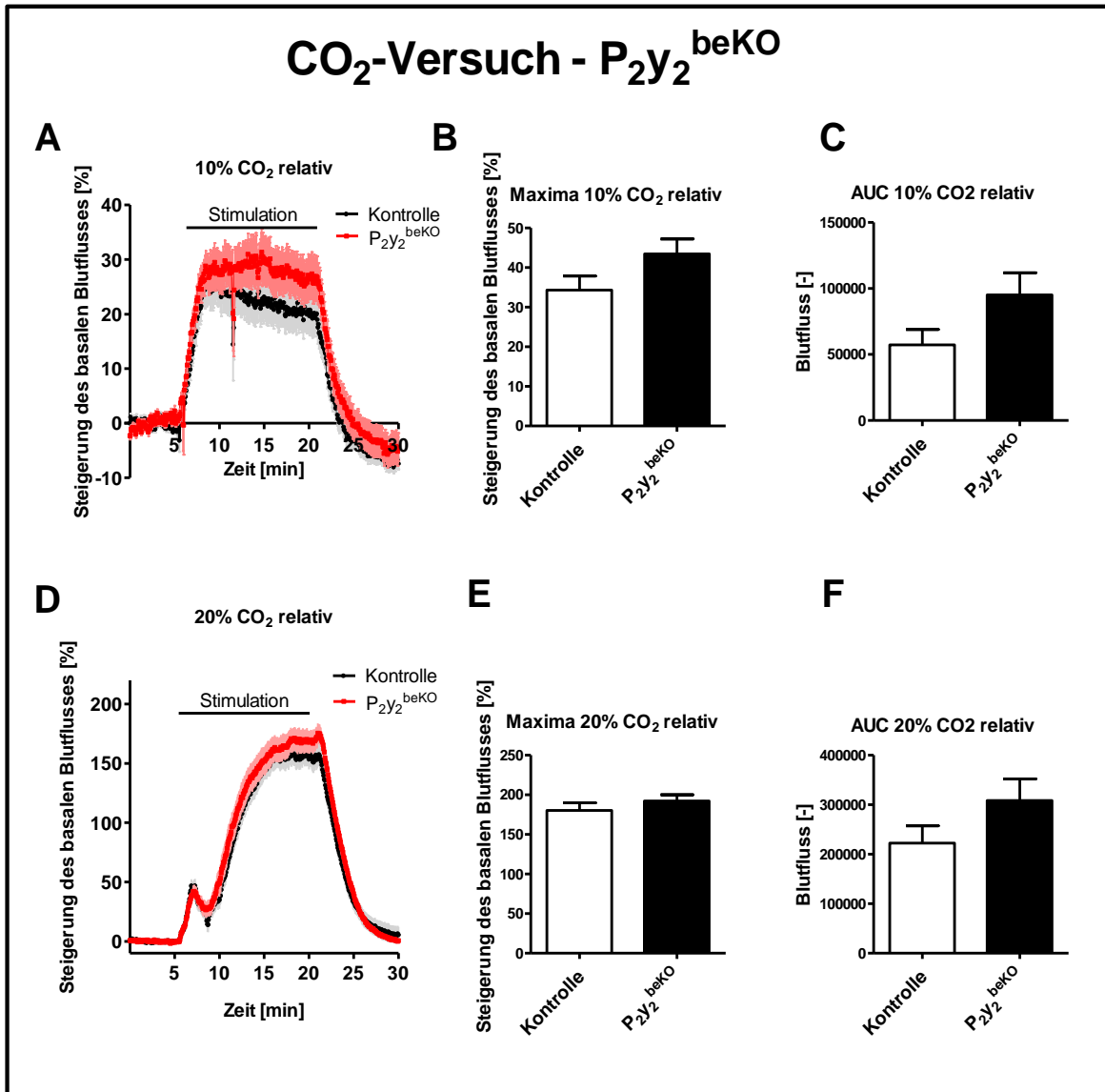


Abbildung 12: CO₂-Versuche mit der P₂Y₂^{beKO}-Linie

In dieser Abbildung sind die Ergebnisse des CO₂-Versuchs mittels LSCI mit den Mäusen der P₂Y₂^{beKO}-Linie dargestellt. Es erfolgte eine 15-minütigen Stimulation mit 10 % CO₂ und mit 20 % in der Atemluft. Der eingezeichnete Balken beschreibt den Stimulationszeitraum von Minute 5 bis Minute 20. Nach jeder Stimulation erfolgte eine 15-minütige Auswaschphase. Außerdem wurde vor den Stimulationen über 10 Minuten eine Basallinie erhoben. Die Abbildungsteile A – C beziehen sich auf die Stimulation mit 10 % CO₂ und D – F auf die Stimulation mit 20 % CO₂. In den Graphen A und D sind die relativen Blutflusswerte bezogen auf die gemittelten ersten 5 Minuten der Basallinie über die Zeit dargestellt. Die Einzelpunkte sind die Mittelwerte der prozentualen Blutflusssteigerung an diesem Zeitpunkt. Die statistische Analyse der Maxima und AUC erfolgte mittels t-Test, die der Blutflussdiagramme mittels Two-Way-ANOVA zu einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$. Außerdem ist der Standardfehler durch Fehlerbalken dargestellt. $n = 20$.

Der G $\alpha_{12/13}$ -Signalweg wird von den G α -Proteinen 12 und 13 vermittelt und stellt einen alternativen Signalweg zum G $\alpha_{q/11}$ -Signalweg dar. Einige Rezeptoren sind in der Lage, beide Signalwege zu stimulieren, weshalb der G $\alpha_{12/13}$ -Signalweg

untersucht wurde [69, 88]. Wie in der Abbildung 13 A und C zu erkennen ist, zeigten sich die Kurven beider Stimulationskonzentrationen deckungsgleich. Unter 10 % CO₂ (A) wurde eine Steigerung des Blutflusses um etwa 30 – 40 % erreicht, wohingegen bei der Stimulation mit 20 % CO₂ (B) eine Steigerung um etwa 130 - 150 % erreicht wurde. Auffällig war außerdem, dass im Gegensatz zu der P₂y₂^{beKO}-Linie der Anstieg bis das Plateau erreicht wird unter 10 % CO₂ bei Knockout und Kontrolle abgeflachter ist.

Die Analyse im Two-Way-ANOVA zeigte, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen Knockout und Kontrolle gab. Bei Analyse der Maxima und AUC der Graphen A und C im t-Test (Abbildung 13 B, C, E und F) gab es ebenfalls keine Unterschiede.

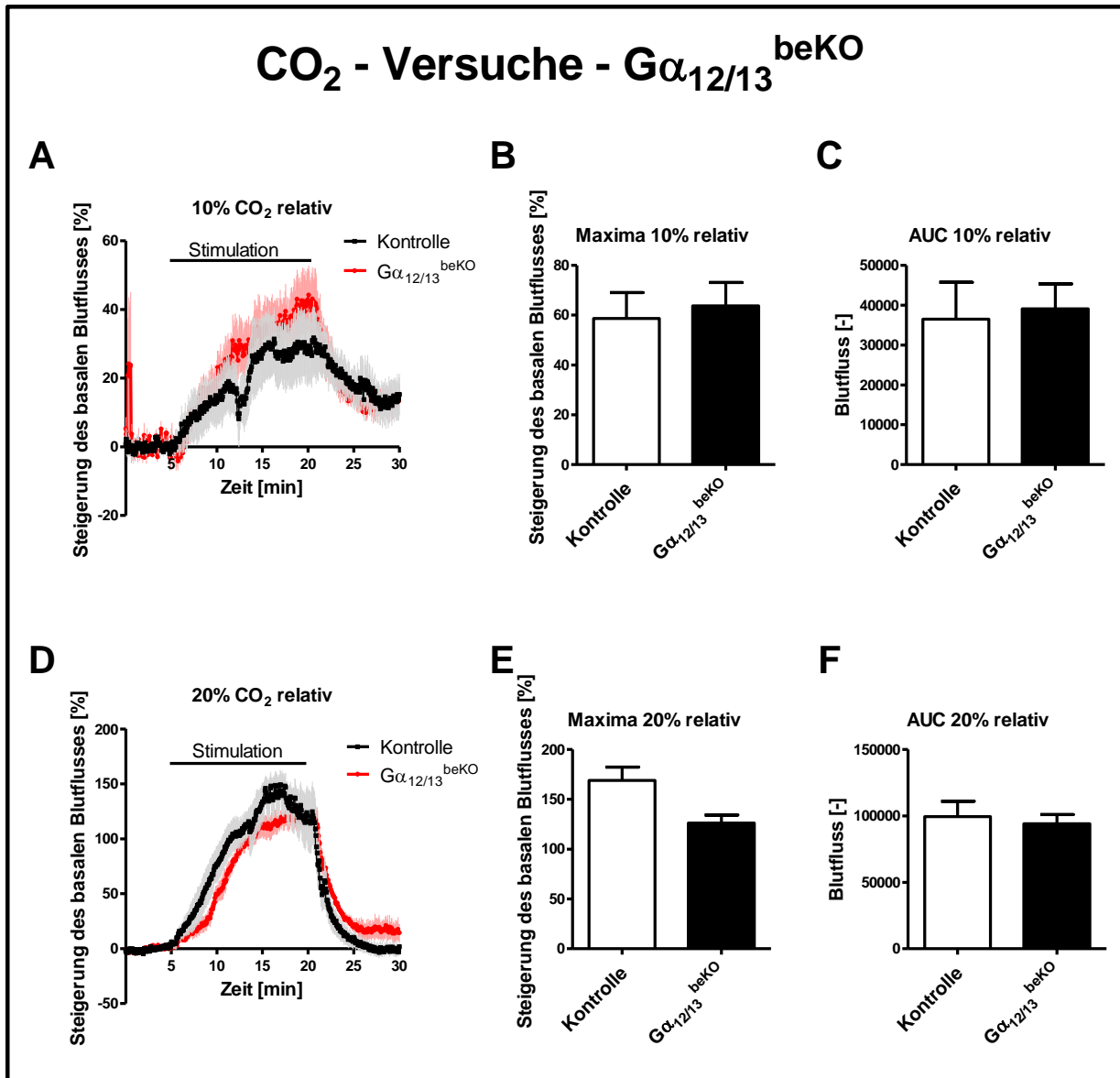


Abbildung 13: CO₂-Versuche mit der G $\alpha_{12/13}$ ^{beKO}-Linie

In dieser Abbildung sind die Ergebnisse des CO₂-Versuchs mittels LSCI mit den Mäusen der G $\alpha_{12/13}$ ^{beKO}-Linie dargestellt. Es erfolgte eine 15-minütige Stimulation mit 10 % CO₂ und mit 20 % in der Atemluft. Der eingezeichnete Balken beschreibt den Stimulationszeitraum von Minute 5 bis Minute 20. Nach jeder Stimulation erfolgte eine 15-minütige Auswaschphase. Außerdem wurde vor den Stimulationen über 10 Minuten eine Basallinie erhoben. Die Abbildungsteile A – C beziehen sich auf die Stimulation mit 10 % CO₂ und D – F auf die Stimulation mit 20 % CO₂. In den Graphen A und D sind die relativen Blutflusswerte bezogen auf die gemittelten ersten 5 Minuten der Basallinie über die Zeit dargestellt. Die Einzelpunkte sind die Mittelwerte der prozentualen Blutflusssteigerung an diesem Zeitpunkt. Der Einschnitt bei etwa 12 Minuten in Teil A deckte sich mit dem Zeitpunkt für das Nachspritzen des Anästhetikums, was zu Bewegungen an der Maus führte und somit ein Bewegungsartefakt darstellt. Die statistische Analyse der Maxima und AUC erfolgte mittels t-Test, die der Blutflussdiagramme mittels Two-Way-ANOVA zu einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$. Außerdem ist der Standardfehler durch Fehlerbalken dargestellt. n = 4 – 6.

3.4 Neurovaskuläre Kopplung

Bei den NVC-Versuchen wurde die Blutflusssteigerung im sensomotorischen Kortex nach elektrischer Stimulation des Whiskerpads gemessen. Je Maus wurden fünf Stimulationen durchgeführt, die gemittelt wurden. Die Kurve der relativen Blutflusssteigerung (Abbildung 14) zeigt für die $P_{2y_2}^{beKO}$ -Linie im Anstieg der Kurve einen signifikanten Unterschied zwischen Kontrolle und Knockout. Da dieser Unterschied in der Darstellung der gesamten Kurve nur schlecht optisch erkennbar ist, wurde der signifikante Bereich in einer vergrößerten Abbildung (Abbildung 14 B) nochmals dargestellt. Zur weiteren Verdeutlichung wurde die Zeit bis zur Hälfte des Maximums berechnet und aufgetragen (Abbildung 14 C). Die Werte dieser Berechnung sind im t-Test ebenfalls signifikant unterschiedlich zwischen Kontrolle und Knockout. Dabei zeigte die Kontrollgruppe einen Mittelwert von 3,6 Sekunden und die Knockoutgruppe einen Mittelwert von 3,81 Sekunden, was einen Unterschied von 0,29 Sekunden macht.

Die weiteren Eckpunkte der NVC-Kurven zeigen keine Unterschiede. Die Breite und Amplitude decken sich zwischen den Gruppen. Auch die AUC und die erreichten Maxima der jeweiligen Genotypen bestätigen diese Beobachtung, wie es in Abbildung 14 D und E zu sehen ist.

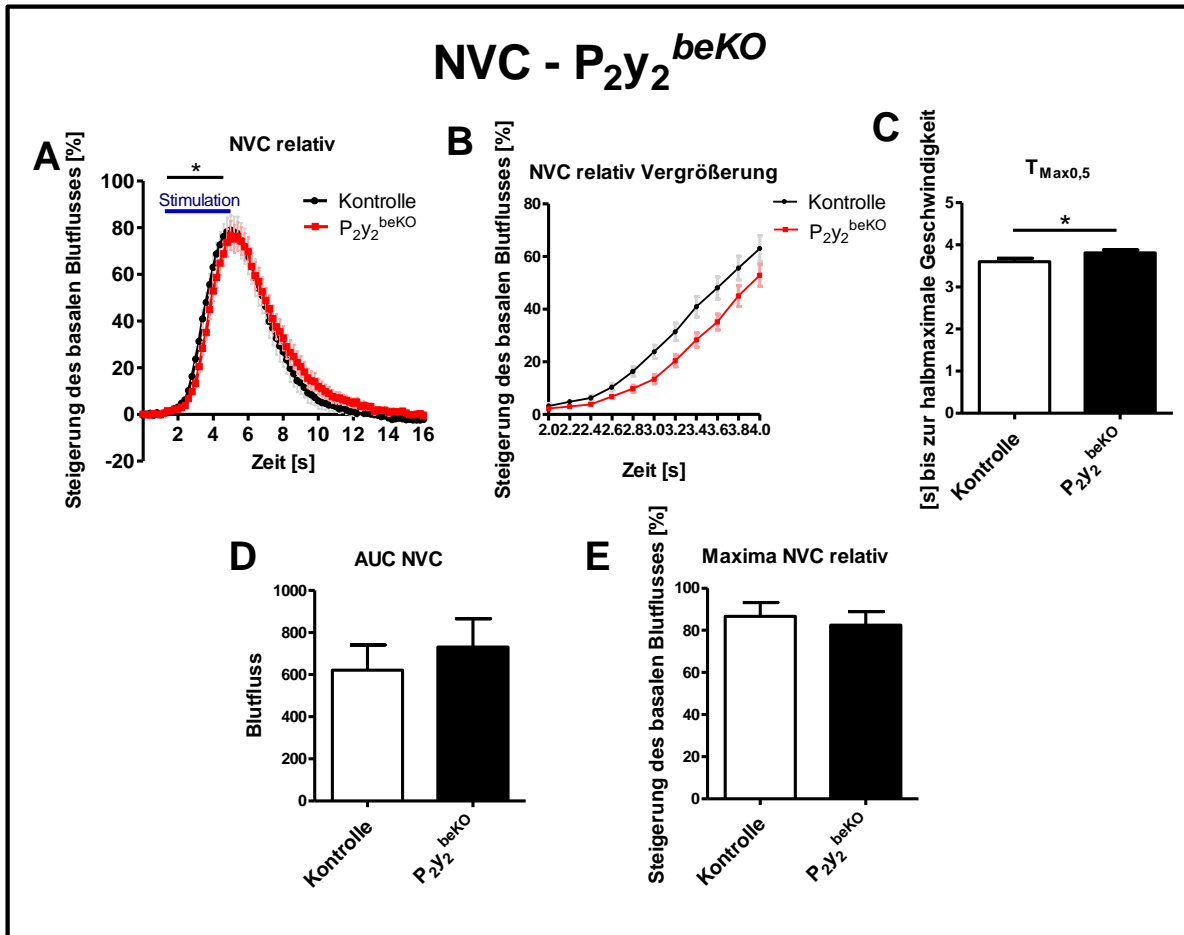


Abbildung 14: Die NVC der P₂Y₂^{beKO}-Linie.

Dargestellt sind die Ergebnisse der NVC gemessen mit dem LSCI der P₂Y₂^{beKO}-Linie. Der Graph A zeigt die gemittelten Blutflusswerte über die Zeit. Der Stimulationszeitraum von Sekunde 1 bis 6 ist mittels des blauen Balkens angezeigt. B zeigt die einen vergrößerten Ausschnitt der ersten 4 Sekunden von A. Zur weiteren Verdeutlichung ist die Hälfte der Zeit bis zum Erreichen des Maximums berechnet worden. Diese Werte wurden in C aufgetragen. E zeigt die AUC und bezieht sich auf die Einzelkurven der relativen Kurve. D zeigt die Maxima der relativen Werte. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Two-Way-ANOVA und t-Test zu einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$. $n = 20$. Der Standardfehler ist durch Fehlerbalken dargestellt.

Die Ergebnisse der $\text{G}\alpha_{12/13}$ ^{beKO}-Linie sind in Abbildung 15 dargestellt. Es wurde kein signifikanter Unterschied im Verlauf der relativen Blutflusssteigerung über die Zeit (Teil A) der NVC festgestellt. Auch die AUC und Maxima der relativen Werte wiesen zwischen den Genotypen keine Unterschiede auf (Teil B und C).

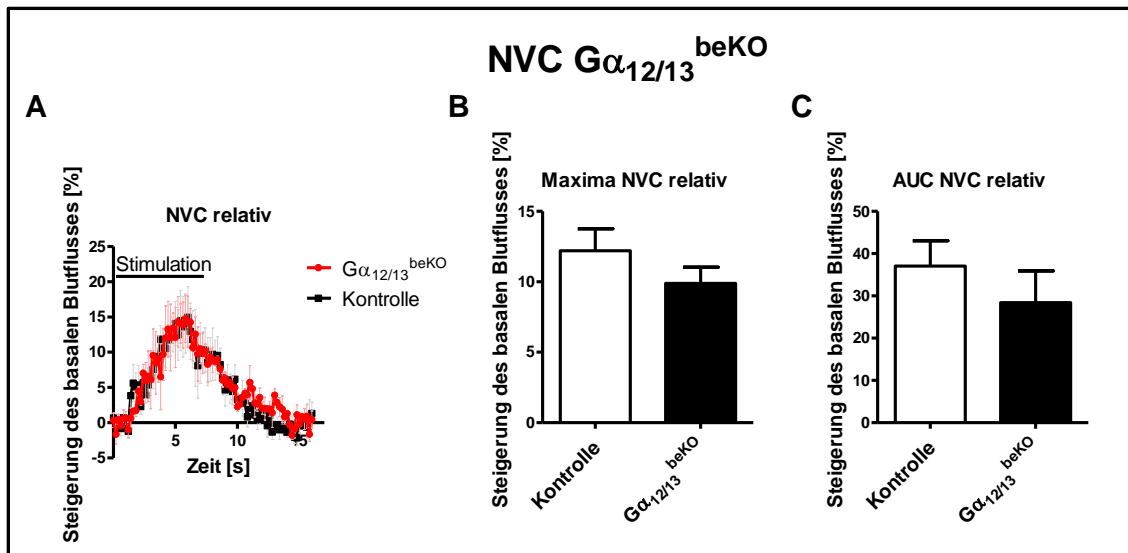


Abbildung 15: NVC der $G\alpha_{12/13}^{beKO}$ -Linie

In dieser Abbildung handelt es sich um den NVC-Versuch der $G\alpha_{12/13}^{beKO}$ -Linie. Der Graph in A zeigt die prozentuale Blutflusssteigerung über dem sensorimotorischen Kortex über die Zeit. Die Werte beziehen sich dabei auf die gemittelte Basallinie. Es wurde für 5 Sekunden das Whiskerpad stimuliert. Dieser Zeitraum wurde als Balken mit Stimulation gekennzeichnet. Der Abbildungsteil B zeigt die Maxima und C die AUC von den Kurven von A ab. Es bestand kein signifikanter Unterschied. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test und Two-Way-ANOVA zu einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$. $n = 4-6$. Die Fehlerbalken stellen den jeweiligen Standardfehler dar.

3.5 Immunhistochemie und String Vessels

Bei der NVC der $P_2Y_2^{beKO}$ -Mäuse zeigte sich, dass es in der Gruppe der Knockoutmäuse einen verzögerten Start der Blutflusssteigerung nach der Whiskerpad-Stimulation gab. Es gibt also einen Effekt auf die Funktion der Gehirngefäße in der Durchblutungsregulation. Daher stellte sich die Frage, ob die Deletion des P_2Y_2 -Gens in Gehirndothelzellen auch direkte Folgen für die Morphologie und Funktion der Gefäßstruktur hat. Dazu wurden immunhistochemische Färbungen angefertigt.

Zunächst wurde die Funktion der BHS überprüft. Da die Tight Junctions dynamische Strukturen sind, die über Ca^{2+} , Phosphorylierung und G-Proteine modellierbar sind [26], wäre ein Unterschied vorstellbar gewesen. Wenn die BHS in ihrer Funktion gestört und damit undicht ist, kann vermehrt Flüssigkeit vom Gefäß in das Parenchym übertreten und ein osmotisches Hirnödem bilden. Damit würde auch das Gehirngewicht steigen. Bei der statistischen Analyse des Gehirngewichts mittels t-Test konnte kein Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden (nicht abgebildet). Des Weiteren würde eine undichte BHS dazu führen, dass IgG in den

Extravasalraum übertritt. Daher wurde die IgG-Menge im Parenchym mit Hilfe der Fluoreszenzintensität des an einen Maus-IgG-spezifischen Antikörpers gekoppelten Farbstoffs gemessen. Hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Im nächsten Schritt wurde die Länge der Gefäße wie auch der Gefäßdurchmesser ausgemessen, gemittelt und zwischen den Genotypen verglichen. Bei Betrachtung der Gefäßlänge war ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen zu ermitteln, nicht jedoch bei dem Gefäßdurchmesser (Abbildung 16). Da die Fläche für alle Proben gleich war, spricht die verringerte Gefäßlänge auch für eine verringerte Gefäßdichte.

Danach wurden die Länge und die Anzahl der String Vessels anteilig an der Gesamtgefäßlänge bzw. -anzahl untersucht (Abbildung 17). String Vessels sind ehemalige Gefäße, von denen noch die leeren Basalmembranhüllen übriggeblieben sind, durch die kein Blut mehr fließt [21]. Sie kommen physiologisch in jedem Alter vor, sind aber auch im Zusammenhang mit Krankheiten wie Alzheimer-Demenz oder mit Zuständen nach einer Ischämie oder Bestrahlung als vermehrt auftretend beschrieben worden [21]. Tatsächlich sind bei der Untersuchung der String Vessels signifikante Unterschiede festgestellt worden. Die Knockoutmäuse hatten einen deutlich größeren Anteil an String Vessels an der Gesamtgefäßlänge (Abbildung 17 A). Im Anteil der String Vessels an der Gesamtgefäßanzahl (Abbildung 17 B) war ebenfalls ein signifikanter Unterschied zu erkennen.

Daher wäre es interessant zu sehen, ob dieser Sachverhalt einen Einfluss auf die basale Durchblutung hat. Um einen Hinweis zu bekommen, wurden die absoluten Flusswerte der basalen Durchblutung der CO₂-Versuche (Minute 1 bis 5) im Speckle Imaging gemittelt und verglichen (nicht gezeigt). Hier war kein signifikanter Unterschied festgestellt worden. Da es sich beim Speckle Imaging jedoch um eine relative Methode handelt, lassen sich daraus keine absoluten Aussagen treffen.

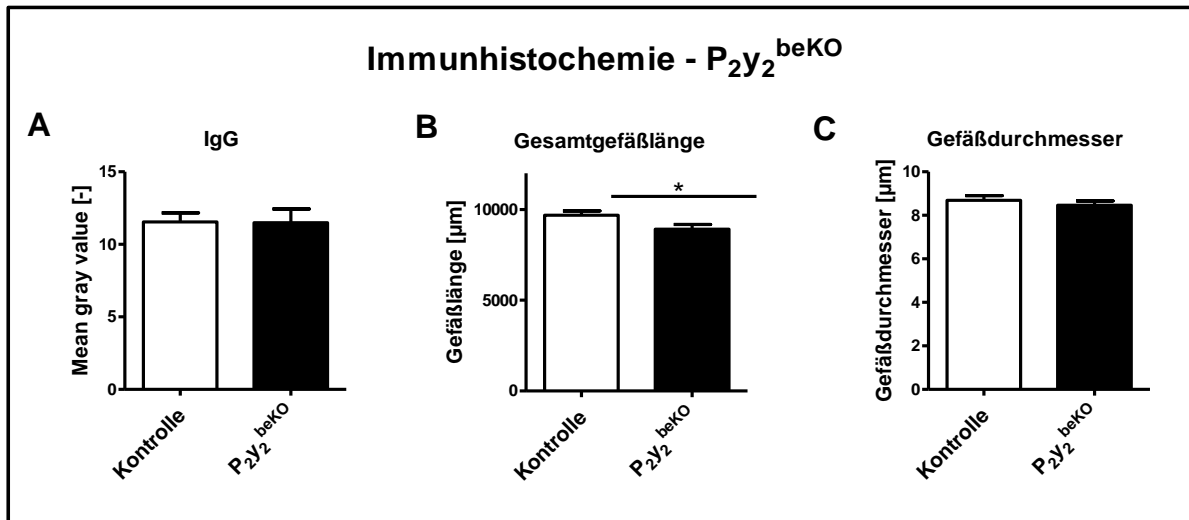


Abbildung 16: Immunhistochemische Untersuchungen der P₂Y₂^{beKO}-Linie

Die Darstellungen dieser Abbildung beziehen sich auf immunhistochemisch gefärbten Kortex-Schnitte der P₂Y₂^{beKO}-Linie. Der Graph A vergleicht die gemittelten Grauwerte im Extravasalraum, also des Bildhintergrundes, in der Anti-IgG-Färbung. Die aus dem Gefäß übergetretene IgG Menge ist proportional zum Mean Gray Value und verdeutlicht somit die (Un-)Dichtigkeit der BHS. Die Werte für die Darstellungen in B und C wurden anhand der Anti-CD31-Färbung ausgemessen (für Beispielbilder siehe Abbildung 17). Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler vom Mittelwert dar. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test zu einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$, * = $p < 0,05$, $n = 9 - 21$.

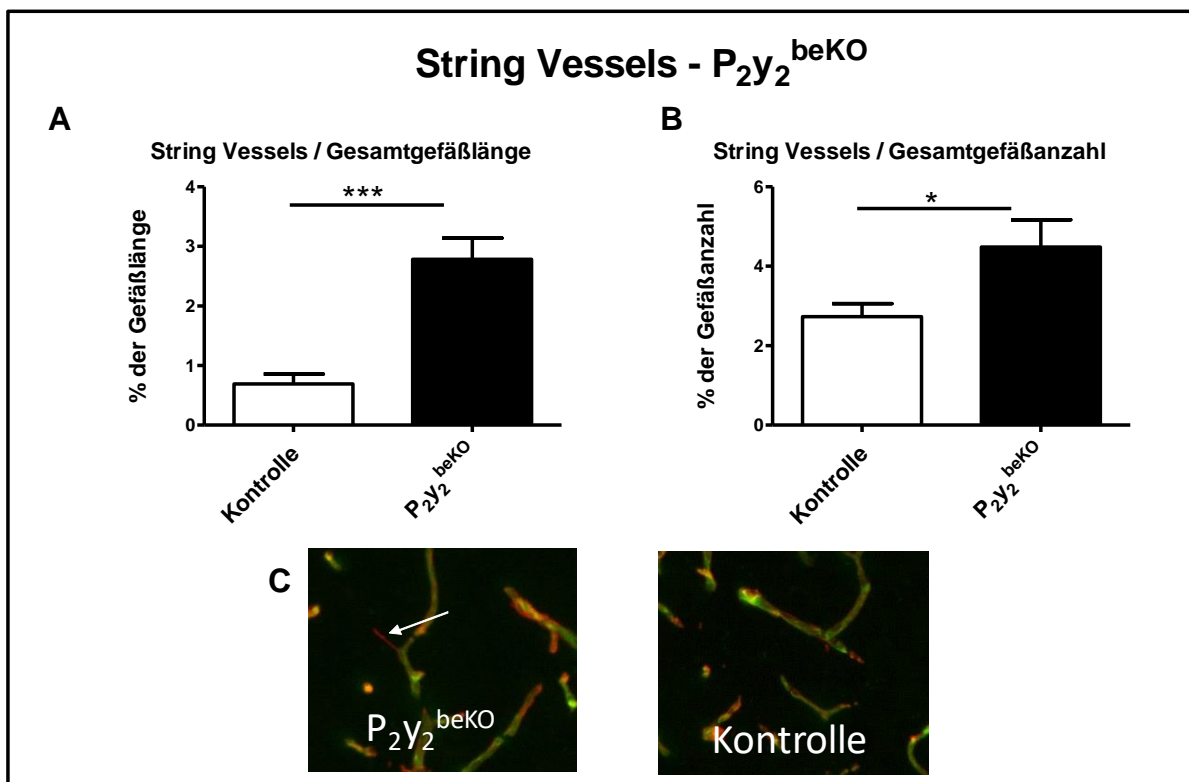


Abbildung 17: String Vessels bei der P₂Y₂^{beKO}-Linie

Die Darstellungen dieser Abbildung beziehen sich auf immunhistochemisch gefärbte Kortex-Schnitte der P₂Y₂^{beKO}-Linie. Der Graph A zeigt den prozentualen Anteil der String Vessel-Länge an der

Gesamtgefäßlänge im Vergleich zwischen Knockout und Kontrolle. In B ist die Zahl der String Vessels anteilig an der Gesamtgefäßzahl dargestellt. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler vom Mittelwert dar. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test zu einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$. * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$. n = 19 – 21.

In C sind die Anti-CD31-Färbung in Grün und die Anti-Kollagen IV-Färbung in Rot übereinander gelagert, um die String Vessels erkennen zu können. Alle Gefäßabschnitte, die rot sind, bestehen demnach nur aus Kollagen und weisen keine Zellen auf. Es handelt sich somit um String Vessels. Dargestellt ist auf der linken Seite ein Beispiel für einen immunhistochemisch gefärbten Kortex-Schnitt einer Maus aus der Knockoutgruppe und auf der rechten Seite ein Beispiel aus der Kontrollgruppe. In dem Bild der Knockoutgruppe (links) ist zur Verdeutlichung eine String Vessel mit einem weißen Pfeil gekennzeichnet.

4 Diskussion und Ausblick

4.1 Knockoutverifikation der $P_{2Y_2}^{beKO}$ -Linie

Zur Demonstration, dass die Rekombination bei der $P_{2Y_2}^{beKO}$ -Linie erfolgreich war, wurde in der quantitativen real-time PCR gezeigt, dass die mRNA in den Cre-positiven PBECs relevant reduziert war.

Auch im Calcium Imaging ist ein deutlicher Effekt unter Stimulation mit der geringeren ATP-Konzentration von 10 μ M zu erkennen. Unter der höheren ATP-Konzentration von 100 μ M stellt sich dieser Unterschied nicht mehr sicher dar. Das zeigt zunächst einmal, dass die Knockoutzellen tatsächlich auf Protein-/Rezeptorebene ein funktionelles Defizit vorweisen, was die erfolgreiche Cre-Induktion bestätigt. Außerdem lässt es darauf schließen, dass es noch andere Mechanismen geben muss, die dazu führen, dass in Endothelzellen unter ATP-Einfluss in hohen Konzentrationen die intrazelluläre Calciumkonzentration steigt.

Eine Möglichkeit wäre ein ionotroper P_{2X} -Rezeptor, der ebenfalls auf Endothelzellen vorhanden ist und zu einem intrazellulären Calciumanstieg führt [89]. Außerdem konnte z.B. der metabotrope P_{2Y_1} -Rezeptor, der auch auf Gehirnendothelzellen vorhanden ist, die durch einen P_{2Y_2} -Knockout gehemmte Vasodilatation in aortalen Endothelzellen zum Teil wieder herstellen [73, 90]. Eine andere Erklärungsmöglichkeit der Stimulierbarkeit der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen durch eine hohe ATP-Konzentration wäre, dass es einzelne Zellen gab, in denen die Rekombination nicht funktioniert hat. In der Literatur gibt es Hinweise, dass purinerge Rezeptoren wichtig für die Zellproliferation sind und einen Einfluss auf Zellkulturen ausüben, sodass auch ein Selektionsvorteil für die nicht rekombinierten Endothelzellen zu diskutieren wäre [91, 92]. Außerdem bestehen die gewachsenen Endothelzellen in der Endothelzellkultur aus wenigen Zellen, die durch starke Stimulatoren wie ECGS zur Teilung angeregt wurden, was ebenfalls nicht der Situation in vivo entspricht. Des Weiteren kann die physiologische Umgebung nicht exakt imitiert werden. Schwankungen der Lebensbedingungen, wie z.B. Temperaturschwankungen im Isolierungsprozess, könnten das Wachstum und die Funktion der Zellen beeinflussen.

Ein weiterer Faktor ist der Scherstress. Es wurde gezeigt, dass Endothelzellen anders wachsen und Gene anders exprimiert werden, wenn sie unter stetigem

Scherstress kultiviert wurden [93]. Zuletzt scheint es einen Unterschied in der Reaktion von Gefäßen zu geben, je nachdem ob der Agonist bei endothelialen P₂Y₂- und P₂Y₄-Rezeptoren exogen appliziert wird oder endogen im Zellverband gebildet wird [53].

Ein Modell ex vivo entspricht nie der exakten Situation in vivo. Trotz dieser Einschränkungen ist anhand der signifikanten Ergebnisse der PCR und des Calcium Imagings anzunehmen, dass das verwendete Tiermodell funktionstüchtig ist. Daher konnten nun die beschriebenen Versuche zur Beantwortung der Forschungshypothese erfolgen.

In Zukunft wäre es interessant zu untersuchen, welchen Einfluss der Einsatz eines P₂Y₂-Antagonisten, wie beispielsweise Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure (PPADS), auf die Calciumantwort hat, und ob dieses Bild die hier erhobenen Ergebnisse widerspiegelt. Damit könnte auch festgestellt werden, ob tatsächlich ein anderer Rezeptor bzw. Mechanismus oder eine andere Zellkonformation vorliegt, als die hier untersuchten. Zur weiteren Optimierung des Modells, wäre es ebenfalls interessant zu erfahren, welchen Einfluss eine Kultivierung der PBEC unter Scherstress auf die Ergebnisse hätte.

4.2 Charakteristika und Verhalten der P₂Y₂^{beKO}-Linie

Die P₂Y₂^{beKO}-Linie zeigte keine Unterschiede zwischen den Genotypen im Körpergewicht. Dies spricht für einen normalen Stoffwechsel und eine normale Entwicklung trotz des im Gehirndothel fehlenden Rezeptors. Der Einbruch im Gewicht in den ersten Tagen ist durch die Tamoxifeninjektionen zu erklären.

In vorausgegangenen Experimenten wurde beim Untersuchen der Gα_{q/11}^{beKO}-Linie im Open Field und im Elevated Plus Maze Test ein deutlich verstärktes Ängstlichkeitsverhalten und eine gestörte Durchblutungsregulation beobachtet. Das legt nahe, dass Ängstlichkeitsverhalten und Durchblutungsregulation in einem engen Zusammenhang stehen könnten und ein Gα_{q/11}-gekoppelter Rezeptor dabei eine relevante Rolle spielt. Dieser Zusammenhang ist jedoch noch nicht ausreichend belegt. Der P₂Y₂-Rezeptor, als Gα_{q/11}-gekoppelter Rezeptor, wurde auf dem Hintergrund der Ergebnisse der Gα_{q/11}^{beKO}-Linie und Hinweisen aus der Literatur zu einer Beteiligung von ATP in der Durchblutungsregulation untersucht. Deshalb wurden beide Tests mit der P₂Y₂^{beKO}-Linie durchgeführt. Hier zeigte sich kein

Unterschied zwischen den Genotypen. Der P_{2y_2} -Rezeptor der Gehirnendothelzellen spielt also keine Rolle in der Verhaltenssteuerung. Deshalb kann nun in Zukunft weiter differenziert werden, ob ein anderer $G_{\alpha_{q/11}}$ -gekoppelter Rezeptor für den beobachteten Effekt verantwortlich ist.

4.3 Endotheliale Signalwege in der CO_2 -induzierten Durchblutungssteigerung

In den Voruntersuchungen zeigte sich eine eingeschränkte CO_2 -induzierte Durchblutungssteigerung bei der $G_{\alpha_{q/11}}^{beKO}$ -Linie. Um diesen Effekt erklären zu können, wurde zunächst der endotheliale ATP-Rezeptor P_{2y_2} als möglicher $G_{\alpha_{q/11}}$ -gekoppelter Rezeptor, der für diesen Effekt verantwortlich sein könnte, untersucht.

Da bei den Versuchen der $P_{2y_2}^{beKO}$ -Linie weder unter 10 % CO_2 noch unter 20 % CO_2 ein Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden konnte, ist davon auszugehen, dass der endotheliale P_{2y_2} -Rezeptor keinen Einfluss auf die CO_2 -induzierte Blutflusssteigerung hat. Er ist somit nicht der gesuchte $G_{\alpha_{q/11}}$ -gekoppelte Rezeptor, der für die eingeschränkte CO_2 -induzierte Durchblutungssteigerung in den $G_{\alpha_{q/11}}$ -Experimenten gesorgt hat.

Stattdessen können andere endotheliale purinerge Rezeptoren, die $G_{\alpha_{q/11}}$ -gekoppelt sind und ebenfalls auf Gehirnendothelzellen zu finden sind, in Betracht gezogen werden. Diese Bedingungen treffen z.B. auch auf den P_{2y_1} - oder den P_{2y_4} -Rezeptor zu [94]. Außerdem könnte es sein, dass ATP in der CO_2 -induzierten Durchblutungssteigerung im Kortex keine Rolle spielt und stattdessen Protonen oder CO_2 direkt diesen Effekt vermitteln. Dementsprechend könnten endotheliale pH-Rezeptoren, wie z.B. OGR1 oder GPR4, eine Alternative sein [62, 95, 96]. Ebenfalls berichtet Yao et. al., dass G_q bei der CO_2 -Antwort relevant ist und dass neuronale G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auch direkt auf CO_2 reagieren können [61]. Diese Ergebnisse beziehen sich zwar auf Neurone in der Drosophila-Fliege und nicht auf Gehirnendothel in Säugetieren, zeigen aber denkbare prinzipielle Mechanismen in der CO_2 -Antwort.

Viele Rezeptoren, die $G_{\alpha_{q/11}}$ -gekoppelt sind, können auch an den $G_{\alpha_{12/13}}$ -Signalweg koppeln, somit kann ein Agonist auch beide Signalwege aktivieren. Auch für den P_{2y_2} -Rezeptor existieren Daten, die einen $G_{\alpha_{12/13}}$ -gekoppelte Signalweg nahelegen [65]. Deshalb war es interessant zu untersuchen, ob nicht der $G_{\alpha_{12/13}}$ -gekoppelte

Signalweg in der CO₂-induzierten Durchblutungssteigerung eine Rolle spielt. Bei den Ergebnissen der LSCI-Messungen der Gα_{12/13}-Linie gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Das spricht gegen eine Beteiligung von Gα_{12/13} an der CO₂-induzierten Durchblutungssteigerung.

Bei weiterer Betrachtung der Abbildung 12 fiel auf, dass unter 20 % CO₂ zu Beginn ein Einbruch in der Blutflusssteigerung auftrat. Bei der P₂Y₂^{beKO}-Linie fiel der Blutfluss bis fast auf den Ausgangswert zurück. Bei den Ergebnissen der Gα_{12/13}^{beKO}-Linie und bei den Vorergebnissen der Gα_{q/11}-Linie war dieses Phänomen nicht zu beobachten. Einerseits könnte der Neuaufbau des Versuchsplatzes eine Rolle gespielt haben, andererseits wäre auch denkbar, dass der genetische Hintergrund der Mauslinien ursächlich ist. Für eine transiente Kontraktion im Sinne von Vasospasmen unter sehr hohen ATP-Konzentrationen und unter sehr starker Hyperkapnie gibt es auch in der Literatur Hinweise, die eine solche Reaktion erklären würden [72]. Auch Cai et. al. beschreiben eine biphasische Antwort in Form einer Dilatation mit darauf folgender Kontraktion von zerebralen Gefäßen auf ATP [97]. Demnach könnte es sich auch um eine physiologische Reaktion unter den hohen CO₂-Konzentrationen handeln, die zukünftig interessant zu untersuchen wäre. Diese biphasische Reaktion wäre dann allerdings stark vom genetischen Hintergrund der jeweiligen Mauslinie abhängig, weshalb als nächstes vor allem Versuche mit anderen endothelialen P₂Y- und P₂X-Rezeptoren zur weiteren Differenzierung sinnvoll wären.

Im CO₂-Versuch lagen die ROIs auf den größten Gefäßen, die mit dem LSCI messbar waren. Da mit diesem Gerät nur die oberflächlichen Gefäße gemessen werden können und die großen Arteriolen in der Tiefe liegen, wurden somit die Blutflusswerte der großen Venen gemessen. Somit wurden nicht die Gefäßabschnitte untersucht, die den größten Anteil am Gefäßwiderstand tragen und an denen die CO₂-induzierten Durchblutungssteigerung stattfindet.

Dabei ist es umstritten, welche Gefäßabschnitte im Gehirn in welchem Maße am Gefäßwiderstand beteiligt sind. Früher ging man davon aus, dass die pialen Arteriolen den größten Anteil am zerebralen Gefäßwiderstand haben [2, 42]. Heute wird jedoch zunehmend beschrieben, dass zumindest im Gehirn auch die Kapillaren eine große Rolle spielen. Diese können aktiv durch umgebende Perizyten ihren Durchmesser verändern [45, 97]. Trotz alledem würde das hier verwendete Modell die Menge der Blutflusssteigerung im venösen Schenkel darstellen. Denn die Venen weiten sich passiv über den Druck im arteriellen System, wobei die Compliance der

Venen vor allem vom Füllungszustand abhängt [27], und stellen so die Summe aller möglichen beteiligten Gefäße dar.

So konnte gezeigt werden, dass der P_{2Y_2} -Rezeptor sowie $G\alpha_{12/13}$ nicht an der CO_2 -induzierten Durchblutungssteigerung beteiligt sind.

4.4 Beteiligung des P_{2Y_2} -Rezeptors an der NVC

Die NVC beschreibt, wie die Zusammenarbeit von den Zellen der NVE (Neurone, Astrozyten, Perizyten, glatte Muskelzellen und Endothelzellen) eine enge zeitliche und räumliche Verbindung zwischen neuronaler Aktivität und zerebraler Blutflussantwort schafft [30].

Beim LSCI-Versuch zur NVC führte ein fehlender endothelialer P_{2Y_2} -Rezeptor zu einer Verzögerung beim Start der Blutflussantwort in der NVC. Diese Verzögerung ist jedoch bis zum Erreichen des Maximums des Blutflusses wieder aufgehoben. Daraus folgt, dass der endotheliale P_{2Y_2} -Rezeptor an der NVC beteiligt ist. Dabei vermittelt er einen Mechanismus, der zu Beginn zu der neurovaskulären Reaktivität beiträgt. Möglicherweise könnte durch den fehlenden endothelialen P_{2Y_2} -Rezeptor ein Defizit in einem Amplifikationsmechanismus vorliegen, der die Verzögerung beim Start erklären würde.

Dabei scheint Scherstress eine wichtige Komponente zu sein. Scherstress ist die Kraft, die pro Fläche benötigt wird, um eine bewegte Platte mit einer konstanten Geschwindigkeit über der Flüssigkeit zu bewegen. Dabei entsteht der größte Scherstress im Gefäß direkt am Endothel. Je kleiner das Gefäß und je größer die Blutflussgeschwindigkeit, desto größer ist der Scherstress am Endothel [27]. Die Endothelzellen reagieren auf Scherstress u.a. mit einem Calciumeinstrom in die Zelle. Diese intrazellulär erhöhte Calciumkonzentration führt über eine zwischengeschaltete Signalkaskade zur Ausschüttung von ATP und anderen vasoaktiven Substanzen wie NO und Prostazyklin [19, 27, 28]. Dieses ATP führt über auto- und parakrine Aktivierung von P_{2Y_2} -Rezeptoren an Endothelzellen zur Vasorelaxation und zu weiterer ATP-Ausschüttung [28] und stellt somit einen Amplifikationsmechanismus dar, der durch einen fehlenden endothelialen P_{2Y_2} -Rezeptor beeinträchtigt wäre.

Als Modell wäre denkbar, dass, wenn die NVC auf Kapillarebene beginnt und dort die Perizyten zur Dilatation der Kapillaren führen [45], über das arterielle Gefäßbett

gesehen ein größerer Druckgradient entsteht. Dieser führt wiederum zu einer erhöhten Blutflussgeschwindigkeit in den davor geschalteten Arteriolen. Das führt dort zu vermehrtem Scherstress, der, vermittelt über das Endothel, zu einer verstärkten Dilatation der Arteriolen führt. Wang et. al. beschreibt, dass es bei der P_{2Y2}^{beKO} -Linie zu einem arteriellen Hypertonus kommt, da den Gefäßen basal ein Dilatationsstimulus durch eine eingeschränkte Scherstressantwort fehlt [28]. Diese Daten bestärken die beschriebene Hypothese, wie der P_{2Y2} -Rezeptor auf die NVC einwirken könnte.

Andere Ursachen könnten auch durch den Knockout induzierte anatomische Gefäßveränderungen sein. Wenn beispielsweise der fehlende Rezeptor dazu führen würde, dass mehr Gefäße zu Grunde gehen und weniger neu gebildet werden, wäre die Gefäßdichte vermindert, was Einfluss auf die Durchblutung in diesem Gebiet hätte. Tatsächlich gibt es auch Hinweise dafür, dass der P_{2Y2} -Rezeptor, bzw. ATP als Signalmolekül, wichtig für das Überleben von Zellen ist [86, 91].

Um in Zukunft die Bedeutung dieses Mechanismus untersuchen zu können, braucht es eine höhere räumliche und zeitliche Auflösung sowie die Betrachtung aller zerebralen Gefäßabschnitte. So ließe sich erkennen, wo die NVC beginnt, wie sie sich fortsetzt und an welchen Abschnitten ATP und der P_{2Y2} -Rezeptor beteiligt sind.

Mit dem LSCI können lediglich oberflächlich gelegene Gefäße untersucht werden, sodass es sinnvoll wäre, eine andere Technik einzusetzen, mit der es möglich ist, in vivo tiefer im Gewebe den Blutfluss zu messen. Außerdem wäre es hilfreich, in den verschiedenen Gefäßabschnitten getrennt die Menge der ATP-Freisetzung während der NVC zu messen. Die Route der ATP-Applikation ist ebenfalls ausschlaggebend [72]. So gibt es Hinweise zu unterschiedlichen Reaktionen je nach Applikationsort. Ginge man von einer überwiegend von intravasal kommenden ATP-Stimulation aus, wären scherstressinduzierte ATP-Freisetzung von Endothelzellen und ATP-Freisetzung von Erythrozyten unter Hyperkapnie stärker zu beachten. Betrachtet man die ATP-Stimulation von parenchymal aus ergeben sich andere Möglichkeiten primär über das Zusammenspiel der Zellen der NVE.

Schließlich sind auch Störfaktoren mit in Betracht zu ziehen, die sich ebenfalls auf den CO_2 -Versuch beziehen. So war es nötig, die Maus vor jeder Blutflussmessung zu narkotisieren. Zwar wurde das deutlich vasoaktive Isofluran vor der Messung ausgeschlichen und durch Ketamin und Xylazin ersetzt. Rückstände des Isoflurans sowie mögliche Effekte der anderen beiden Medikamente könnten das Ergebnis

beeinflussen. Innerhalb einer Mauslinie wurden die jeweiligen Kontroll- und Knockout-Tiere jedoch unter den exakt selben Bedingungen gemessen.

Zusammengefasst zeigt sich ein Effekt des gehirnendothelialen P₂Y₂-Knockouts beim Start der NVC, was am Ehesten auf eine eingeschränkte Scherstressantwort oder auf eine durch den Knockout veränderte Gefäßstruktur zurückzuführen ist. Der weitere Verlauf der Blutflusskurve ist aber nicht beeinträchtigt. Dieses Ergebnis zeigt, dass dieser Rezeptor nicht essenziell für die NVC gebraucht wird und andere Mechanismen und Signalmoleküle weiterhin im Vordergrund stehen.

4.5 Veränderungen der Gehirngefäßstruktur unter einem P₂Y₂-Rezeptorknockout

In den immunhistochemischen Färbungen der P₂Y₂^{beKO}-Linie zeigte sich ein signifikant erhöhter Anteil an sogenannten String Vessels. String Vessels sind die Überreste von untergegangene Kapillaren, von denen nur noch die leeren Basalmembranhüllen übriggeblieben sind [21]. Dieses Ergebnis ist vor allem interessant, da in der zuvor untersuchten Gα_{q/11}^{beKO}-Linie dieser Unterschied nicht zu beobachten war. Ebenfalls war die Gefäßdichte vermindert. Es scheint zum Untergang von Endothelzellen zu kommen, wenn der P₂Y₂-Rezeptor fehlt. Wie ist also der P₂Y₂-Rezeptor in der Entstehung von String Vessels beteiligt?

Wie schon zuvor erläutert, ist der Scherstress für die Differenzierung und das Überleben von Endothelzellen essenziell [21]. Der Scherstress führt in den Endothelzellen zu einer intrazellulären Erhöhung der Calciumkonzentration, was über eine zwischengeschaltete Signalkaskade zur Ausschüttung von ATP führt [19, 28]. Dieses ATP führt über auto- und parakrine Aktivierung von P₂Y₂-Rezeptoren an Endothelzellen zur Vasorelaxation und zu weiterer ATP-Ausschüttung [28]. Dieser Mechanismus verdeutlicht, dass der P₂Y₂-Rezeptor die endotheliale Reaktion auf Scherstress beeinflussen kann.

Eine weitere Möglichkeit wäre eine Interaktion von endothelialen Progenitorzellen, die für die Erhaltung und Stabilisierung von Endothelzellen wichtig sind und mit der NVC und purinergem Signaltransduktion verknüpft sind [98, 99]. Außerdem wurde gezeigt, dass der P₂Y₂-Rezeptor an der Apoptose-Inhibition von Neuronen essenziell beteiligt ist [86]. Es wäre daher denkbar, dass auch in anderen Zelltypen wie Endothelzellen der P₂Y₂-Rezeptor kritisch für das Zellüberleben ist. Deshalb wäre

eine Untersuchung der Apoptoserate dieser Zellen vor und nach der Cre-Induktion über immunhistochemische Färbungen gegen Marker für Apoptose interessant.

Ebenfalls ist zu hinterfragen, ob der höhere Anteil an nicht durchbluteten String Vessels und die verminderte Gefäßdichte zu einem Unterschied in der Gehirnperfusion führt und somit einen Einfluss haben könnte auf die gemessenen Blutflusswerte. Bei der Überprüfung der basalen Gehirnperfusion mit Hilfe der Mittelwerte der Basallinie aus dem CO₂-Experiment ist zunächst kein Unterschied festzustellen. Doch dieses Ergebnis kann nur als Hinweis in Betracht gezogen werden, da es sich bei den Speckle-Messungen um relative Werte handelt. Diese Methode ist also nicht geeignet, um Informationen über absolute Flusswerte zu erhalten. Besser wäre es, in Zukunft eine MRT-Untersuchung durchzuführen.

Ebenfalls wäre es hilfreich, zu erfahren, ob es durch die veränderte Gefäßstruktur zu ischämischen Schäden im Gehirngewebe kommt. Dazu wäre es zunächst sinnvoll, eine Hypoxiemessung durch einen hypoxiesensitiven Farbstoff (Hypoxyprobe) durchzuführen.

Außerdem wäre es interessant, die String Vessels der $G\alpha_{12/13}^{beKO}$ -Linie und einer $G\alpha_{11}^{KO}$ -Linie zu untersuchen, um zu überprüfen, welche Gruppe der G-Proteine in diesem Fall verantwortlich ist, da P_{2y2}-Rezeptoren über alle diese G-Proteine gekoppelt sein können (siehe Einleitung).

Es zeigt sich also ein deutlicher Effekt des P_{2y2}-Rezeptor-Knockouts auf die Struktur der Gehirngefäße in Form von einem vermehrten Anteil an String Vessels und einer verminderten Gefäßdichte. Wie es zur Entstehung von String Vessels kommt, welche Rolle der P_{2y2}-Rezeptor dabei spielt und welche Konsequenzen die String Vessels und die verminderte Gefäßdichte für die Hämodynamik und das Gehirngewebe haben, gilt es in Zukunft zu erforschen.

4.6 Fazit

Die zu Anfang festgelegte Forschungshypothese, dass der P_{2y2}-Rezeptor als $G\alpha_{q/11}$ -gekoppelter Rezeptor für die Hemmung der zerebralen Blutflusssteigerung im Rahmen einer Hyperkapnie verantwortlich ist, wurde widerlegt. Im Verlauf der Versuche hat sich aber herausgestellt, dass der P_{2y2}-Rezeptor mit beteiligt ist an der NVC und dass er großen Einfluss auf die Gefäßstruktur hat, was sich durch einen erhöhten Anteil an String Vessels und einer verminderten Gefäßdichte zeigte.

Schließlich stellt sich die Frage, welche Bedeutung diese Ergebnisse für Erkrankungen hat. Es wird beschrieben, dass bei Demenzen, nach Schlaganfällen oder auch nach Bestrahlung ein vermehrter Anteil an String Vessels zu finden ist [21]. Analog zu dem Vorkommen von String Vessels bei diesen Pathologien gibt es Beschreibungen, dass die NVC z.B. im natürlichen höheren Alter und bei dementiellen Erkrankungen eingeschränkt ist [30, 100, 101]. Zudem wird, wie zuvor erläutert, bei der Genese der String Vessels und in der NVC die Funktion des Scherstress auf Endothelzellen diskutiert. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass der P_{2Y_2} -Rezeptor wichtig für die Gefäßstruktur im Gehirn ist, was wiederum wichtig für einen adäquaten Ablauf der NVC sein könnte. Der endotheliale P_{2Y_2} -Rezeptor scheint also ein verbindendes Element zu sein, das über eine Scherstressantwort die Endothelzellen gesund erhält und zur NVC beiträgt. Darüber besteht ein Zusammenhang zu Pathogenese von kognitiven Einschränkungen im höheren Alter und bei Demenzen. Das sind zentrale gesundheitliche Einschränkungen, die in der alternden Gesellschaft eine immer größere Bedeutung einnehmen und für die es bisher kaum Therapiemöglichkeiten gibt.

Daher ist es wichtig, die Rolle des P_{2Y_2} -Rezeptors in diesem Zusammenhang tiefergehend zu verstehen. Dazu wäre es sinnvoll zu untersuchen, wie der P_{2Y_2} -Rezeptor auf den Zelluntergang bzw. auf den Zellerhalt und die Zellerneuerung von Endothelzellen einwirkt. Außerdem wäre es interessant zu erfahren, ob vermehrte String Vessels, die durch andere Ursachen, z.B. einen anderen Knockout, entstanden sind, den gleichen Effekt auf die NVC haben wie der endotheliale P_{2Y_2} -Knockout. Damit ließe sich weiter differenzieren, ob die Gefäßstruktur und nicht ein ATP-vermittelter Mechanismus hinter der Einschränkung im Start der NVC steht.

Ebenfalls sollte die Rolle des P_{2Y_2} -Rezeptors und von ATP in der NVC weiter beforscht werden. Es ist wichtig zu erfahren, an welcher Stelle im Gefäßbaum die NVC beginnt. Zudem sollte die ATP-Konzentration intraluminal und extraluminal in den einzelnen Gefäßabschnitten während der NVC gemessen werden, um zu erfahren, an welcher Stelle ATP bzw. die purinerge Signaltransduktion eine Rolle spielt. Wie schon zuvor erwähnt, wäre eine Hypoxyprobe hilfreich, um zu erfahren, ob die veränderte Gefäßstruktur und -Funktion ischämiebedingt zu den kognitiven Einschränkungen führt. Denn über die Einschränkungen auf Gefäßebene, die zu einer verschlechterten Sauerstoffversorgung führen, wäre eine eingeschränkte Funktionstüchtigkeit von Neuronen und auch ein Zellsterben erklärbar. Da bei

dementiellen Erkrankungen immer noch nicht hinreichend erklärt wurde, wie es zum Verlust von Gehirnmasse kommt und dabei die Pathomechanismen sogar von Region zu Region unterschiedlich zu sein scheinen [102], ist es wichtig, diesen vaskulären Ansatz weiter zu verfolgen und die Relevanz in den verschiedenen Gehirnregionen zu untersuchen.

Außerdem wären Verhaltensversuche mit der $P_2Y_2^{beKO}$ -Linie interessant, die sich auf Gedächtnisleistungen beziehen, um zu erfahren, ob tatsächlich ein direkter Zusammenhang zu kognitiven Einschränkungen besteht. Bezüglich der Ergebnisse zur CO_2 -induzierten Durchblutungssteigerung und zum Ängstlichkeitsverhalten sollte in Zukunft nach alternativen endothelialen Rezeptoren gesucht werden, die an einer CO_2 -Reaktion im Gehirn beteiligt sein könnten, wie beispielsweise OGR1 oder GPR4.

5 Zusammenfassung

Das Gehirn ist auf eine optimale Versorgung mit Sauerstoff und Glukose angewiesen. Daher muss ein stetiger Blutfluss gewährleistet werden, der bei erhöhtem Bedarf in einem aktiven Gebiet gesteigert werden kann [1]. Durch den Mechanismus der Neurovaskulären Kopplung (NVC) wird diese Anpassung gewährleistet. Ein weiterer starker Stimulus, der für eine Durchblutungssteigerung im Gehirn sorgt, ist CO₂ [103]. In beiden Mechanismen sind Endothelzellen, G-Proteingekoppelte Rezeptoren sowie ATP beteiligt [3, 15, 53, 72]. Daher stellt sich die Frage, ob ATP-Rezeptoren, wie der endotheliale P₂Y₂-Rezeptor, in der NVC und der CO₂-induzierten Durchblutungssteigerung eine Rolle spielen.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden Mäuse mit einem Knockout dieses Rezeptors in Gehirndothelzellen untersucht. Zuerst wurde der erfolgreiche Knockout mittels quantitativer PCR (qPCR) und Calcium Imaging der zuvor angezüchteten Gehirndothelzellen bestätigt. Dann wurde an narkotisierten Mäusen mittels Laser Speckle Contrast Imaging der Blutfluss unter elektrischer Stimulation des Whiskerpads und Beatmung mit CO₂ gemessen. Zur weiterführenden Untersuchung der Effekte des Rezeptor-Knockouts wurden Verhaltensversuche durchgeführt und immunhistochemische Färbungen von Gehirnschnitten ausgewertet.

Die Auswertung dieser Versuche zeigte, dass es unter CO₂-Stimulation keinen Unterschied zwischen den Genotypen gab. Ebenfalls keinen Unterschied gab es in den Verhaltenstests der Tiere. Bei der NVC gab es eine Verzögerung der Blutflusssteigerung und in den immunhistochemischen Färbungen zeigten sich Unterschiede in der Gefäßstruktur. Dabei waren ein vermehrter Anteil an String Vessels sowie eine verminderte Gefäßdichte zu beobachten.

Demnach hat der endotheliale P₂Y₂-Rezeptor keinen Einfluss auf die CO₂-induzierte Durchblutungssteigerung und das Ängstlichkeitsverhalten. Jedoch ist er beteiligt an der NVC und hat einen Einfluss auf die Gefäßstruktur im Gehirn. Dieses Ergebnis wäre durch eine Beteiligung des P₂Y₂-Rezeptors an der Fortleitung und Amplifizierung der NVC erklärbar. Außerdem lässt sich vermuten, dass dieser Rezeptor in der Gefäßdilatation und beim Überleben der Gefäße über Scherstress eine Rolle spielt. Um diese Mechanismen im Detail zu verstehen bedarf es weiterer Forschung in der Zukunft.

Abstract

The brain is dependent on a constant supply of oxygen and glucose. Therefore, a constant blood flow is essential. In addition, regions of the brain with higher activity have higher requirements of oxygen and glucose, so there is a need to match activity and blood flow instantly [1]. This match is provided by a mechanism called neurovascular coupling (NVC). Another strong stimulus increasing blood flow in the brain is CO₂. [103]. Both mechanisms involve brain endothelial cells, G-protein-coupled receptors and also ATP [3, 15, 53, 72]. Therefore, the aim of the study was to investigate whether the brain endothelial P₂Y₂-receptor plays a role in NVC and CO₂-induced blood flow increase.

To answer this question, mice with a knockout of the P₂Y₂-receptor in brain endothelial cells were investigated. First, the knockout was verified by qPCR and calcium imaging of cultured brain endothelial cells. Then, cerebral blood flow was measured with laser speckle contrast imaging in anesthetized mice under CO₂-stimulation and electrical stimulation of the whisker pad. For further investigations on the effects of the knockout, behavior tests and immunohistochemical examinations were performed.

The analysis of CO₂ experiments showed no difference between the genotypes in the CO₂-induced blood flow increase, as well as in anxiety-like behavior. During NVC there was a delay of the start of blood flow increase. Additionally, there was a difference in the vessel structure according to the amount of string vessels as well as the vessel concentration as shown by immunohistochemical stainings.

According to these findings the endothelial P₂Y₂-receptor has no influence on the CO₂-induced blood flow increase, as well as on the performed behavioral tests. However, there is an involvement in NVC and in the vessel structure of the brain. These results suggest that the P₂Y₂-receptor participates in the amplification and conduction mechanism of the NVC. Moreover, it seems that this receptor has a role in vessel dilatation and survival through shear stress. To understand these mechanisms in detail more research is needed in the future.

6 Literaturverzeichnis

1. Iadecola, C. and M. Nedergaard, *Glial regulation of the cerebral microvasculature*. Nat Neurosci, 2007. 10(11): p. 1369-76.
2. Cipolla, M.J., in *The Cerebral Circulation* 2010: San Rafael (CA).
3. Dormanns, K., et al., *Neurovascular coupling and the influence of luminal agonists via the endothelium*. J Theor Biol, 2015. 364: p. 49-70.
4. Toth, P., et al., *Purinergic glio-endothelial coupling during neuronal activity: role of P2Y1 receptors and eNOS in functional hyperemia in the mouse somatosensory cortex*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2015. 309(11): p. H1837-45.
5. Cipolla, M.J., R. Li, and L. Vitullo, *Perivascular innervation of penetrating brain parenchymal arterioles*. J Cardiovasc Pharmacol, 2004. 44(1): p. 1-8.
6. Anishchenko, A.M., et al., *Dynamics of Blood Pressure Elevation and Endothelial Dysfunction in SHR Rats During the Development of Arterial Hypertension*. Bull Exp Biol Med, 2015. 159(5): p. 591-3.
7. Shi, Y. and P.M. Vanhoutte, *Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes*. J Diabetes, 2017. 9(5): p. 434-449.
8. Rajendran, P., et al., *The vascular endothelium and human diseases*. Int J Biol Sci, 2013. 9(10): p. 1057-69.
9. Busch, M., et al., *Prävalenz des Schlaganfalls bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland*, 2013, Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung.
10. Gößwald, A., et al., *Prävalenz von Herzinfarkt und koronarer Herzkrankheit bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland*, 2013, Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung.
11. Chung, J.W., et al., *Distinct Roles of Endothelial Dysfunction and Inflammation in Intracranial Atherosclerotic Stroke*. Eur Neurol, 2017. 77(3-4): p. 211-219.
12. Gorelick, P.B., et al., *Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association*. Stroke, 2011. 42(9): p. 2672-713.
13. Tousoulis, D., et al., *Endothelial dysfunction in conduit arteries and in microcirculation. Novel therapeutic approaches*. Pharmacol Ther, 2014. 144(3): p. 253-67.
14. Iadecola, C., *The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease*. Neuron, 2017. 96(1): p. 17-42.
15. Guerra, G., et al., *The Role of Endothelial Ca²⁺ Signaling in Neurovascular Coupling: A View from the Lumen*. Vol. 19. 2018.
16. Hillman, E.M., *Coupling mechanism and significance of the BOLD signal: a status report*. Annu Rev Neurosci, 2014. 37: p. 161-81.
17. McCarron, J.G., M.D. Lee, and C. Wilson, *The Endothelium Solves Problems That Endothelial Cells Do Not Know Exist*. Trends Pharmacol Sci, 2017. 38(4): p. 322-338.
18. Nielsen, M.S., et al., *Gap junctions*. Compr Physiol, 2012. 2(3): p. 1981-2035.
19. Yamamoto, K., et al., *Visualization of flow-induced ATP release and triggering of Ca²⁺ waves at caveolae in vascular endothelial cells*. J Cell Sci, 2011. 124(Pt 20): p. 3477-83.

20. De Bock, K., M. Georgiadou, and P. Carmeliet, *Role of endothelial cell metabolism in vessel sprouting*. Cell Metab, 2013. 18(5): p. 634-47.
21. Brown, W.R., *A review of string vessels or collapsed, empty basement membrane tubes*. J Alzheimers Dis, 2010. 21(3): p. 725-39.
22. Oldendorf, W.H., M.E. Cornford, and W.J. Brown, *The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat*. Ann Neurol, 1977. 1(5): p. 409-17.
23. Fenstermacher, J., et al., *Structural and functional variations in capillary systems within the brain*. Ann N Y Acad Sci, 1988. 529: p. 21-30.
24. Sedlakova, R., R.R. Shivers, and R.F. Del Maestro, *Ultrastructure of the blood-brain barrier in the rabbit*. J Submicrosc Cytol Pathol, 1999. 31(1): p. 149-61.
25. Kniessel, U. and H. Wolburg, *Tight junctions of the blood-brain barrier*. Cell Mol Neurobiol, 2000. 20(1): p. 57-76.
26. Hawkins, B.T. and T.P. Davis, *The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease*. Pharmacol Rev, 2005. 57(2): p. 173-85.
27. Schmidt R. F., L.F., Heckmann M., *Physiologie des Menschen*. Vol. 31. 2010, Heidelberg: Springer Medizin Verlag. 979.
28. Wang, S., et al., *P2Y(2) and Gq/G(1)(1) control blood pressure by mediating endothelial mechanotransduction*. J Clin Invest, 2015. 125(8): p. 3077-86.
29. Salameh, A. and S. Dhein, *Effects of mechanical forces and stretch on intercellular gap junction coupling*. Biochim Biophys Acta, 2013. 1828(1): p. 147-56.
30. Phillips, A.A., et al., *Neurovascular coupling in humans: Physiology, methodological advances and clinical implications*. J Cereb Blood Flow Metab, 2016. 36(4): p. 647-64.
31. Mishra, A., *Binaural blood flow control by astrocytes: listening to synapses and the vasculature*. J Physiol, 2016.
32. Attwell, D., et al., *Glial and neuronal control of brain blood flow*. Nature, 2010. 468(7321): p. 232-43.
33. Mishra, A., et al., *Astrocytes mediate neurovascular signaling to capillary pericytes but not to arterioles*. Nat Neurosci, 2016. 19(12): p. 1619-1627.
34. Sun, W., et al., *Glutamate-dependent neuroglial calcium signaling differs between young and adult brain*. Science, 2013. 339(6116): p. 197-200.
35. Gallagher, C.J. and M.W. Salter, *Differential properties of astrocyte calcium waves mediated by P2Y1 and P2Y2 receptors*. J Neurosci, 2003. 23(17): p. 6728-39.
36. Gordon, G.R., et al., *Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles*. Nature, 2008. 456(7223): p. 745-9.
37. Magistretti, P.J. and I. Allaman, *Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule*. Nat Rev Neurosci, 2018. 19(4): p. 235-249.
38. Dale, N. and A.M. Sebastiao, *Dissecting neurovascular coupling mechanisms: a role for adenosine A2A receptor: An Editorial highlight for 'Correlation of transient adenosine release and oxygen changes in the caudate-putamen'*. J Neurochem. 2017 Jan;140(1):10-12. doi: 10.1111/jnc.13896. Epub 2016 Dec 15.
39. Wells, J.A., et al., *A critical role for purinergic signalling in the mechanisms underlying generation of BOLD fMRI responses*. J Neurosci, 2015. 35(13): p. 5284-92.
40. Braet, K., et al., *Astrocyte-endothelial cell calcium signals conveyed by two signalling pathways*. Eur J Neurosci, 2001. 13(1): p. 79-91.
41. Locovei, S., L. Bao, and G. Dahl, *Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(20): p. 7655-9.

42. Faraci, F.M. and D.D. Heistad, *Regulation of large cerebral arteries and cerebral microvascular pressure*. *Circ Res*, 1990. 66(1): p. 8-17.
43. Itoh, Y. and N. Suzuki, *Control of brain capillary blood flow*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2012. 32(7): p. 1167-76.
44. Dubyak, G.R. and C. el-Moatassim, *Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides*. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 1993. 265(3): p. C577-C606.
45. Hall, C.N., et al., *Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease*. *Nature*, 2014. 508(7494): p. 55-60.
46. Peebles, K.C., et al., *Human cerebral arteriovenous vasoactive exchange during alterations in arterial blood gases*. *J Appl Physiol*, 1985. 105(4): p. 1060-8.
47. Ogoh, S., et al., *Interaction between the ventilatory and cerebrovascular responses to hypo- and hypercapnia at rest and during exercise*. *J Physiol*, 2008. 586(17): p. 4327-38.
48. Huckstepp, R.T. and N. Dale, *Redefining the components of central CO2 chemosensitivity--towards a better understanding of mechanism*. *J Physiol*, 2011. 589(Pt 23): p. 5561-79.
49. Feldman, J.L., G.S. Mitchell, and E.E. Nattie, *Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity*. *Annu Rev Neurosci*, 2003. 26: p. 239-66.
50. Ainslie, P.N. and J. Duffin, *Integration of cerebrovascular CO2 reactivity and chemoreflex control of breathing: mechanisms of regulation, measurement, and interpretation*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009. 296(5): p. 11.
51. Winter, A., et al., *Differential behavioral sensitivity to carbon dioxide (CO2) inhalation in rats*. *Neuroscience*, 2017. 346: p. 423-433.
52. Huckstepp, R.T., et al., *Connexin hemichannel-mediated CO2-dependent release of ATP in the medulla oblongata contributes to central respiratory chemosensitivity*. *J Physiol*, 2010. 588(Pt 20): p. 3901-20.
53. Hawkins, V.E., et al., *Purinergic regulation of vascular tone in the retrotrapezoid nucleus is specialized to support the drive to breathe*. *Elife*, 2017. 6.
54. Glodzik, L., et al., *Cerebrovascular reactivity to carbon dioxide in Alzheimer's disease*. *J Alzheimers Dis*, 2013. 35(3): p. 427-40.
55. Wang, X., et al., *Hypercapnic acidosis activates KATP channels in vascular smooth muscles*. *Circ Res*, 2003. 92(11): p. 1225-32.
56. Lavi, S., et al., *Impaired cerebral CO2 vasoreactivity: association with endothelial dysfunction*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. 291(4): p. 9.
57. Bergfeld, G.R. and T. Forrester, *Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia*. *Cardiovasc Res*, 1992. 26(1): p. 40-7.
58. Barna, B.F., et al., *Purinergic receptor blockade in the retrotrapezoid nucleus attenuates the respiratory chemoreflexes in awake rats*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2016. 217(1): p. 80-93.
59. Dulla, C.G., et al., *Adenosine and ATP link PCO2 to cortical excitability via pH*. *Neuron*, 2005. 48(6): p. 1011-23.
60. Gourine, A.V., et al., *ATP is a mediator of chemosensory transduction in the central nervous system*. *Nature*, 2005. 436(7047): p. 108-11.
61. Yao, C.A. and J.R. Carlson, *Role of G-proteins in odor-sensing and CO2-sensing neurons in Drosophila*. *J Neurosci*, 2010. 30(13): p. 4562-72.
62. Ludwig, M.G., et al., *Proton-sensing G-protein-coupled receptors*. *Nature*, 2003. 425(6953): p. 93-8.
63. Syrovatkina, V., et al., *Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins*. *J Mol Biol*, 2016. 428(19): p. 3850-68.

64. Gacasan, S.B., D.L. Baker, and A.L. Parrill, *G protein-coupled receptors: the evolution of structural insight*. AIMS Biophys, 2017. 4(3): p. 491-527.
65. Abbracchio M.-P., B.J.-M., Boyer J. L., Burnstock G., Ceruti S., Fumagalli M., Gachet C., Hills R., Humphries R. G., Jacobson K. A., Kennedy C., King B. F., Lecca D., Miras-Portugal M. T., Weisman G. A., *P2Y receptors: P2Y2 receptor.*, Last modified on 24/02/2017, IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY, .
66. Offermanns, S., et al., *Embryonic cardiomyocyte hypoplasia and craniofacial defects in G alpha q/G alpha 11-mutant mice*. EMBO J, 1998. 17(15): p. 4304-12.
67. Decrock, E., et al., *IP3, a small molecule with a powerful message*. Biochim Biophys Acta, 2013. 7(86): p. 2.
68. Brozovich, F.V., et al., *Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders*. Pharmacol Rev, 2016. 68(2): p. 476-532.
69. Lazarowski, E.R., et al., *Pharmacological selectivity of the cloned human P2U-purinoceptor: potent activation by diadenosine tetraphosphate*. Br J Pharmacol, 1995. 116(1): p. 1619-27.
70. Maguire, J.J. and A.P. Davenport, *Regulation of vascular reactivity by established and emerging GPCRs*. Trends Pharmacol Sci, 2005. 26(9): p. 448-54.
71. Ralevic, V. and G. Burnstock, *Receptors for purines and pyrimidines*. Pharmacol Rev, 1998. 50(3): p. 413-92.
72. Horiuchi, T., et al., *Analysis of purine- and pyrimidine-induced vascular responses in the isolated rat cerebral arteriole*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. 280(2): p. H767-76.
73. Guns, P.J., et al., *Endothelium-dependent relaxation evoked by ATP and UTP in the aorta of P2Y2-deficient mice*. Br J Pharmacol, 2006. 147(5): p. 569-74.
74. Moreira, T.S., et al., *Independent purinergic mechanisms of central and peripheral chemoreception in the rostral ventrolateral medulla*. J Physiol, 2015. 593(5): p. 1067-74.
75. Kaur, H., et al., *Single-cell profiling reveals heterogeneity and functional patterning of GPCR expression in the vascular system*. Nat Commun, 2017. 8: p. 15700.
76. Horiuchi, T., et al., *Comparison of P2 receptor subtypes producing dilation in rat intracerebral arterioles*. Stroke, 2003. 34(6): p. 1473-8.
77. Assmann, J.C., J. Korbelin, and M. Schwaninger, *Genetic manipulation of brain endothelial cells in vivo*. Biochim Biophys Acta, 2016. 1862(3): p. 381-94.
78. Ridder, D.A., et al., *TAK1 in brain endothelial cells mediates fever and lethargy*. J Exp Med, 2011. 208(13): p. 2615-23.
79. Moers, A., et al., *G13 is an essential mediator of platelet activation in hemostasis and thrombosis*. Nat Med, 2003. 9(11): p. 1418-22.
80. Prut, L. and C. Belzung, *The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review*. Eur J Pharmacol, 2003. 463(1-3): p. 3-33.
81. Buccafusco JJ, e., *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience. 2nd edition*. 2009, Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis.
82. Assmann, J.C., et al., *Isolation and Cultivation of Primary Brain Endothelial Cells from Adult Mice*. Bio Protoc, 2017. 7(10).
83. Hayashi, H. and H. Miyata, *Fluorescence imaging of intracellular Ca²⁺*. J Pharmacol Toxicol Methods, 1994. 31(1): p. 1-10.
84. Boas, D.A. and A.K. Dunn, *Laser speckle contrast imaging in biomedical optics*. J Biomed Opt, 2010. 15(1): p. 011109.

85. Briers, J.D., *Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging*. *Physiol Meas*, 2001. 22(4): p. R35-66.
86. Arthur, D.B., et al., *Inhibition of apoptosis by P2Y2 receptor activation: novel pathways for neuronal survival*. *J Neurosci*, 2006. 26(14): p. 3798-804.
87. Elhusseiny, A., et al., *Functional acetylcholine muscarinic receptor subtypes in human brain microcirculation: identification and cellular localization*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1999. 19(7): p. 794-802.
88. Suzuki, N., N. Hajicek, and T. Kozasa, *Regulation and physiological functions of G12/13-mediated signaling pathways*. *Neurosignals*, 2009. 17(1): p. 55-70.
89. Burnstock, G., *Purinergic Signalling and Endothelium*. *Curr Vasc Pharmacol*, 2016. 14(2): p. 130-45.
90. Webb, T.E., et al., *The P2Y purinoceptor in rat brain microvascular endothelial cells couple to inhibition of adenylate cyclase*. *Br J Pharmacol*, 1996. 119(7): p. 1385-92.
91. Burnstock, G., *Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. 22(3): p. 364-73.
92. Burnstock, G. and G.E. Knight, *Cell culture: complications due to mechanical release of ATP and activation of purinoceptors*. *Cell Tissue Res*, 2017. 370(1): p. 1-11.
93. Hattori, K., et al., *Microfluidic perfusion culture chip providing different strengths of shear stress for analysis of vascular endothelial function*. *J Biosci Bioeng*, 2014. 118(3): p. 327-32.
94. Abbracchio M.-P., J.K.A., Burnstock G., Boeynaems J.-M., Ceruti S., Fumagalli M., Gachet C., Kennedy C., King B. F., Lecca D., Weisman G. A., Boyer J. L., Humphries R. G., Inoue K., Miras-Portugal M. T., Ralevic V., , *P2Y receptors*, IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY.
95. Kumar, N.N., et al., *PHYSIOLOGY. Regulation of breathing by CO(2) requires the proton-activated receptor GPR4 in retrotrapezoid nucleus neurons*. *Science*, 2015. 348(6240): p. 1255-60.
96. Tresguerres, M., J. Buck, and L.R. Levin, *Physiological carbon dioxide, bicarbonate, and pH sensing*. *Pflugers Arch*, 2010. 460(6): p. 953-64.
97. Cai, C., et al., *Stimulation-induced increases in cerebral blood flow and local capillary vasoconstriction depend on conducted vascular responses*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018. 115(25): p. E5796-E5804.
98. Chung, C.P., et al., *The level of circulating endothelial progenitor cell is associated with cerebral vasoreactivity: a pilot study*. *Biomed Res Int*, 2015. 258279(10): p. 15.
99. Santhanam, A.V., et al., *Endothelial progenitor cells stimulate cerebrovascular production of prostacyclin by paracrine activation of cyclooxygenase-2*. *Circ Res*, 2007. 100(9): p. 1379-88.
100. Tarantini, S., et al., *Pharmacologically-induced neurovascular uncoupling is associated with cognitive impairment in mice*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2015. 35(11): p. 1871-81.
101. Toth, P., et al., *Functional vascular contributions to cognitive impairment and dementia: mechanisms and consequences of cerebral autoregulatory dysfunction, endothelial impairment, and neurovascular uncoupling in aging*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2017. 312(1): p. H1-H20.
102. Rodriguez-Oroz, M.C., et al., *The relationship between atrophy and hypometabolism: is it regionally dependent in dementias?* *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2015. 15(7): p. 015-0562.
103. Brian, J.E., Jr., *Carbon dioxide and the cerebral circulation*. *Anesthesiology*, 1998. 88(5): p. 1365-86.

7 Anhänge

7.1.1 Geräte

Tabelle 2 Geräte

Zellkultur:	
Absaugpumpe	
Brutschrank CB 210	Binder, Tuttlingen (D)
Homogenisator (Dounce)	KimbleChase, Vineland, NJ (USA)
Inverses Mikroskop IM35	Carl Zeiss Microscopy, Jena (D)
Sicherheitswerkbank Typ II BHA48	Faster, Cornareda (IT)
Wasserbad	Eigenbau
Zentrifuge Mikro 220r	Hettich, Tuttlingen (D)
Zentrifuge Universal 320r	Hettich, Tuttlingen (D)
Calcium Imaging:	
Axio Examiner.D1	Carl Zeiss Microscopy, Jena (D)
Kamera, EXi Blue (EXI-BLU-R-F-M-14-C)	QImaging, Surrey, BC (CA)
Flusskammer RC-26 mit Slice Anchor SHD-26H/2	Warner Instruments, Hamden, CT (USA)
Filterset 02 (Fura-2)	Carl Zeiss Microscopy, Jena (D)
Imaging Control Unit (Typ 1103)	FEI Munich (Till Photonics), Gräfelfing (D)
Objektiv W N-Achroplan 10x/0,3	Carl Zeiss Microscopy, Jena (D)
Peristaltikpumpe 505S	Watson-Marlow, Rommerskirchen (D)
Polychrome V	FEI Munich (Till Photonics), Gräfelfing (D)
Spritzenpumpe Modell 540100	TSE Systems, Bad Homburg (D)
Stage Adapter SA-TS100	Warner Instruments, Hamden, CT (USA)
Strahlenteiler FT 395	Carl Zeiss Microscopy, Jena (D)
Strahlenteiler FT 495	Carl Zeiss Microscopy, Jena (D)

Speckle Imaging:	
3-Wege-Hähne	
Elektroden	Eigenbau
Gasmischeinheit Maus ZUA-82-GMW	FMI Föhr Medical GmbH, Seeheim/Ober-Beerbach (D)
Isofluran-Verdampfer, Vet. Med. VAPOR	Drägerwerk AG, Lübeck (D)
Klemme für den Kopf	Eigenbau
Kapnometer microCapStar End-Tidal CO ₂ Analyser	CWE Inc., Ardmore, PA (USA)
Beatmungsgerät, MiniVent Type 845	Harvard Apparatus, Holliston, MA (USA)
Speckle Kamera FLPI Full Field Laser Perfusion Imager	Moor Instruments, Axminster (GB)
Datenerfasser Power Lab 8/30	ADInstruments, Dunedin (NZ)
Labornetzteil Power Supply EA- PS3016-10	EA Elektro-Automatik, Viersen (D)
Schläuche	
Stimulator, STG 4002	Multi Channel Systems, Reutlingen (D)
Temperaturregler TCAT-2LV Temperature Controller	Physitemp Instruments, Inc., Clifton, NJ (USA)
Immunhistologie:	
Kryotom, CM3050	Leica Microsystems, Wetzlar (D)
Fluoreszenzmikroskop Leica DMI 6000B	Leica Microsystems, Wetzlar (D)
Filtersets A4 (dapi), L5 (Alexa-488), N3 (Cy3)	Leica Microsystems, Wetzlar (D)
qRT-PCR:	
PCR-Cycler ABI Prism 7000 Sequence Detection System	AB Applied Biosystems, Foster City, CA (USA)

Sonstige:	
Analysewaage MC1	Sartorius, Göttingen (D)
Feinwaage ABT 100-5M	Kern & Sohn, Balingen (D)
Feinwaage AE 100	Mettler-Toledo, Columbus, OH (USA)
Magnetheizrührer RCH	IKA-Werke, Staufen (D)
Shaker DRS12 neolab	Heidelberg (D)

7.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien

Zellkultur:	
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen (D)
Pasteurpipetten (150 mm, 230 mm)	Th.Geyer, Renningen (D)
Filterpapier	Whatman (GE Healthcare), Freiburg (D)
Deckgläser (rund, Ø 12 mm)	Menzel, Braunschweig (D)
Einwegskalpell Feather	Osaka (JPN)
Kanüle BD Microlance (23G, 27G) BD	Franklin Lakes, NJ (USA)
Polypropylen-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen (D)
Pasteurpipetten Assistent	Sondheim / Röhn (D)
Spritzen BD Plastikpak (1 ml)	BD, Franklin Lakes, NJ (USA)
Zellkulturplatten (24-Well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen (D)
Tygon® Schläuche	Saint-GobainPerformance Plastics, Mickleton, NJ (USA)
Pipettenspitzen (10 – 1000 µL)	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Pipettman (1 - 10 µL, 50 - 200 µL, 100 - 1000 µL)	Gilson, Middleton, WM (USA)
Pipetten Reference (0,5 -10 µL, 10 - 100 µL, 100 – 1000 µL)	Eppendorf, Hamburg (D)
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg (D)

Speckle:	
Injekt-F 1 ml	Braun, Melsungen (D)
Vasofix® Braunüle® 16 G, 18 G	Braun, Melsungen (D)
Pur-Zellin	Hartmann, Heidenheim (D)
Mygliol® 812	Caelo & Loretz, Hilden (D)
Ringer®-Lösung	Berlin-Chemie AG, Berlin (D)
OP-Faden Seide schwarz, nicht resorbierbar, geflochten 3/0 USP, 2 metric	RESORBA, Nürnberg (D)
AGANI Needle 27G x 3/4"	Terumo, Shibuya, Tokio (JPN)
Wattestäbchen 15 cm, 4-5 mm	NOBA Verbandmittel Danz, Wetter (D)
Immunhistologie:	
Deckgläser NR.1, ca. 24x50 mm	Th.Geyer, Renningen (D)
Leica 819 Low Profile Microtome Blades	Leica Microsystems, Wetzlar (D)
Leica Tissue Freezing Medium	Leica Biosystems, Nussloch (D)
Super Frost Objektträger	Thermo Scientific, Waltham, MA (USA)
DAKO-Pen	Dako Denmark A/S, Glostrup (DK)
Sonstiges:	
Kohlenstoffdioxid	Hausanschluss
Medizinischer Sauerstoff	Hausanschluss
Stickstoff	Hausanschluss

7.1.3 Chemikalien

Tabelle 4 Chemikalien

Zellkultur:	
Antibiotic/Antimycotic 1 %	Life Technologies (Gibco®) Darmstadt (D)
Dextran (15.000 – 30.000 g/mol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
DMEM	Life Technologies (Gibco®) Darmstadt

	(D)
DMEM-F12	Life Technologies (Gibco®) Darmstadt (D)
DNase I	Roche, Basel (CH)
Dulbecco's PBS	GE Healthcare (PAA), Freiburg (D)
Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Heparin 5000 IE/ml	Ratiopharm, Ulm (D)
Kollagen IV (murin)	BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ (USA)
Kollagenase/Dispase	Roche, Basel (CH)
L-Glutamin	Life Technologies (Gibco®) Darmstadt (D)
N α -Tosyl-L-Lysinchloromethylketon (TLCK)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Penicillin/Streptomycin	GE Healthcare (PAA), Freiburg (D)
Plasma abgeleitetes Bovines Serum	First Link, Wolverhampton (UK)
Puromycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Calcium Imaging:	
Adenosin-5'-triphosphat-Dinatrium-Salzhydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt (D)
Carbachol (Fluka®Analytical)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
D(+)-Glukose-Monohydrat	Merck, Darmstadt (D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Ethanol	J.T. Baker (Avantor Performance Materials), Center Valley, PA (USA)
Fura-2-AM	Life Technologies (Invitrogen™), Darmstadt (D)
Heparin 5000 IE/ml	Ratiopharm, Ulm (D)
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt (D)

Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt (D)
Natriumbikarbonat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Natriumchlorid	Avantor Performance Materials (J.T. Baker®), Center Valley, PA (USA)
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	AppliChem, Darmstadt (D)
Pluronic® F-127 (in DMSO gelöst)	Life Technologies (Invitrogen™), Darmstadt (D)
Probenicid	Life Technologies (Invitrogen™), Darmstadt (D)
Medikamente:	
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim (D)
Ketamin 10 %	bela-pharm, Vechta (D)
Tamoxifen, T5648	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Xylazin Rompun® 2 %	Bayer AG, Leverkusen (D)
Immunhistologische Färbung:	
4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Methanol	

7.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 5 Puffer und Lösungen

1x Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,4	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄
Messpuffer für das Calcium-Imaging	125 mM NaCl, 5 mM KCl, 516,4 mM MgSO ₄ *7H ₂ O, 26,1 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O, 33,5 mM NaCO ₃ , 1,8 mM CaCl ₂ , 10 mM D-Glukose
Tamoxifenlösung	auf 1 mg Tamoxifen 5 µl 100 % Ethanol

	und 45 µl Mygliol	
Eindeckmedium Mowiol/DABCO	6,0 g Glycerin, 2,4 g Mowiol 4-88, 6,0 ml destilliertes Wasser, steril, 12,0 ml 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5), 25 mg pro ml DABCO Lösung	
Fura-2-Färbelösung		
Medium	Bestandteile	Endkonzentration
Dextranlösung (18 % Dextran)	5,4 g Dextran (Dieses in 30 ml PBS mittels Hitze (Mikrowelle) gelöst) 300 µl Penicillin/Streptomycin 300 µl L-Glutamin	18 % 100 U/ml / 0,1 g/ml 2 mM
Arbeitsmedium	20 ml DMEM/F12 200 µl Penicillin/Streptomycin 200µl L-Glutamin	- 100 U/ml / 0,1 g/ml 2 mM
Verdaumedium	20 ml DMEM 200 µl Penicillin/Streptomycin Kurz vor Gebrauch hinzuzufügen: 200 µl Collagenase/Dispase 200 µl Tosyl-L-Lysin Chlormethylketon (TLCK) 80 µl DNAse I	- 100 U/ml / 0,1 g/ml 1 mg/ml 0,147 µg/ml 40 U/ml
Vollmedium	40 ml DMEM/F12 10 ml Plasma-derived-bovine-Serum 500 µl Antibiotic/Antimycotic 500 µl L-Glutamin 150 µl Heparin (5000 U/ml) 500 µl ECGS	- 20 % 1 x 2 mM 75 I.E. / ml 1 %

7.1.5 Kits

Tabelle 6 Kits

NucleoSpin® RNA	Macherey & Nagel, Düren (D)
Platinum SYBR Green qPCR Supermix UDG with ROX, Cat. 11744-500 Kit	Life Technologies (Invitrogen™), Darmstadt (D)

7.1.6 Antikörper

Tabelle 7 Antikörper

Primärantikörper:	
Anti-CD31 Ratten IgG (1:500), 557355	BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ (USA)
Anti-Kollagen IV Kaninchen IgG (1:1000), ab6586	Abcam, Cambridge (GB)
Sekundärantikörper:	
Anti-Ratten IgG Alexa Fluor 488 Esel IgG (1:400), A-21208	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA (USA)
Anti-Kaninchen IgG Cy3 Esel IgG (1:400), 711-165-152	Jackson/Dianova, Hamburg (D)

7.1.7 Primer

Tabelle 8 Primer

Gen (Proteinname)	Primer	Sequenz (5'- 3')	Amplikon
P2ry2 (P2Y2)	mP2ry2_F mP2ry2_R	CCTCACCACCTCAAGAGCAG TATCCCAGTTCGTCCCCCTC	109
Ppia (Cyclophilin A)	mPpia_F mPpia_R	GCATACAGGTCCTGGCATCT CATCCAGCCATTTCAGTCTTGG	97

7.1.8 Software

Tabelle 9 Software

FEI Live Acquisition V2.5.0.26	FEI Munich, Gräfelfing (D)
FEI Offline Analysis V2.5.0.26	FEI Munich, Gräfelfing (D)
Fiji (ImageJ Distribution)	http://fiji.sc/
GraphPad Prism® V5.00	GraphPad, LaJolla, CA (USA)
LabChart 7	ADInstruments, Dunedin (NZ)
LAS AF	Leica Microsystems, Wetzlar (D)
LAS AF Lite	Leica Microsystems, Wetzlar (D)
MC Stimulus II	Multi Channel Systems, Reutlingen (D)
moorFLPI Full Field Laser Perfusion Imager V2.1	Moor Instruments, Axminster (GB)

8 Danksagungen

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Markus Schwaninger für seine wissenschaftliche und methodische Unterstützung. Außerdem bei meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Jan Wenzel für seine stetige Hilfestellung und Begleitung, die diese Arbeit erst möglich machte.

Allen Mitarbeitern des pharmakologischen Instituts und Beteiligten an meiner Doktorarbeit für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung.

Mein Dank gilt ebenfalls dem Zentrum für Herz und Kreislaufforschung (DZHK) für die finanzielle Unterstützung, die es ermöglichte, mich intensiv auf diese Arbeit zu konzentrieren.

Außerdem danke ich meiner Familie, meinen Freunden sowie meinem Freund für ein stetig offenes Ohr und die unermüdliche Motivation und Stärkung.