

Aus dem Institut für kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie im
Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. U. Pohl

**Regulation der Calciumsensitivität der glatten Muskulatur von
Widerstandsgefäßen durch NO und den Lipidmediator Sphingosin-1-
Phosphat**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Daniel Sollinger

aus
Ravensburg

Jahr
2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Ulrich Pohl
2. Berichterstatter	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Roman Haberl Priv. Doz. Dr. med. Stefan Kääb
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. med. S.-S. Bolz
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	14.10.2010

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
1. Einleitung.....	5
1.1 Die Myosin Leichtketten Kinase (smMLCK).....	6
1.2 Die Myosin Leichtketten Phosphatase (MLCP).....	6
1.3 Regulation der Kontraktion.....	8
1.3.1 Calciumabhängige Mechanismen.....	8
1.3.2 Calciumsensitivierende Mechanismen.....	7
2. Material.....	15
2.1 Versuchstiere.....	15
2.2 Präparate.....	15
2.3 Versuchsaufbau und Geräte.....	15
2.4 Lösungen und Pharmaka.....	16
2.5 Hersteller, der für die Puffer und das Kulturmedium verwendeten Substanzen.....	18
2.6 Sonstige verwendete Lösungen.....	18
2.7 Hersteller, der in den angegebenen Lösungen und Puffer verwendeten Substanzen.....	18
2.8 Sonstige verwendete Substanzen und Geräte.....	18
3. Methoden.....	20
3.1 Präparation der arteriellen Widerstandgefäße.....	20
3.2 Kanülierung der Widerstandsgefäße.....	20
3.3 Kultivierung und Transfektion der zu untersuchenden Widerstandsgefäße.....	22
3.4 Mikroskop und Versuchsaufbau.....	22
3.5 Fura-2-Methode.....	23
3.6 Calciummesssystem.....	23
3.7 Durchmesserregistrierung.....	24
3.8 Versuchsprotokoll.....	25
3.9 Immunfluoreszenzaufnahmen.....	25
3.10 Präparation und Kanülierung der thorakalen Aorta.....	25
3.11 Versuchsprotokoll der Stimulation von Aorten.....	26
3.12 Homogenisierung und Fraktionierung der Aorta.....	27
3.13 Immunoblotting.....	27
3.14 Versuchsauswertung und statistische Analyse.....	28

4.	Ergebnisse.....	30
4.1	Einfluss von NO auf die Calciumsensitivität glatter Muskelzellen.....	30
4.2	Beteiligung der MLCP an der Calciumsensitivität.....	32
4.3	Antagonisierbarkeit des NO-vermittelten Einflusses auf die Calciumsensitivität glatter Muskelzellen.....	34
4.4	Einfluss von S1P auf die Aktivität der MLCP.....	34
4.5	Funktionelle Messung des Einflusses von S1P auf NO-vermittelte Calciumdesensitivierung.....	36
4.6	Einfluss von S1P und SNP auf die subzelluläre Verteilung von RhoA.....	38
4.7	Möglichkeit der Modulation von RhoA durch NO über die cGK.....	39
4.8	Effekte einer Inhibierung von RhoA/Rhokinase auf NO-vermittelte Dilatationen.....	40
5.	Diskussion.....	44
5.1	Diskussion der erhobenen Befunde.....	44
5.2	Vergleich mit anderen Arbeiten.....	51
5.3	Methodenkritik.....	55
5.4	Klinische Relevanz der Befunde zur Calciumsensitivität der Gefäßmuskelzellen.....	59
6.	Zusammenfassung.....	61
7.	Literaturverzeichnis.....	64
8.	Danksagung.....	75
9.	Tabellarischer Lebenslauf.....	76

1. Einleitung

Kontraktion und Erschlaffung vaskulärer glatter Muskelzellen der Widerstandsgefäße sind wichtiger Bestandteil der Blutdruckregulation und der Möglichkeit des Kreislaufsystems, sich über einen weiten Bereich dynamisch an unterschiedliche Belastungen anzupassen. Durch die so ausgelöste Änderung des Strömungswiderstandes in den Blutgefäßen wird im Zusammenspiel mit dem Herzen sowohl eine dem aktuellen Bedarf angepasste Versorgung der einzelnen Organstromgebiete, als auch die größtmögliche Ökonomisierung des Herzkreislauf-Systems in seiner Gesamtheit erreicht. Dabei entfällt der Hauptanteil des Gesamtwiderstandes auf die kleinen, distal im Gefäßbett liegenden Arterien und Arteriolen, die sogenannten Widerstandsgefäße, mit einem Gefäßdurchmesser von 20-200 µm. Auf die arteriellen Leitungsgefäße entfallen hingegen nur ungefähr 20% und auf die venösen Abschnitte des Kreislaufs nur 7 % des Gesamtwiderstandes.

Der Zusammenhang zwischen dem Strömungswiderstand in einem Rohr und den ihn bestimmenden Faktoren wurde experimentell bereits in der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts durch Poiseuille bzw. unabhängig davon, durch Hagen beschrieben und 1858 durch Neumann und Hagenbach in einer Formel zusammengefasst, die sie zu Ehren der beiden Erstbeschreiber Hagen-Poiseuille-Gleichung nannten:

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

In dieser Gleichung existiert nur eine Variable, die schnell verändert werden kann, und die sich aufgrund ihrer physikalischen Bedeutung für die Kontrolle des Widerstandes eignet: der Radius r eines Gefäßes. Reduktionen des Radius erhöhen den Widerstand und senken so den Blutfluss in den nachgeschalteten Blutgefäßen. Effektoren der Gefäßkonstriktion sind die glatten Muskelzellen (SMC), die konzentrisch um das Gefäßlumen in der Media der arteriellen Gefäße angeordnet sind und durch ihren kontraktilen Apparat in der Lage sind, sich aktiv zu kontrahieren. Biochemische Grundlage der Kontraktion ist die Interaktion von Aktinfilamenten mit Myosin II, dessen ATPase-Aktivität am mit dem Aktin direkt interagierenden Myosinköpfchen letztlich die Verschiebung der Filamente gegeneinander und damit die Kontraktion der Gesamtzelle bewirkt. Diese ATPase-Aktivität ist streng reguliert. So ist das Myosinköpfchen nur nach Phosphorylierung eines Serins in Position 19 der regulatorischen Untereinheit, der so genannten *Myosin Regulatory Light Chain*₂₀ (MLC₂₀), in der Lage, mit dem Aktinfilament zu interagieren (Kamm & Stull 1985). Der Kontraktionszustand glatter

Muskelzellen ergibt sich damit aus dem Quotienten von phosphorylierter MLC_{20} ($MLC_{20}\text{-P}$) zu unphosphorylierter MLC_{20} .

$$F = \frac{MLC_{20}\text{-P}}{MLC_{20}}$$

Der streng regulierte Phosphorylierungsgrad der MLC_{20} wird im wesentlichen durch zwei Enzyme bestimmt: die *Myosin Leichtketten Kinase* (*Myosin light-chain kinase*, MLCK) und die antagonistische *Myosin Leichtketten Phosphatase* (*Myosin light-chain phosphatase*, MLCP).

1.1. Die Myosin Leichtketten Kinase (smMLCK)

Bei der MLCK der glatten Muskulatur (smooth muscle MLCK; smMLCK) handelt es sich um ein monomeres Enzym, das sich sowohl durch seinen Genlocus, als auch durch seine Aminosäuresequenz vom Analogon in der quergestreiften Muskulatur unterscheiden lässt. Aus diesem smMLCK-Gen entstehen drei verschiedene Genprodukte, die gewebeabhängig exprimiert werden. In ausdifferenzierten glatten Muskelzellen wird die „short smooth muscle MLCK“ vorgefunden, ein Protein mit einem Molekulargewicht von 130 – 150 kDa, wobei das Molekulargewicht von der Splicevariante abhängt (Verin et al. 1998) (Birukov et al. 1998) (Smith et al. 1998). Embryonale, nichtmuskuläre endotheliale Zellen und solche aus Zellkulturen hingegen exprimieren überwiegend das 208 – 214 kDa große „long smooth muscle MLCK“-Isoform (Fisher & Ikebe 1995) (Verin et al. 1998). Das dritte Transskript des smMLCK-Gens ist das Telokin, welches ein Molekulargewicht von 17 kDa aufweist und lediglich in glatten Muskelzellen exprimiert wird. Hierbei handelt es sich um den C-terminalen Rest des Holoenzym, das selbst keine Kinaseaktivität besitzt.

1.2 Die Myosin Leichtketten Phosphatase (MLCP)

Als funktioneller Gegenspieler der smMLCK fungiert das heterotrimere Enzym MLCP. Bei der MLCP handelt es sich um ein trimeres Holoenzym, bestehend aus der 37 kDa großen katalytischen Untereinheit PP1C δ und zwei weiteren Proteinen, der 110-130 kDa großen Untereinheit MYPT1 und einem kleinen Protein von 20 kDa, welches als M20 bezeichnet wird (Alessi et al. 1992). Serin-/ Threonin-Phosphatasen, wie die PP1C δ , sind unspezifische Enzyme. Über 50 Substrate der PP1C δ sind mittlerweile identifiziert worden, darunter z.B. die Phosphorylase und die Phosphorylasekinase. Die Phosphatasespezifität der MLCP in glatten Muskelzellen gegenüber der MLC_{20} wird durch die MYPT1 und ihren Targetingmechanismus gewährleistet, da die katalytische Untereinheit selbst nicht in der Lage ist, Myosin zu binden (Mitsui et al. 1992) (Okubo et al. 1992) (Okubo et al. 1994). Strukturell ist dabei die MYPT1 das

Grundgerüst, an dem sowohl die Phosphatase als auch das M20-Protein binden. Abbildung 1 stellt den Aufbau der MLCP graphisch dar.

Abb. 1:

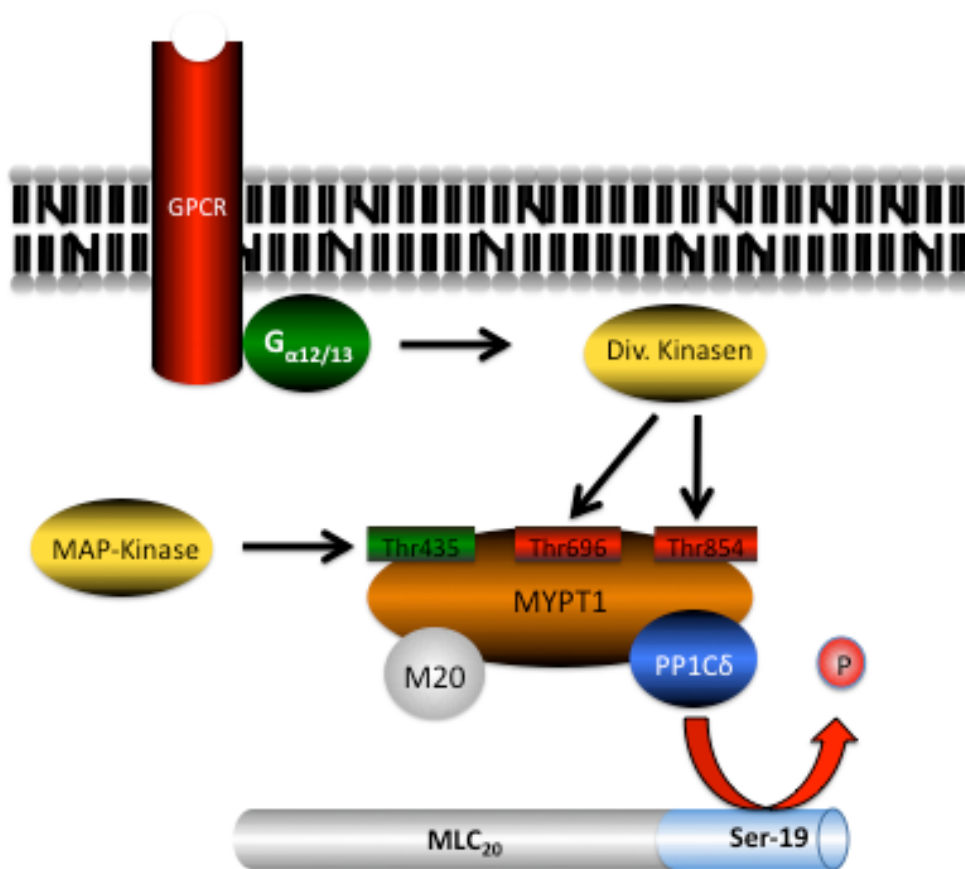


Abb. 1: Schematische Darstellung der MLCP und der vorgeschalteten Regulationsmechanismen.

Neben strukturellen Aufgaben werden der MYPT1 auch regulatorische Funktionen zugeschrieben. Durch Phosphorylierung der MYPT1 soll es zu einer Aktivitätsänderung der MLCP kommen (Ito et al. 2004). Alternative Mechanismen der MLCP-Regulation sind die Phosphorylierung eines inhibitorischen Proteins (CPI-17) (Eto et al. 1997), die Dissoziation des Holoenzym und die Translokation an verschiedene Kompartimente der glatten Muskelzellen (Shin et al 2002).

Im Gegensatz zur MYPT1 ist über die kleine Untereinheit M20 relativ wenig bekannt. Zwei verschiedene Splicevarianten mit einer Sequenz von 161 (M $_{18}$) respektive 186 Aminosäuren (M $_{21}$) sind identifiziert worden (Mabuchi et al. 1999). Diese beiden Isoformen werden gewebespezifisch exprimiert. Die Funktion von M20 ist unbekannt. Es wird aber spekuliert, dass es an der Kontraktionsregulation von Nierengefäßen und an der Bindung von Myosindimeren beteiligt

ist (Ito et al. 2004). Bekannt ist, dass es die Aktivität der PP1C δ nicht beeinflusst (Hartshorne et al. 1998).

1.3. Regulation der Kontraktion

1.3.1. Calciumabhängige Mechanismen

Heilbrunn und Wiercinski konnten an quergestreiften Muskelzellen zeigen, dass die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ in diesen Muskelzellen dosisabhängig zu Kontraktion führt (Heilbrunn et Wiercinski, 1947). Die Identifizierung des intrazellulären Rezeptorproteins Troponin für Ca^{2+} in denselben Zellen führte schließlich zur Entdeckung der Signaltransduktionskaskade, an deren Ende die Interaktion von Aktin mit Myosin steht (Ebashi et al. 1967). In glatten Muskelzellen übernimmt Calmodulin (CAM) die Funktion des Troponins als intrazelluläres Ca^{2+} -Rezeptorprotein, das nach Bindung von vier Ca^{2+} -Ionen eine hohe Affinität K_{CaM} zur MLCK entwickelt. Lediglich im Komplex aus MLCK mit $CAM(Ca^{2+})_4$ ist die MLCK in der Lage, MLC_{20} an Ser-19 zu phosphorylieren, da dann die Autoinhibition der MLCK aufgehoben wird.

Quellen für den Anstieg von Ca^{2+} im Zytosol sind der transmembranäre Einstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem Extrazellulärraum und/oder die Freisetzung aus intrazellulären Speichern. In glatten Muskelzellen ist der für den transmembranären Ca^{2+} -Einstrom wichtigste Mechanismus der Influx durch den spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanal (Kuriyama et al. 1995) (Vogalis et al. 1991) (Vogalis et al. 1992). Außer durch Depolarisation der Zellmembran kann er auch durch Agonisten aktiviert werden, die seine Leitfähigkeit für Calcium steigern. Zu den bisher identifizierten gehört auch das Noradrenalin (Nelson et al. 1988). Daneben führen auch nicht selektive Kationenkanäle und der *Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel (CRAC)* zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ (Enoki et al. 1995) (Enoki et al. 1995) (Putney 1990). Die Bedeutung dieser beiden Kanaltypen im Rahmen der Kontraktion ist aber weiterhin unklar, da sich die Untersuchungsergebnisse je nach untersuchtem Gewebe oder Zelltypus unterscheiden. Zwei Mechanismen, die zu einer Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern führen, sind bekannt: 1) transiente $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung aktiviert den Ca^{2+} -getriggerten, „*Ca²⁺-induced Ca²⁺ release*“ (CIRC) über Rezeptoren der Membran des sarkoplasmatischen Retikulum (SR) (Zucchi & Ronca-Testoni 1997); 2) Inositoltriphosphat (IP_3) führt zu einem *IP₃-induced Ca²⁺ release* (IIRC). Ausgelöst wird der IIRC Mechanismus durch Substanzen, wie Angiotensin II, die an $G_{\alpha q}$ -gekoppelte Rezeptoren andocken (Ferris & Snyder 1992). $G_{\alpha q}$ -Proteine aktivieren die Phospholipase C, das die Produktion von IP_3 aus Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat katalysiert. Die dadurch erreichte Ca^{2+} -Freisetzung scheint dabei jedoch nur in der initialen Phase der durch Agonisten induzierten Kontraktion eine Rolle zu spielen (Karaki et al., 1984 und 1988).

Eine Zwischenstellung nimmt ein Na^+ - Ca^{2+} -Antiporter ein. Seine Inhibierung kann unter experimentellen Bedingungen Kontraktion auszulösen (Iwamoto et al. 1992) (Ozaki et al. 1978). Wahrscheinlicher ist jedoch, dass dieser Mechanismus für die Ca^{2+} -Elimination wichtig ist. Auch hier liegen widersprüchliche Untersuchungsergebnisse vor (Ganitkevich & Isenberg 1993) (Aaronson & Benham 1989) (Fleischmann et al. 1996), die wahrscheinlich auf Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies und Geweben zurückzuführen sind.

Um eine einmal ausgelöste Kontraktion zu beenden und die Relaxation einzuleiten, muss die intrazelluläre Konzentration von freiem Ca^{2+} wieder auf das Ruhenniveau gesenkt werden. Auch hierfür existieren mehrere Mechanismen. Bei der Einleitung der Relaxation steht zunächst einmal die Notwendigkeit, den Ca^{2+} -Einstrom zu beenden, im Vordergrund. Einer der hierfür verantwortlichen Botenstoffe ist der *Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor* (EDHF), der auf parakrinem Weg durch die Aktivierung eines K^+ -Kanals eine Hyperpolarisation der Zellmembran, und damit eine Inaktivierung des L-Typ Calciumkanals bewirkt (Clark & Fuchs 1997) (Nagao et al. 1992). Für die Entfernung der Calciumionen aus dem Zytosol stehen drei Mechanismen zur Verfügung. Neben dem Na^+ / Ca^{2+} -Antiporter existieren aktive Calciumpumpen, zum einen plasmalemmale Ca^{2+} -ATPasen und zum anderen Ca^{2+} -ATPasen (SERCA), welche in die Membran des glatten SR integriert sind (Raeymaekers et al. 1985) (Wuytack et al. 1982). Die Aktivität der zellmembranständigen Ca^{2+} -ATPasen wird z.B. durch die Proteinkinase C (Furukawa et al. 1988) (Furukawa et al. 1989) und medikamentös durch Natriumnitroprussid (SNP) über den intrazellulären second messenger zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP) (Yoshida et al. 1991) positiv beeinflusst.

Die Aktivität der SERCA wird parakrin durch Stickstoffmonoxid (NO) reguliert. So zeigte sich, dass in glatten Muskelzellen der Trachea die Ca^{2+} -Aufnahme in das SR durch NO, beziehungsweise zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) begünstigt wird (Imai et al., 1990). Auch in kleinen Mesenterialgefäßen konnten ähnliche Effekte gezeigt werden (Andriantsitohaina et al. 1995). Demnach würde NO seine dilatierende Wirkung über eine Reduktion der intrazellulären Konzentration von freiem Ca^{2+} ausüben. Bolz *et al.* wiesen jedoch in isolierten Mikrogefäßen nach Endothelstimulation mit Acetylcholin eine Senkung der intrazellulären Calciumkonzentration und Dilatationen nach, die nicht durch NO ausgelöst waren (Bolz et al. 1999). Nach ihren Untersuchungen in Widerstandsgefäßen ist EDHF, nicht jedoch NO für die Calciumsenkung verantwortlich. Daher muss es auch alternative Mechanismen für die relaxierende Wirkung des NO auf glatte Muskelzellen dieser Gefäßabschnitte geben.

1.3.2. Calciumsensitivierende Mechanismen

Lange Zeit wurde angenommen, dass das Ausmaß der MLC_{20} -Phosphorylierung proportional der intrazellulären Calciumkonzentration ist, und somit die Kontraktionsregulation in glatten

Muskelzellen ausschließlich durch die Aktivität der MLCK bestimmt wird. Diese Annahme erwies sich jedoch als falsch. Folgende Beobachtungen erbrachten Hinweise darauf, dass der Phosphorylierungsgrad der MLC_{20} nicht allein von der Aktivität der MLCK abhängt, sondern auch von der Aktivität der MLCP beeinflusst wird.

Zunächst erbrachten Studien an vaskulären glatten Muskelzellen, in denen die intrazelluläre Calciumkonzentration mittels Fluorophoren gemessen wurde, dass sich das Ausmaß der entwickelten Kraft bei gleicher intrazellulärer Konzentration von freiem Ca^{2+} in Abhängigkeit des auslösenden Stimulus sehr unterschiedlich entwickelte (Somlyo & Somlyo 1968). Untersuchungen an den gleichen Zellen, die mit β -Escin permeabilisiert wurden, zeigten, dass es sich dabei um einen Mechanismus handelt, der G-Protein gekoppelte Rezeptoren involviert. Weiterhin zeigte sich, dass permeabilisierte Muskelzellen, die mit $GTP\gamma S$, einem chemisch stabilen Analogon des GTP, behandelt wurden, bei konstanter intrazellulärer Calciumkonzentration eine höhere Kraft entwickelten, als unbehandelte Kontrollzellen (Kitazawa et al. 1989). Auf der anderen Seite zeigte sich eine Abnahme der sich entwickelnden Kraft und der MLC_{20} -Phosphorylierung bei wiederholter Depolarisation von glatten Muskelzellen trotz gleicher Konzentration des intrazellulären freien Calciums. Zwei Begriffe werden in der Literatur gebraucht, um diese Phänomene zu beschreiben: Calciumsensitivierung bzw. -desensitivierung. Dieses Konzept trägt der Beobachtung Rechnung, dass nicht nur der intrazelluläre Calciumspiegel das Ausmaß der MLC_{20} -Phosphorylierung und damit die Kraftentwicklung bestimmt, sondern auch des Verhältnis von aus MLCK- und MLCP-Aktivität.

$$MLC_{20}\text{-P} = \frac{MLCK_{\text{aktiv}}}{MLCP_{\text{aktiv}}}$$

Aus dieser Gleichung wird ersichtlich, dass Aktivitätsänderungen beider Enzyme zu einer Beeinflussung der Calciumsensitivität führen können. Kontraktionen glatter Muskelzellen, also Anstieg von $MLC_{20}\text{-P}$, sind also nicht nur ein Resultat der MLCK-Aktivität, sondern können bei unveränderter intrazellulärer Konzentration von freiem Calcium auch durch Abnahme der MLCP-Aktivität bewirkt werden, was einer apparenten „Calciumsensitivierung“ des kontraktile Apparates entspricht.

Zunächst zur MLCK: es gibt zwei Möglichkeiten die Aktivität dieses Enzyms zu beeinflussen. Im C-terminalen Bereich befindet sich eine Phosphorylierungsstelle, die von einer Vielzahl von Kinasen angesteuert wird. Der wichtigste Vertreter dieser ist die cyclisches Adenosinmonophosphat-abhängige Proteinkinase (PKA) (Conti & Adelstein 1981). Bei dieser Stelle handelt es sich um ein Serin, das in phosphoryliertem Zustand inhibitorisch auf die Aktivität des Enzyms

wirkt, indem es die Affinität (K_{CaM}) des Calcium-Calmodulinkomplexes zur MLCK vermindert. Untersuchungen derselben Arbeitsgruppe zeigten, dass sich die K_{CaM} nach der Phosphorylierung um den Faktor zehn erhöhte. Es handelt sich also um einen PKA-vermittelten Mechanismus der Desensitivierung. Die Aktivität der MLCK kann jedoch auch unabhängig von der K_{CaM} variieren. Es gibt innerhalb des Enzyms zwei Konsensusstellen für prolangerichtete Phosphorylierung durch Kinasen der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) -Familie. Veränderungen an diesen beiden Stellen führen zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} der MLCK, und damit zur Sensitivierung (Klemke et al. 1997) (Morrison et al. 1996). Die physiologische Relevanz der MLCK im Rahmen der Calciumsensitivität ist jedoch umstritten, da sämtliche zitierten Ergebnisse in-vitro Befunde sind. So wurde z. B. die Phosphorylierung der MLCK an Ser-512 durch die PKA nur bei einem pH-Wert beobachtet, der deutlich außerhalb des physiologischen Bereiches liegt (Conti & Adelstein 1981). Neuere Daten aus Untersuchungen an isolierten glatten Muskelzellen aus Rattenaorten sowie an isolierten murinen Aortenringen konnten jedoch erstmalig zeigen, dass eine *AMP-aktivierte Proteinkinase* (AMPK) in der Lage ist die MLCK an Ser-815 zu phosphorylieren und somit die Affinität K_{CaM} zu reduzieren (Horman et al. 2008).

Ein Signalweg, der die Calciumsensitivität in glatten Muskelzellen nach den vorliegenden Befunden sicher beeinflusst, ist der Rho/Rhokinase-Signalweg. Dieser Mechanismus ist deutlich komplexer. Bei RhoA handelt es sich um ein 21 kDa großes Protein aus der Familie der kleinen GTPasen, die in der Lage sind, Guanosin triphosphat (GTP) zu Guanosindiphosphat (GDP) zu hydrolysieren. Kleine GTPasen werden über Agonisten aktiviert, die auf sogenannte trimerische *G protein-coupled Rezeptoren* (GPCR) wirken. Eine Übersichtsarbeit von Somlyo und Somlyo referiert den aktuellen Wissensstand hinsichtlich physiologischer Zusammenhänge und der involvierten Agonisten (Somlyo & Somlyo 2003). Abb. 2 zeigt den prinzipiellen Mechanismus.

Es gibt Befunde, die zeigen, dass die Rhokinase in vitro in der Lage ist, MLC_{20} an Ser-19 und Thr-18 zu phosphorylieren. In vivo ist dies jedoch kein physiologisch relevanter Mechanismus (Sward et al. 2000). Nachdem MLC_{20} wahrscheinlich kein physiologisches Substrat der Rhokinase ist, stellt sich die Frage, über welche Kaskade die Rho/Rhokinase-vermittelte Calciumsensitivierung realisiert wird. Wieder waren es Somlyo und Somlyo, die die Hypothese aufstellten, dass es sich bei der MLCP um dieses Substrat handeln müsse – und dies bereits bevor die MLCP identifiziert wurde (Somlyo et al., 1989). An Hand von Experimenten, die diese Überlegung aufnahmen, konnte auch gezeigt werden, dass $GTP\gamma S$ die MLC_{20} -Phosphorylierung unabhängig von Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration über eine Inhibierung der Phosphataseaktivität bewirkt (Kitazawa et al. 1991). Über die Mechanismen auf molekularer Ebene besteht aber größtenteils noch Unklarheit. Dies wird darüber hinaus noch durch die

Tatsache erschwert, dass sich Ergebnisse aus unterschiedlichen Zellkulturen und Gewebearten nicht einfach aufeinander übertragen lassen.

Abb. 2:

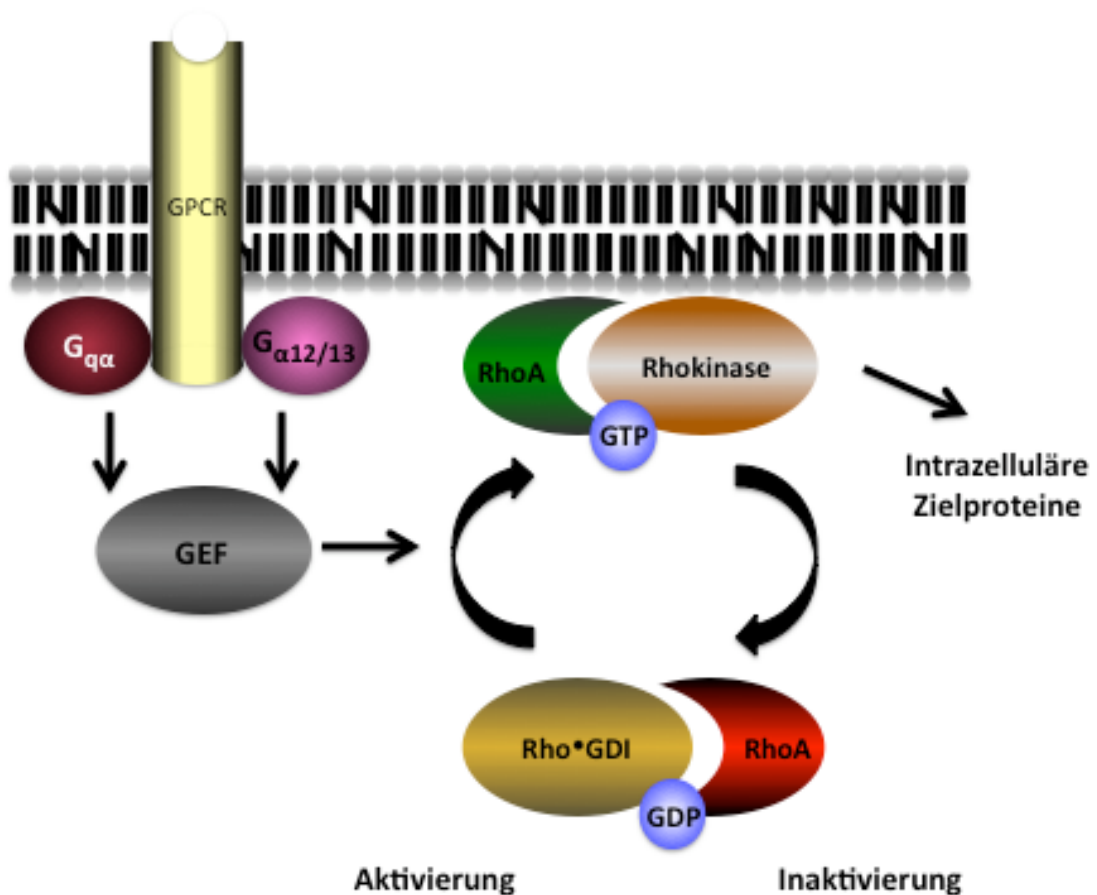


Abb. 2: In inaktivem Zustand liegt RhoA cytosolisch in einem relativ stabilen Komplex mit GDP und einem akzessorischen Protein namens *Rho GDP-dissociation inhibitor* (RhoGDI) vor. Nach Interaktion eines Agonisten mit seinem spezifischen Rezeptor (GPCR) kommt es zur Aktivierung von gewebeabhängig exprimierten *Guanine-nucleotide exchange Faktoren* (GEFs). Der Aktivierungsschritt ist in den meisten Fällen eine Phosphorylierung an Tyrosinresten der GEFs durch Tyrosinkinase. Bisher konnte das für die Kinase c-Src und die *focal adhesion kinase* (FAK) nachgewiesen werden, die beide mit den GEFs LARG und PDZ-RhoGEF interagieren können (Vouret-Craviari et al. 2002) (Chikumi et al. 2002). Im aktivierten Zustand sind die GEFs in der Lage, aus dem RhoA-GDP-GDI-Komplex GDP gegen GTP auszutauschen. Nur im GTP-beladenen Zustand ist RhoA aktiv und kann an die Plasmamembran translozieren, um dort mit der Rhokinase in Wechselwirkung zu treten (Bhattacharyya & Wedegaertner 2003; Bhattacharyya & Wedegaertner 2003; Gong et al. 1997; Wells et al. 2001). Treten einmal RhoA-GTP und die Rhokinase in Kontakt, so kommt es innerhalb der Kinase zu einer Konformationsänderung und zu einer Autophosphorylierung. Nun kann sie innerhalb der Signaltransduktionskaskade die ihr nachgeschalteten Proteine aktivierend oder inhibierend beeinflussen. (Modifiziert aus Somlyo & Somlyo 2003)

Neben den kontraktionsfördernden Effekten der Calciumsensitivierung lassen sich in glatten Muskelzellen Phänomene beobachten, die durch Aktivierung der MLCP zu einer Calciumdesensitivierung führen. Wu und Mitarbeiter konnten in glatten Muskelzellen aus dem Ileum von Kaninchen Dilatationen nachweisen, die durch Aktivierung der MLCP bei konstanter Konzentration von freiem intrazellulärem Ca^{2+} hervorgerufen wurden (Wu et al. 1996). In diesen Untersuchungen konnte auch gezeigt werden, dass dies über cGMP, den intrazellulären second messenger von NO, vermittelt wird. Dies würde sich mit Beobachtungen decken, die in intakten Widerstandsgefäßen gemacht wurden. In diesen wird der dilatatorische Effekt des NOs nicht über eine Reduktion des intrazellulären Calciums ausgeübt (Bolz et al. 1999). Unterstützt wird dies durch neuere Studien. In ihnen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der MLCP über die *cGMP-abhängige Kinase* (cGKI α) auch in Mesangialzellen (Torrecillas et al. 2000) und in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen (Surks et al. 1999) stattfindet.

Calciumsensitivierung und –desensitivierung lassen sich nicht nur in isolierten glatten Muskelzellen nachweisen. Meininger et al. konnten in Versuchen an isolierten, intakten Widerstandsgefäßen zeigen, dass unterschiedliche Agonisten bei unterschiedlicher $[Ca^{2+}]_i$ zu Konstriktionen gleichen Ausmaßes führen (Meininger et al. 1991). Auf diesem Versuchsmodell basierend konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass Calciumsensitivierung unter pathophysiologischen Bedingungen ein bedeutsamer Mechanismus der Vasokonstriktion ist. In Versuchen, die die konstriktiven Eigenschaften des atherogenen *oxidierten Low Density Lipoproteins* (oxLDL) zum Gegenstand hatten, wurde eine Erhöhung der Empfindlichkeit des kontraktile Apparates gegenüber Ca^{2+} in glatten Muskelzellen isolierter, intakter Widerstandsgefäße nachgewiesen. In Analogie zu den aus Zellkulturen erhobenen Befunden konnte durch spezifische Inhibierung des RhoA/ Rhokinasweges mit Y27632 und der C3-Transferase nachgewiesen werden, dass oxLDL eine Calciumsensitivierung über den RhoA/ Rhokinaseweg ausübt (Bolz et al. 2000). Es existierten zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen jedoch keine Daten über die distal dieser beiden Proteine gelegenen Schritte der Calciumsensitivierung in intakten Widerstandsgefäßen. Darüber hinaus war nicht bekannt, ob oxLDL direkt an Rezeptoren der Zellmembran zur Sensitivierung führt, oder seinen Effekt auf Ebene der nachgeschalteten second messenger ausübt.

Die Arbeitsgruppe um Sarah Spiegel identifizierte einen Metaboliten des Sphingosinstoffwechsels mit parakrinen Eigenschaften, das *Sphingosin-1-Phosphat* (S1P) (Zhang et al. 1991). S1P beeinflusst zelluläre Vorgänge wie Motilität, Proliferation und Apoptose, die mit einer Aktivierung zytoskeletaler Veränderungen einhergehen (Le Stunff et al. 2004) (Olivera et al. 1997) (Spiegel et al. 1994). Ähnliche Veränderungen werden auch durch den RhoA-Signalweg hervorgerufen. Augé

et al konnten in ihren Arbeiten zeigen, dass S1P die mitogenen Effekte des oxLDL vermittelt (Auge et al. 1999). Da S1P auch in der Lage ist, Kontraktionen glatter Muskelzellen auszulösen, und die myogene Antwort in Widerstandsgefäßen beeinflusst (Bolz et al. 2003), liegt die Vermutung nahe, dass S1P unter physiologischen Bedingungen zu einer Calciumsensitivierung führen kann. Jedoch existierten in intakten Widerstandsgefäßen zu dieser Hypothese noch keine Daten.

In der vorliegenden Arbeit sollten nun folgende Fragen untersucht werden. Ist NO in der Lage, in glatten Muskelzellen isolierter, intakter Widerstandsgefäße die MLCP zu aktivieren, und somit zu einer Calciumdesensitivierung zu führen? Sind dabei der intrazelluläre second messenger cGMP und seine nachgeschaltete Kinase cGKI α involviert? Ist S1P in VSMCs ein Aktivator des RhoA/ Rhokinasewegs, und somit in der Lage zu einer Calciumsensitivierung zu führen? Welches ist die Nettoantwort der glatten Muskelzelle, wenn gleichzeitig calcium-sensitivierende, z. B. S1P-Freisetzung via RhoA, und calcium-desensitivierende Mechanismen, via NO und cGMP, aktiviert werden? Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit sollte der direkte Nachweis einer MLCP- Beeinflussung durch die genannten Mechanismen sein.

2. Material

2.1 Versuchstiere

Für die simultanen Diameter-/Calciummessungen wurden isolierte Widerstandsgefäße von syrischen Goldhamstern (Gattung *Mesocricetus*) verwendet, die teils aus eigener Zucht stammten, teils von Charles River Laboratory, Sulzfeld, erworben wurden. Es wurden Hamster beiderlei Geschlechtes mit einem Alter von vier bis acht Monaten verwendet. Das Gewicht der Hamster betrug dabei zwischen 90 und 125 Gramm.

2.2 Präparate

Die isolierten Widerstandsgefäße stammten aus Seitenästen der den M. gracilis versorgenden Arterie. Die dabei untersuchten Arterien hatten einen Durchmesser von $197 \mu\text{m} \pm 16$ ($n=70$).

2.3 Versuchsaufbau und Geräte

- Aluminiumwärmeplatte und Halterung für die Mikromanipulatoren: Eigenbau der Werkstatt des Instituts für Physiologie der LMU-München
- Mikromanipulator M-152: Narishige, Tokio, Japan
- Organbad, Außendurchmesser 4.2 cm: Eigenbau der Werkstatt des Instituts für Physiologie der LMU-München
- Organbad-Gummidichtungsring, Außendurchmesser 4.0 cm und Organbad-Quarzglasscheibe, Durchmesser 4.0 cm: Bachhofer, Reutlingen
- Wärme-Wasserbad, Typ 3047: Labotec, Wiesbaden
- Borosilikatglaskapillaren, Länge (L) = 100 mm, Außendurchmesser (D_a) = 1.0 mm, Innendurchmesser (D_i) = 0.58 mm, Durchmesser an der Spitze (d_a) = 0.16 mm: Science Products GmbH, Hofheim
- Vertikal-Mikropipettenpuller, Modell P 2000, Sutter Instruments, USA
- Silikonschläuche, $D_i = 1.0$ mm, $d_a = 1.0$ mm: Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- Dreivegehahn Discofix: B. Braun Melsungen AG, Melsungen
- 11/0 Faden Ethilon Polyamid monofil: Ethicon, Nordersted
- Mikrochirurgische Pinzetten, no. 4 und 5 Orginal „Dumont“: Eisenhut Instrumente GmbH, Frittlingen/Tuttlingen
- Irisschere VANNAS, Mikro-Federschere, 8 cm gerade: Eisenhut Instrumente GmbH, Frittlingen/Reutlingen
- Operationsmikroskop Zeiss, Zeiss, Jena
- Perfusor segura FT: B. Braun Melsungen AG, Melsungen
- Feinwaage, Typ SBA 31: scaltec Instruments, Heiligenstach

- pH-Meter, Typ pH 525: WTW, Weilheim
- Inverses Mikroskop, Diaphot 300: Nikon GmbH, Düsseldorf
- Objektiv Olympus APO UV-2: Olympus Optical Co. (Europa) GmbH, Hamburg
- Restlichtkamera, FA76 SIT: Grundig AG, Fürth
- Software zur Durchmesserregistrierung: Entwickelt von Herrn J. Baxevanis, Medizinische Universität Lübeck
- Calciummesssystem, bestehend aus:
Delta Scan Illumination System, Microscope Photometer, Photomultiplier 710, Optical Chopper OC 4000, Shuttle Controller SC-500, Motordriver-MD 5020, Lamp Power-Supply LPS 220, Computer Interface, Software Felix; alle von PTI, Wedel
- Computer des Calciummesssystems: Pentium 90, Vobis, Wiesbaden
- Software zur statistischen Auswertung: Stata Version 4.0, Stata Corporation, College Station, Texas, USA
- Reagenzröhrchen, Blue Max Jr., 15 ml Conical Tubes Polypropylene: Falcon, Becton Dickinson Labware Europe, Meylan Cedex, Frankreich
- Spritzenfilter steril, Porengröße 0.22 μm , Rotilabo: M&B Stricker, Oberschleißheim

2.4 Lösungen und Pharmaka

Konzentrationsangaben in [mmol/L]

- **Standard-MOPS-Puffer:** NaCl 145, KCl 4.7, CaCl_2 3.0; MgSO_4 1.17, NaH_2PO_4 1.2, Pyruvat 2.0, Glucose 5.0, MOPS 3.0, EDTA 0.02

Um die Widerstandsgefäße zu depolarisieren, wurde die K^+ -Konzentration der Lösung von 4.7 mmol/L auf 125 mmol/L erhöht. Gleichzeitig wurden durch die unten aufgeführten Lösungen verschiedene Ca^{2+} -Konzentrationen (0 - 3 mmol/L) in dem Organbad erreicht. Änderungen der KCl- und der CaCl_2 -Konzentration wurden bezüglich der Ionenstärke durch Änderungen der NaCl-Konzentration kompensiert (Programm „Ionostat“, entwickelt am Physiologischen Institut der Universität Rostock).

- **Calciumfreier MOPS-Puffer:** NaCl 147, KCl 4.7, MgSO_4 1.17, NaH_2PO_4 1.2, Pyruvat 2.0, Glucose 5.0, MOPS 3.0, EDTA 1.00
- **K^+ 125 mmol/L MOPS-Puffer, Ca^{2+} 0 mmol/L:** NaCl 26.5, KCl 125, MgSO_4 1.17, NaH_2PO_4 1.2, Pyruvat 2.0, Glucose 5.0, MOPS 3.0, EDTA 1.00

- **K⁺ 125 mmol/L MOPS-Puffer, Ca²⁺ 0.5 mmol/L:** NaCl 27.2, KCl 125, CaCl₂ 0.5, MgSO₄ 1.17, NaH₂PO₄ 1.2, Pyruvat 2.0, Glucose 5.0, MOPS 3.0, EDTA 0.02
- **K⁺ 125 mmol/L MOPS-Puffer, Ca²⁺ 1.0 mmol/L:** NaCl 26.7, KCl 125, CaCl₂ 1.0, MgSO₄ 1.17, NaH₂PO₄ 1.2, Pyruvat 2.0, Glucose 5.0, MOPS 3.0, EDTA 0.02
- **K⁺ 125 mmol/L MOPS-Puffer, Ca²⁺ 2.0 mmol/L:** NaCl 25.7, KCl 125, CaCl₂ 2.0, MgSO₄ 1.17, NaH₂PO₄ 1.2, Pyruvat 2.0, Glucose 5.0, MOPS 3.0, EDTA 0.02
- **K⁺ 125 mmol/L MOPS-Puffer, Ca²⁺ 3.0 mmol/L:** NaCl 24.7, KCl 125, CaCl₂ 3.0, MgSO₄ 1.17, NaH₂PO₄ 1.2, Pyruvat 2.0, Glucose 5.0, MOPS 3.0, EDTA 0.02
- **Fura 2-AM-MOPS-Puffer:** Fura 2-AM 2µmol/L; 5% Rinderserumalbumin (BSA); NaCl 145; KCl 4.7; CaCl₂ 3.0; MgSO₄ 1.17; NaH₂PO₄ 1.2; Pyruvat 2.0; Glucose 5.0; MOPS 3.0; EDTA 0.02

Die entsprechend eingewogenen Substanzmengen wurden mit dem vorgesehenen Volumen von Aqua-bidest. unter Anwendung eines Magnetrührers gelöst. Anschließend wurden der pH-Wert mit 1N NaOH auf pH 7.4 titriert, die Pufferlösungen steril filtriert und bis zum Gebrauch für maximal 14 Tage bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

- **Kulturmedium:** Leibovitz L15, #L4386, Sigma, Inhaltsstoffe (Konzentrationsangaben in [mg/l]):

CaCl₂ 140; KCl 400; KH₂PO₄ 60; MgCl₂ 93.68; MgSO₄ 97.67; NaCl 80000; NaH₂PO₄ 190.12; D(+) Galaktose 900; Phenolrot 10 (als pH-Indikator); Na-Pyruvat 50; dl-Alanin 450; l-Arginin 500 (freie Base); l-Asparagin 200; l-Cystin 120 (freie Base); l-Glutamin 300; Glycin 200; l-Histidin 250 (freie Base); l-Isoleucin 250; l-Leucin 125; l-Lysin 125 (freie Base); dl-Methionin 150; dl-Phenylalanin 250; l-Serin 250; dl-Threonin 600; l-Tryptophan 20; l-Thyrosin 300; dl-Valin 200; d-Ca Pantothenat 1; Cholinchlorid 1; Folsäure 1; i-Inositol 2; Nikotinamid 1; Pyridoxal HCl 1; Flavin Mononucleotid 0.1; Thiaminmonophosphat(HCl) 1.

Vor der Verwendung wurde das Stammmedium mit 15% hitzeinaktiviertem (50min bei 56°C) Kälberserum (Cool Calf 2, #C6204, Sigma), 20000 U/l Penicillin, 20 mg/l Streptomycin und 0.4 µmol/l L-Glutamin versetzt. Anschließend wurde die Lösung mit 1N HCl unter

Zuhilfenahme eines pH-Meters auf pH 7.4 eingestellt und das fertige Kulturmedium mit Sterilfilter in sterile 100 ml-Flaschen filtriert.

2.5 Hersteller, der für die Puffer und das Kulturmedium verwendeten Substanzen:

- NaCl, KCl, NaH₂PO₄, Glucose, EDTA: Merck, Darmstadt
- MgSO₄: Fluka Chemie AG, Schweiz
- MOPS, Leibovitz L50, 15% Kälberserum (Cool Calf 2), Penicillin, Streptomycin, L-Glutamin: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
- Pyruvat: Serva GmbH & Co KG, Heidelberg
- Fura 2-AM: Biomol GmbH, Hamburg

2.6 Sonstige verwendete Lösungen:

- **Lysispuffer** (Konzentrationsangaben in [mg/dl]): 856 mg Sucrose, 10.2 mg MgCl₂, 7.4 EDTA, 1,54 mg Dithiothreitol (DTT), 12,11 mg Tris, 1 Tablette Roche Complete Mini Proteaseinhibitor
- **Auftragspuffer** (Konzentrationsangaben in [g/l]): 7.57 g Tris, 20 g SDS, 100 g Glycerin, 0.05 g Bromphenolblau, 7.56 g Mercaptoethanol
- **Running-Puffer**: 15 g Tris; 72 g Glycin; 5 g SDS ad 5 l Aqua bidest.
- **Transferpuffer**: 15 g Tris; 72 g Glycin ad 5 l Aqua bidest.
- **Waschpuffer**: 30.3 g Tris; 43.9 g NaCl ad 5 l Aqua bidest. pH auf 7.5 mit HCl einstellen; 1.5 ml Tween 20 zufügen
- **Sammelgel (4%)**: 6 ml bidestiliertes Wasser; 2,5 ml Tris-Puffer (pH 6,8); 100 µl SDS (10%); 1,3 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0.8%); 50 µl Ammoniumpersulfat (APS) (10%); 10 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED)
- **Trenngel (7%)**: 25.1 ml bidestiliertes Wasser; 12,5 ml Tris-Puffer (pH 8,8); 500 µl SDS (10%); 11.6 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0.8%); 250 µl APS (10%); 25 µl TEMED

2.7 Hersteller, der in den angegebenen Lösungen und Puffer verwendeten Substanzen:

- NaCl, EDTA, MgCl₂: Merck, Darmstadt
- APS, DTT, Mercaptoethanol, Bromphenolblau, HCl, SDS, Tris, Glycin, Tween 20: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
- Complete Mini Proteaseinhibitor, Roche Applied Science, Mannheim
- Rotiphorese NF-Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0.8%): Carl Roth, Karlsruhe
- TEMED: Peribo Science Deutschland GmbH, Bonn

2.8 Sonstige verwendete Substanzen und Geräte:

- Polyklonaler Anti-MYPT1 Antikörper: Covance, Berkley

- Monoklonaler Anti-RhoA Antikörper, HRP-markierte Sekundärantikörper: Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
- FITC-markierte Anti-Maus-IgG und Anti-Kaninchen IgG Antikörper: Abcam Plc., Cambridge
- Triton X100, Formaldehyd, NS1619, Noradrenalin, Acetylcholin: Sigma Aldrich, Taufkirchen
- C3 Transferase, N19RhoA Plasmid, exprimiert in einem pBluescript-Vektor (3,0 kB) (Stratagene, La Jolla) mit einem T3/T7-Promoter: Dr. Alan Hall, University College, London
- RhoA^{Ala-188} Plasmid, exprimiert in einem pSG5-Vektor (4,1 kB) (Stratagene, La Jolla) mit einem SV-40-Promotor: Dr. G. Loirand, Institut des Sciences, Nantes
- Effectene®: Qiagen, Hilden
- ODQ : Callbiochem-Novabiochem, Bad Soden
- Sphingosin-1Phosphat: Biomol GmbH; Hamburg
- Y27632: Welfide Corporation, Osaka
- Trans LT®, Mobicoil Mikrofilter: Mobitec, Göttingen
- Pierce BCA Proteinassay, Peribo Science Deutschland GmbH, Bonn
- Eppendorf Standardreaktionsgefäß 3810, Eppendorf, Wsseling-Berzdorf
- Reagenzröhrchen, Blue Max Jr., 15 ml Conical Tubes Polypropylene: Falcon, Becton Dickinson Labware Europe, Meylan Cedex, Frankreich
- Amersham SE 600 Elektrophoresekammer, Amersham Hybond-ECL Nitrozellulosemembran, Amersham ECL Plus Peroxidasereagenskit: Amersham Bioscience Europe, Freiburg
- Bioassaykammer: Eigenbau der Werkstatt des Instituts für Physiologie der LMU-München
- Borosilikatglaskapillaren, L = 100 mm, D_a = 1.0 mm, D_i = 0.58 mm, d_a = 0.16 mm: Science Products GmbH, Hofheim
- Silikonschläuche, D_i = 1.0 mm, d_a = 1.0 mm: Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- Dreiwegehahn Discofix: B. Braun Melsungen AG, Melsungen
- Beckman Coulter Optima Max-E: Beckman Coulter, Krefeld
- Carl-Zeiss LSM410 Konfokalmikroskop, Carl Zeiss, Göttingen

3. Methoden

In dieser Arbeit wurden folgende Methoden angewandt:

- Simultane Durchmesser- und Calciummessungen an isolierten Widerstandsgefäßen von Hamstern
- Immunfluoreszenzversuche in isolierten Widerstandsgefäßen
- Fraktionierung von Zellhomogenat aus Hamsteraorten und Immunoblotting

Die beiden erstgenannten Methoden basieren auf der Technik der Isolierung von Widerstandsgefäßen aus dem *Musculus gracilis* des Hamsters, die erstmalig von den beiden Arbeitsgruppen um Meininger (Meininger et al. 1991) und Mulvany (Mulvany et al. 1991) beschrieben wurden. In Anlehnung an diese Technik wurden leichte Modifikationen hinsichtlich Versuchstiere und Aufbau durchgeführt, die nachfolgend erläutert werden.

3.1 Präparation der arteriellen Widerstandsgefäße

Die zu untersuchenden Tiere wurden durch intraperitoneale Injektion einer letalen Dosis (50 mg/kg Körpergewicht) des Anästhetikums Pentobarbital-Natrium getötet und anschließend an den Hinterläufen rasiert. Auf einem Präparationstisch wurden die Tiere anschließend auf dem Rücken liegend an den Hinterläufen mit speziellen Klammern fixiert. Nach Durchtrennung der Haut wurde das Präparationsgebiet dargestellt und subkutanes Fettgewebe der Oberschenkelinnenseite unter konstanter Superfusion (12 ml/h) mit vorgekühlter (4°C) Standard-MOPS-Pufferlösung entfernt.

Unter einem Operationsmikroskop wurde mit einer Irisschere und mikrochirurgischen Pinzetten der zuvor freipräparierte *Musculus gracilis* an der Sehne durchtrennt und zur Seite geklappt. Das sich darunter befindende Gefäßnervenbündel wurde sorgfältig dargestellt, von perivaskulärem Fett- und Bindegewebe befreit, und die Begleitvene von der Arterie getrennt. Gefäßabschnitte von Abzweigungen aus der *Arteria femoralis profunda* (erste oder zweite Generation, Außendurchmesser 180 - 240 µm, Länge 1.0 – 2.0 mm) ohne Seitenäste wurden ausgewählt, und möglichst atraumatisch vom Bindegewebe der Gefäßadventitia befreit. Anschließend wurden die Gefäße entnommen und entweder sofort zur Kanülierung in ein Organbad eingebracht, oder bei 4°C bis zu 24 Stunden in Standard-MOPS-Pufferlösung aufbewahrt und dann kanüliert, was weder die Noradrenalin-induzierten Kontraktionen noch die endothelabhängigen Dilatationen nach Gabe von Acetylcholin in diesen Arterien beeinflusste (Bolz et al. 2000).

3.2 Kanülierung der Widerstandsgefäße

Mit Hilfe eines Lasermikropipettenpullers wurden Glaskapillaren aus Boratsilakat fein ausgezogen. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde die Spitzen mit der Schere so gekappt, dass

das Lumen der Pipette einen Durchmesser von ca. 30 μm hatte. Die so hergestellten Mikropipetten dienten zur Kanülierung der zuvor präparierten Mikrogefäße. Die Pipetten wurden an den zwei gegenüberliegenden Auslegern eines von uns entwickelten und in unserer Werkstatt hergestellten Versuchsaufbaus befestigt, die durch Mikromanipulatoren auf der einen Seite in der Höhe und auf der anderen Seite in allen drei Ebenen des Raumes stufenlos verstellbar waren. Die Pipetten wurden so positioniert, dass sie in einem Winkel von ca. 45° in ein aus Edelstahl gefertigtes Organbad ragten, dessen Boden eine 50 μm dicke Quarzglasscheibe bildete. Ein mit einem Dreiwegehahn versehener Silikonschlauch wurde an dem freien, nicht in das Organbad ragende Ende aufgeschoben und durch diesen wurde die Pipetten solange mit Standard-MOPS-Pufferlösung gespült, bis sie vollkommen blasenfrei aufgefüllt war. Um möglichst früh physiologische Druckverhältnisse zu simulieren, wurde an den Dreiwegehahn der Seite, die zuerst kanüliert wurde, eine Heidelberger Verlängerung angeschlossen, die an einem 50 cm hohen Stativ befestigt ebenfalls blasenfrei mit Standard-MOPS-Pufferlösung gefüllt wurde.

Zur Kanülierung wurde das Gefäß unter ständiger visueller Kontrolle durch das Operationsmikroskop (40-fache Vergrößerung) vorsichtig mit zwei Mikropinzetten auf der einen Seite gefasst und auf eine der Pipettenspitzen aufgezogen und mit 11/0 Faden durch einen doppelten Knoten befestigt. Nach erfolgreicher Befestigung wurde der Dreiwegehahn geöffnet, so dass MOPS-Puffer aus der Wassersäule durch das Gefäßlumen fließen konnte. Anschließend wurde der Aufbau gedreht und die zweite Pipette mit Hilfe der Mikromanipulatoren unmittelbar an dem noch nicht kanüliertem Gefäßende positioniert und das Gefäß an dieser Seite analog befestigt. Nach erfolgreicher Kanülierung wurde das Gefäß mit Hilfe der Mikromanipulatoren in der Mitte des Organbades bis auf 1 mm über den Boden abgesenkt, und auf seine *in vivo* Länge gespannt.

Nach erfolgreicher Kanülierung trennten sich die Wege der isolierten Widerstandsgefäße. Die jeweilige Versuchsanordnung bestimmte das weitere Procedere der Arterien. Gefäße, die für Versuche mit pharmakologischer Hemmung einzelner Rezeptoren oder Enzyme bestimmt waren, wurden nach kurzer Pause, um sich von möglichen Traumen der Präparation zu erholen, direkt zur weiteren Untersuchung auf der Aluminiumwärmeplatte des Durchmesser- und Calciummesssystems positioniert und schonend auf 37° C aufgewärmt. Arterien, bei denen wir spezifische Proteine durch Expression genetisch manipulierter Plasmide untersuchen wollten und solche, die für Immunfluoreszenzversuche vorgesehen waren, wurden nach erfolgreicher Kanülierung in Kultur genommen. Vor der Beschreibung des eigentlichen Versuchsablaufes soll diese Methode hier erläutert werden.

3.3 Kultivierung und Transfektion der zu untersuchenden Widerstandsgefäße

Bei den zur Kultivierung vorgesehenen, kanülierten Widerstandsgefäßen wurde die Standard-MOPS-Pufferlösung im Organbad vollständig gegen das Kulturmedium Leibovitz L15 ausgetauscht. Zusätzlich zur Superfusion wurden die Gefäße über die gesamte Kulturdauer unter Verwendung des gleichen Mediums auch perfundiert. Hierfür wurde über einen Dreiwegehahn ein Perfusor an eine der Pipetten als Zufluss angeschlossen. Auf der anderen Seite des Gefäßes wurde als Abfluss eine 61 cm hohe Wassersäule angeschlossen, die in ein Überlaufgefäß mündete. Durch die angebrachte Wassersäule herrschte im Gefäß unter Perfusion ein transmuraler Druck von ca. 45 mmHg. Die Flussrate betrug 1 ml/h, was am Gefäßendothel der untersuchten Widerstandsgefäße eine Wandschubspannung erzeugte, die der physiologisch vorkommenden entsprach.

Bevor mit der eigentlichen Transfektion begonnen wurde, wurde das Kultursystem auf Dichtheit überprüft. Stellte sich heraus, dass Pipetten verstopft waren oder das Gefäß an einer Stelleleckte, wurde der Versuch abgebrochen. Die Transfektionslösung wurde hergestellt, indem 5 µg des gewünschten Plasmids in 150 ml der im Transfektionskit (Effectene®) enthaltenen Pufferlösung gelöst wurden. 40 µl eines Enhancers zur Bildung von Supercoils wurden der Lösung zugesetzt und kurz vermischt. Nach drei min wurden 60 µl Effectene zugegeben und wiederum kurz gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde schließlich 1 ml des Kulturmediums L15 zugegeben und mit Hilfe einer Pipette vermischt. Diese Transfektionslösung wurde dann zusätzlich zum Leibovitzmedium in das Organbad pipettiert und die Widerstandsgefäße wurden bei Raumtemperatur (28°C) 19 – 21 Stunden inkubiert. Ebenso wurde bei der Transfektion der C3-Transferase verfahren. Das Transfektionsmedium war in diesem Fall jedoch TransLT®.

3.4 Mikroskop und Versuchsaufbau

Nach abgeschlossener Kanülierung oder nach abgeschlossener Transfektion wurde der Versuchsaufbau auf ein inverses Mikroskop verlagert, dessen Auflagefläche eine Aluminiumwärmeplatte bildete, die mit Hilfe eines Wasser-Wärmebads beheizt wurde. Dadurch konnte die Organbadtemperatur konstant auf 37°C gehalten werden, was in regelmäßigen Abständen mit einem elektrischen Thermometer kontrolliert wurde.

An beide Pipetten wurde nun über die Dreiwegehähne eine Heidelberger Verlängerung angeschlossen, die an ein mit Standard-MOPS-Pufferlösung gefülltes Reservoir angeschlossen war. Dieses Reservoir war 61 cm über dem Niveau des Organbads positioniert, was einem hydrostatischen Druck von 45 mmHg im Gefäß entsprach

Die zu untersuchenden Widerstandsgefäße wurden mit einer täglich frisch angesetzten Lösung, bestehend aus 5% Rinderserumalbumin (BSA), 2 µmol/l Fura 2-AM und 200 µl Indometacin in 5 ml Standard-MOPS-Puffer gelöst, inkubiert. Dazu wurde das ganze Organbadvolumen gegen die

Inkubationslösung ausgetauscht. Die Beladung der glatten Gefäßmuskulatur erfolgte bei Dunkelheit und 37°C über einen Zeitraum von zwei Stunden. Nach einer Stunde wurde ein Milliliter der Inkubationslösung abpipettiert und durch zwei Milliliter frischer Inkubationslösung ersetzt. Nach einer weiteren Stunde wurde zweimal in Abständen von 10 min mit Standard-MOPS-Puffer ausgewaschen und nach weiteren 10 min mit dem Versuch begonnen.

Bei der von uns verwendeten niedrige Konzentration von Fura 2-AM wurden mögliche calciumpuffernde Effekte des Farbstoffs nicht beobachtet: Die durch Noradrenalin ausgelöste Vasokonstriktion war in beladenen und unbeladenen Gefäßen nicht signifikant verschieden, wie Vorversuche gezeigt hatten (Bolz et al. 2000).

3.5 Fura-2-Methode

Die intrazelluläre Konzentration an freiem Calcium $[Ca^{2+}]_i$ in Endothel- oder Muskelzellen des Gefäßes wurde unter Anwendung der Fura-2-Methode bestimmt (Grynkiewicz et al. 1985).

Die Säure Fura-2 ist ein Farbstoff, dessen Fluoreszenzeigenschaften von der umgebenen Calciumkonzentration abhängig sind. Um die Diffusion des hydrophilen Fura-2-Farbstoffes durch die Plasmamembran zu ermöglichen, liegt dieser zunächst als hydrophober, membrangängiger Fura-2-Acetoxymethylester (Fura-2-AM) vor. Nach Diffusion des Fura-2-AM in die Zellen erfolgt die hydrolytische Spaltung der Esterbindung durch intrazelluläre Esterasen. Fura-2 liegt dann als freie Säure, die die Membran nur in geringem Ausmaß passieren kann, in der Zelle vor.

Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 emittiert nach Anregung Licht der Wellenlänge 510 nm. Unter calciumfreien Bedingungen zeigt er ein Fluoreszenzmaximum bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 380 nm. Mit steigender Calciumbindung nimmt dieses Maximum ab, während es bei Anregung mit 340 nm zunimmt. Es kommt somit zu einer zunehmenden Verschiebung des Fluoreszenzmaximums zur Anregungswellenlänge 340 nm

3.6 Calciummesssystem

Bei dem Messsystem wurde Licht einer 75 Watt Xenonlampe durch eine schnell rotierende, in gleichen Abständen mit spiegelnden und transparenten Segmenten besetzte Scheibe („Chopper-Wheel“) alternierend auf zwei Monochromatoren gelenkt. In den Versuchen wurden aus dem Spektrum der Lichtquelle die Anregungswellenlängen 350 nm und 380 nm ausgewählt. Diese beiden Anregungswellenlängen alternierten während der Messung computergesteuert mit einer Frequenz von 6 Hz. Durch ein Glasfaserkabel gelangte das Licht in den Strahlengang des Mikroskops und durch das Objektiv an das Gefäß. Das aus der Anregung des Fura-2-Farbstoffs resultierende Fluoreszenzlicht gelangte durch das Objektiv zurück auf einen dichroitischen Teilerspiegel und von dort auf einen für Wellenlängen von 510 ± 5 nm durchgängigen Kantenfilter. Die Intensität des gefilterten Lichts der Emissionswellenlänge 510 nm wurde mit

Hilfe eines Photomultipliers gemessen und resultierende analoge Signale nach Digitalisierung mit der PC-Software „Felix“ weiterverarbeitet.

Die intrazelluläre Fura-2-Konzentration der glatten Gefäßmuskelzellen bleibt während einer Versuchsdurchführung nicht stabil. Sie nimmt durch Auswaschen, aktiven Transport in den Extrazellulärraum und photochemischen Zerfall ab. Um dennoch Aussagen über intrazelluläre Calciumveränderungen treffen zu können, wurde bei der Auswertung der Versuche die Ratio R ($F_{350\text{nm}}/F_{380\text{nm}}$) betrachtet, die unabhängig von der Farbstoffkonzentration für eine gegebene Calciumkonzentration konstant bleibt. Bei Kenntnis der Ratio R, ihres Maximal- und Minimalwertes und der Dissoziationskonstanten (K_d) von Calcium lässt sich mit Hilfe der Formel $[Ca^{2+}] = K_d \times ((R - R_{\min})/(R_{\max} - R)) \times (S_{f2} / S_{b2})$ von Gryniewicz *et al.* (Gryniewicz *et al.* 1985) die freie Calciumkonzentration berechnen. In dieser Formel steht K_d für die effektive Dissoziationskonstante von Fura-2 bzgl. Calciumkomplexierung, R für „ratio“- das Verhältnis der gemessenen Intensitäten bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ (Fura-2- Ca^{2+} -Komplex) und $\lambda = 380 \text{ nm}$ (freies Fura-2) nach Abzug der Autofluoreszenz; R_{\min} und R_{\max} sind die jeweiligen Ratiowerte bei Abwesenheit von bzw. voller Sättigung mit Calcium; (S_{f2}/S_{b2}) ist das durch Eichung an Calciumlösungen ermittelte Intensitätsverhältnis von freiem und gebundenen Fura-2 bei $\lambda = 380 \text{ nm}$).

Nach Meininger *et al.* (Meininger *et al.* 1991) ist die Bestimmung der Ca^{2+} -Konzentration in intakten Widerstandsgefäßen mit dieser Methode problematisch und ungenau. Wir haben deshalb auf die Angabe absoluter Konzentrationen verzichtet und stattdessen die Änderungen der Ratio in % angegeben. Diese Angabe der Änderungen in % ist zulässig, da die Kalibrationskurve für unser Calciummeßsystem in dem Ca^{2+} -Konzentrationsbereich, der die physiologisch relevanten Konzentrationen einschließt (42.2 - 1520 nmol), einen linearen Verlauf zeigt. Die Fluoreszenzratio $F_{340\text{nm}}/F_{380\text{nm}}$ wurde nach Abzug der jeweiligen Hintergrundfluoreszenz berechnet. Die Hintergrundfluoreszenz war definiert als die Eigenfluoreszenz des Gewebes und der Aufbaukomponenten im Strahlengang, die nach Neutralisierung der Fura 2-spezifischen Fluoreszenz mit 8 mmol/L $MnCl_2$ noch messbar war.

3.7 Durchmesserregistrierung

Zur Durchmesserregistrierung wurde das Okular des Mikroskops durch eine Restlichtkamera ersetzt und die Gefäßkontur im Durchlichtverfahren erfasst. Als Lichtquelle diente Rotlicht mit einer Wellenlänge von 650 – 700 nm. Dieses Licht hat keinen Einfluss auf die Calciummessung, da es den verwendeten Kantenfilter von 505 – 510 nm nicht passieren kann. Der Außendurchmesser der Gefäße wurde mit einem Messwert pro Sekunde über die gesamte Versuchsdauer kontinuierlich mit Hilfe eines computergesteuerten Messprogramms bestimmt.

3.8 Versuchsprotokoll

Nach Ablauf der zweistündigen Inkubationszeit mit Fura 2-AM bei 37°C wurde das zu untersuchende Gefäß auf seine Funktionalität hin geprüft. Dazu wurde es mit dem Vasokonstriktor Noradrenalin (NA, 0,3 µmol/L) stimuliert, um es auf seine Kontraktionseigenschaften hin zu testen. Anschließend wurde der Vasodilatator Acetylcholin (ACh, 1,0 µmol/L) zugegeben, um die Dilatationsfähigkeit des Gefäßes und die Funktion des Endothels zu überprüfen.

Gefäße, die nach Stimulation mit 0,3 µmol/L NA nicht mindestens eine Konstriktion von 30% des maximalen Außendurchmessers bei 45 mmHg (dia_{max}) zeigten und nach anschließender Gabe von 1 µmol/L Acetylcholin nicht um mindestens 80% der durch NA induzierten Vorkontraktion dilatierten, wurden verworfen (5 von 151 Gefäßen). Im Anschluss an diese Funktionalitätstests wurde das eigentliche Versuchsprotokoll gestartet (siehe Ergebnisteil).

3.9 Immunfluoreszenzaufnahmen

Nach abgeschlossener Transfektion wurden die Arterien mit dem Versuchsaufbau in einen abgedunkelten Versuchsraum gebracht. Das Kulturmedium wurde durch MOPS-Puffer ausgetauscht und die Gefäße entsprechend dem jeweiligen Versuchsprotokoll behandelt (siehe Ergebnisteil). Anschließend wurden die Mikrogefäße für 5 min mit 3,7 % Formaldehydlösung fixiert und danach für 1 min mit 0,3 % Triton X-100 enthaltenden Pufferlösung permeabilisiert. Um unspezifische Protein-Proteinwechselwirkungen zwischen den spezifischen Antikörpern und intrazellulären Proteinen zu unterbinden, wurden die Gefäße mit 1 % BSA-Lösung geblockt. Primärantikörper gegen MYPT1 und RhoA wurden jeweils in einer Verdünnung von 1:200 für 2 h mit den Arterien bei Raumtemperatur inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubation wurden überschüssige Antikörper durch dreimaliges Waschen des Organbades mit MOPS-Lösung entfernt. Anti-MYPT1 und Anti-RhoA-Antikörper wurden durch FITC-markierte Sekundärantikörper dargestellt, deren Epitope die F_c -Segmente der jeweiligen Primärantikörper waren. Diese wurden ebenfalls in einer Verdünnung von 1:200 für 2 h mit den permeabilisierten Gefäßen inkubiert. Anschließend wurden überschüssige Antikörper wieder durch dreimaliges Waschen mit MOPS-Pufferlösung entfernt. Bilder der Arterien wurden mit einem Konfokalmikroskop aufgenommen, das mit einem Kr/Ar Laser ausgestattet war, um die FITC-markierten Antikörper spezifisch bei 488 nm anzuregen.

3.10 Präparation und Kanülierung der thorakalen Aorta

Aufgrund der geringen Menge an Gewebe, die sich aus isolierten Widerstandsgefäßen gewinnen lässt, wurden die Immunoblotting Versuche der MYPT1 an homogenisiertem Gewebe aus isolierten Aorten von Hamstern durchgeführt. Analog zur Präparation isolierter Mikrogefäße wurden die Tiere durch intraperitoneale Injektion einer letalen Dosis Pentobarbital getötet und

nach Rasur der Vorderseite des Thorax auf dem Präparationstisch platziert. Nach Inzision der Haut wurden mit Hilfe einer Präparationsschere die Rippen beider Seiten und die *Claviculae* durchtrennt und somit der Brustkorb eröffnet. Beide Lungenflügel wurden entfernt und der Thorax durch Spülen mit 4° C kalter MOPS-Salzlösung mehrmals gespült. Anschließend wurde für eine kontinuierliche Superfusion (12 ml/h) des Mediastinums mit vorgekühlter MOPS-Pufferlösung gesorgt und unter dem Operationsmikroskop (sechsfache Vergrößerung) die Aorta vom Abgang der linken *A. subclavia* bis zu Durchtritt durch den *Hiatus oesophagus* von perivaskulärem Binde- und Fettgewebe befreit. Nach vollendeter Präparation wurden sämtliche Abgänge der Intercostalarterien durchtrennt und die thorakale Aorta descendens in toto distal der *A. subclavia* entnommen.

Zur Versuchsdurchführung wurde die isolierte Aorta in eine temperierbare, mit Mops-Lösung gefüllte Versuchskammer aus Plexiglas transferiert, in der sich vier Öffnungen, zwei zur Kanülierung und zwei weitere zur Applikation von Lösungen und Pharmaka, befanden. Mit Hilfe eines Laserpipettenpullers wurden die Spitzen von Glaskapillaren aus Boratsilikat fein ausgezogen und diese mit einer Irisschere so gekappt, dass die Öffnung ca. 150 μ m betrug. An den freien Enden der Glaskapillaren wurden dichtende Silikonschläuche angebracht, die mit Dreivegehähnen verbunden waren. Silikonschläuche und Glaskapillaren wurden über die Dreivegehähne sorgfältig mit gekühlter MOPS-Salzlösung gespült und durch die Öffnungen in der Versuchskammer platziert. Unter dem Mikroskop wurde die Aorta auf die Spitze einer Glaskapillare aufgezo-gen und mit Bindfaden befestigt. Glaskapillare und Aorta wurden nochmals mit MOPS-Pufferlösung gespült, um das Lumen des Gefäßes von restlichen Erythrozyten und Blutkoagel zu reinigen. Analog zu dieser Beschreibung wurde das freie Ende der Aorta mit der zweiten Kapillare kanüliert und das Gefäß auf seine in-vivo Länge gespannt. Anschließend wurde die Versuchskammer geschlossen und langsam auf 37° C erwärmt und stand für Versuche zur Verfügung.

3.11 Versuchsprotokoll der Stimulation von Aorten

Nach der Erwärmung und einer kurzen Ruhephase, in der sich die Aorten von eventuell während der Präparation aufgetretenen Traumen erholen konnten, wurde die Versuchskammer kurzfristig geöffnet und die MOPS-Pufferlösung durch eine S1P enthaltende Lösung ersetzt. Die Expositionszeit der Gefäße variierte zwischen 1 min und 20 min. Unmittelbar anschließend wurden die Aorten vorsichtig aus der Versuchskammer genommen und durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff (ca. -80° C) schockgefroren. Die gefrorenen Aorten wurden trocken in einem Eppendorfreaktionsgefäß bei -60° C bis zu weiteren Behandlung gelagert.

3.12 Homogenisierung und Fraktionierung der Aorta

Sämtliche der nachfolgend beschriebenen Schritte wurden auf Eis durchgeführt, um Veränderungen im Verhältnis von cytosolischer zu partikulärer Fraktion nach Versuchsdurchführung zu verhindern. Um ausreichend Material zu erhalten und einmalige Behandlungseffekte auszuschließen, wurden jeweils zwei Aorten gepoolt. Zur Homogenisierung wurden die tiefgefrorenen Aorten in ein mit vorgekühlter MOPS-Lösung gefülltes Organbad gegeben und in kleine Ringe zerschnitten. Diese wurden in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt, in dem sich 50 µl Lysispuffer befanden. Lysispuffer und Aortenringe wurden mit dem gleichen Volumen an Microbeads (ca. 50 µl) überschichtet und das Gemisch durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Durch mehrmaliges Bearbeiten des tiefgefrorenen Lysispuffer-Gewebe Gemisch mit einem passenden Stößel und anschließendes vortexen auf einem Rütteltisch wurden die Aortenringe mechanisch homogenisiert. Nach dem letzten Durchgang wurde das Eppendorfgefäß für eine Minute bei 5000 rpm (entspricht ca. 14000 g) zentrifugiert, das Lysat abpipettiert und in ein spezielles Beckman-Coulter Reaktionsgefäß überführt. Es bestand die Möglichkeit, dass nicht unerhebliche Mengen an Protein des Zellysates an dem Microbeads haften blieben. Um auch diese zu ernten, wurden Gewebereste und Microbeads in ein Mikrofilter mit einer Porengröße von 35 µm transferiert und nochmals mit 50 µl Lysispuffer überschichtet. Nach Zentrifugation für fünf Minuten bei 5000 rpm wurde das gewonnene Lysat abpipettiert und mit dem primär erhaltenen vereinigt. SDS-Gelanalysen zeigten, dass sich durch diesen Recyclingschritt die erhaltene Proteinmenge verdoppeln ließ.

Zur Fraktionierung des Lysates wurde das Beckman-Coulter-Reaktionsgefäß für 45 min bei 4° C und 100000 g (einer Rotationsgeschwindigkeit von 42500 rpm entsprechend) mit Hilfe einer Beckman Coulter Optima ultrazentrifugiert. Der Überstand in dem Reaktionsgefäß wurde abpipettiert und als cytosolische Fraktion weiter analysiert. Das Pellet am Boden wurde in 75 µl Lysispuffer, dem das Detergenz Triton X-100 zugegeben wurde, resuspendiert und als partikuläre Fraktion weiter analysiert. Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration der einzelnen Proben photometrisch mit der BCA Methode bestimmt.

3.13 Immunoblotting

Zur semiquantitativen Analyse der Proteine aus homogenisierten und fraktionierten Aorten wurden diese mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese in einzelne Proteinbanden aufgetrennt und anschließend auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Verwendet wurde dabei ein 7 % Trenngel und ein 4 % Sammelgel. Das Trenngel wurde entsprechend der in dem Materialteil genau erläuterten Rezeptur angefertigt und in eine spezielle Gelkammer von Amersham gegossen. Nach 20 minütiger Aushärtungszeit wurde analog dazu das Sammelgel zubereitet und auf das Trenngel in die Kammer pipettiert. In das Sammelgel wurde in noch flüssigem Zustand

ein Silikonkamm eingebracht, der nach dem Festwerden entfernt wurde und somit Taschen hinterließ, die als Auftragsspuren der einzelnen Proteinproben dienten. Die Gelkammer wurde in einem Tank befestigt, der mit TRIS-Puffer (*running buffer*) gefüllt war und mit selbigem Puffer überschüttet. 5 µl eines Proteinstandards, der Markerproteine einer Größe von 18 bis 200 kDa durch unterschiedliche Farben kodiert, und 10 µg der aufgetrennten Aortenhomogenate wurden in die Taschen des Sammelgels pipetiert und bei einer Spannung von konstant 100 V über ca. 75 min aufgetrennt. Nach erfolgter Trennung der einzelnen Proteinbanden wurde die Gelkammer aus dem Tank entfernt, aufgeschraubt und das Sammel- von dem Trenngel entfernt. Um die Banden aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran zu transferieren, wurde das Trenngel und die Membran zwischen zwei, mit gekühlten (4° C) Transferpuffer getränkten Filterblättern platziert und zwischen zwei Graphitelektroden eingespannt. Ein konstanter Stromfluss von 50 mA über 1 h sorgte dann für einen sicheren Transfer der Proteinbanden und des Proteinstandards. Proteingrößen des Proteinstandards wurden entsprechend den einzelnen Farbbanden auf der Membran markiert.

Um unspezifische Wechselwirkungen zwischen der Membran und den spezifischen Antikörpern zu unterbinden, wurde die beladene Membran für 10 min mit 0,3 % fettfreier Trockenmilch geblockt, die in 50 ml Tris-Puffer gelöst war. Zur Identifizierung des MYPT1 wurde die Membran mit einem polyklonalen Anti-MYPT1-Antikörper aus Kaninchen in einer Verdünnung von 1:500 über Nacht bei 4 ° C inkubiert. Durch dreimaliges Waschen wurde die Membran von überschüssigen, nicht-gebundenen Antikörper befreit und anschließend mit einem monoklonalen, mit Merretich-Peroxidase markiertem Sekundäntikörper inkubiert, dessen Epitop der Fc-Teil von Kaninchenantikörpern ist. Visualisiert wurden die MYPT1-Bande mittels Chemolumineszenz mit einem kommerziellen ECLplus Kit und speziellen Röntgenfilmen von Amersham. Die Belichtungszeit betrug 5 min.

3.14 Versuchsauswertung und statistische Analyse

Alle Werte sind als Mittelwerte \pm mittlerer Fehler des Mittelwertes (SEM = „standard error of the mean“) angegeben.

Der maximale Gefäßdurchmesser wurde am Ende eines jeden Experimentes nach Applikation von 1 µmol/L Acetylcholin in Ca²⁺-freier Organbadlösung bei einem transmuralen Druck von 45mmHg bestimmt.

Die Dilatationen der jeweiligen Gefäße wurde nach der folgenden Formel (1) berechnet :

$$\text{Prozent des maximalen Gefäßdurchmessers} = [(dia_{VD} - dia_{NA}) / (dia_{max} - dia_{NA})] \times 100 \quad (1)$$

Konstriktionen von Gefäßen wurden nach der folgenden Formel (2) berechnet:

$$\text{Prozent des maximalen Durchmessers} = [(dia_{\max} - dia_{VC}) / dia_{\max}] * 100 \quad (2)$$

(dia_{\max} = max. Durchmesser bei 45 mmHg, 0 mmol/L Ca^{2+} nach Stimulation mit 1 $\mu\text{mol/L}$ ACh, dia_{VD} = steady-state Durchmesser des Gefäßes 2 min nach Administration eines Vasodilatators, dia_{VC} = steady-state Durchmesser des Gefäßes 2 min nach Administration eines Vasokonstriktors, dia_{NA} = steady-state Durchmesser des Gefäßes 2 min nach Stimulation mit 0,3 $\mu\text{mol/L}$ Noradrenalin)

Steady state–Werte aus Dosiswirkungskurven (die Zeitpunkte, zu denen der steady state in den unterschiedlichen Versuchsreihen bestimmt wurde, ist im Ergebnisteil jeweils angegeben) wurden nach Testung auf Normalverteilung mit dem ungepaarten Student's *t*-Test und folgender Korrektur nach Bonferroni verglichen. Es wurden dabei jeweils sämtliche Einzelpunkte einer Dosiswirkungskurve einer Versuchsreihe zu den entsprechenden Konzentrationen miteinander verglichen. Steady state-Werte verschiedener Gruppen wurden mit ANOVA und folgender post hoc Analyse (Tukey) der Mittelwerte verglichen. Unterschiede wurden als signifikant angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5% war ($p < 0.05$).

Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm „Stata™“, College Station, Texas durchgeführt.

Um Änderungen der glättmuskulären Ca^{2+} -Konzentration und/oder des Gefäßdurchmessers über die Zeit zu vergleichen, wurde zusätzlich ein Verfahren benutzt, welches auf einer nicht-linearen Regressionsanalyse basiert. Dabei wurde die Güte der Übereinstimmung der errechneten Regressionskurve mit einer Gompertzfunktion für zunächst jede einzelne Kurvenschar, entsprechend einer Versuchsgruppe, und dann für die Gesamtheit aller Einzelkurven aller Versuchsgruppen berechnet. Mittelwertkurven der einzelnen Kurvenscharen wurden als signifikant unterschiedlich angesehen, wenn der F-Test eine signifikant kleinere Quadratsumme der Abweichungen für die Fits der jeweiligen Einzelkurven gegenüber dem Fit für die Gesamtheit aller Einzelkurven ergab (Motulsky & Ransnas 1987).

4. Ergebnisse

Die Versuche dieser Studie wurden in dem Zeitraum von 1999 bis 2002 durchgeführt. Wie im Methodenteil bereits skizziert, basiert diese Arbeit auf drei unterschiedlichen experimentellen Methoden: der funktionellen, simultanen Messung von Durchmesser- und Calciumkonzentrationsveränderungen, Immunfluoreszenzaufnahmen von Widerstandsgefäßen und Immunoblotting von Hamsteraorten.

In den Versuchsreihen mit funktionellen Messungen wurden insgesamt 71 Gefäße aus 40 Tieren ausgewertet. Insgesamt wurden 84 Gefäße präpariert, kanüliert und teilweise in Kultur genommen. Aus folgenden Gründen sind jedoch 13 Gefäße nicht berücksichtigt worden:

- Mangelnde Stimulierbarkeit durch 1 $\mu\text{mol/L}$ des Vasokonstriktor Noradrenalin
- Dilatation von $< 70\%$ des Ausgangsdurchmessers vorkonstringierter Arterien nach Zugabe von 1 $\mu\text{mol/L}$ Acetylcholin
- Technische Probleme im Rahmen der Gefäßkultur, wie z. B. Bruch der Glaspipetten oder Flüssigkeitsverlust aus dem Organbad

Der Ablauf der Transfektion von Widerstandsgefäßen mit DNA Plasmiden wurde bereits im Methodenteil beschrieben. In Vorversuchen konnte dabei ausgeschlossen werden, dass es hierbei zu unspezifischen Effekten auf die glatte Gefäßmuskulatur kam. Um dies zu erreichen, wurden Gefäße, die mit *green fluorescent protein* (GFP) transfiziert wurden, mit nichttransfizierten Arterien verglichen. GFP ist ein Protein, das physiologischerweise von glatten Muskelzellen nicht exprimiert wird, da es im Genom von Säugetieren nicht vorkommt. Die Proteinbiosynthese wird durch GFP bei gleichen Promotoren im sehr wahrscheinlich selben Maße beansprucht, wie durch Proteine, bei denen eine Interaktion mit dem kontraktilen Apparat bekannt ist. In vorrangig bereits publizierten Studien zeigte sich dabei, dass transfizierte Arterien einen Ruhetonus ($9 \pm 2\%$) entwickelten, Vasokonstriktion nach Stimulation mit 0,3 $\mu\text{mol/L}$ Noradrenalin ($48 \pm 4\%$), myogene Antworten ($60 \pm 12\%$) und Dilatationen nach Gabe von 1 $\mu\text{mol/L}$ Acetylcholin ($84 \pm 7\%$) zeigten, die sich nicht signifikant von den entsprechenden der frisch isolierten (Bolz et al. 1999) oder kultivierten, untransfizierten (Bolz et al. 2000) Gefäße unterschieden. Es konnte somit davon ausgegangen werden, dass es in unserem experimentellen System zu keiner relevanten Interaktion von GFP mit dem kontraktilen Apparat kam.

4.1 Einfluss von NO auf die Calciumsensitivität glatter Muskelzellen

Um den Einfluss von NO auf die Calciumsensitivität glatter Muskelzellen zu untersuchen, wurden Kontrollgefäße mit solchen verglichen, die mit 10 $\mu\text{mol/L}$ des NO-Donors Natriumnitroprussid (SNP) vorbehandelt waren. Dabei wurden die Widerstandsgefäße mit

120mmol/L K^+ depolarisiert, um L-Typ Calciumkanäle zu öffnen und somit die Möglichkeit zu haben, die intrazelluläre Konzentration von Ca^{2+} durch Zugabe extrazellulärer Calciumlösungen definiert zu verändern. Schrittweise Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration von 0,0 bis zu 3,0 mmol/L führen dabei zu zunehmender Konstriktion der Arterien. Diese Konstriktionen waren in Gegenwart von 10 μ mol/L SNP ($P < 0,05$; $n = 7$) deutlich abgeschwächt. Dabei unterschieden sich die gemessenen Konzentrationen von freiem Ca^{2+} bei korrespondierenden Calciumkonzentrationen nicht signifikant von denen in Kontrollgefäßen. *ODQ*, ein Inhibitor der löslichen Guanylatcyclase, war in der Lage diesen desensitivierenden Effekt des SNP komplett zu antagonisieren. Gefäße, die sowohl mit 10 μ mol/L SNP als auch mit 1 μ mol/L ODQ behandelt wurden ($P < 0,05$; $n = 7$), zeigten die gleichen Konstriktionskurven, wie Kontrollarterien (Abb. 3). Auch in dieser Versuchsreihe waren die gemessenen $[Ca^{2+}]_i$ nicht signifikant unterschiedlich von denen der Kontrollgefäße oder denen der mit SNP behandelten Gefäße.

Abb. 3:

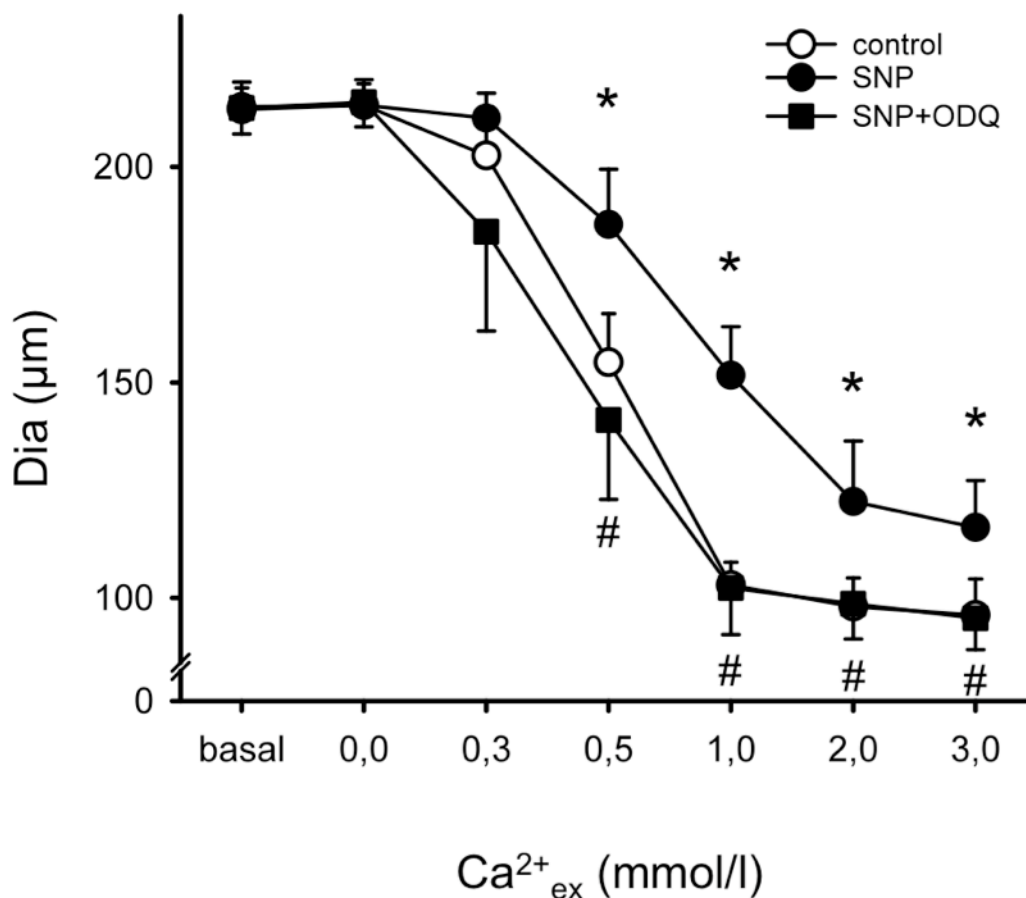


Abb. 3: Graphische Darstellung der Konstriktionen depolarisierter Widerstandsgefäße auf ansteigende extrazelluläre Calciumkonzentrationen $[Ca^{2+}]_{ex}$. In Anwesenheit von 10 $\mu\text{mol/L}$ SNP waren diese signifikant abgeschwächt (* $P < 0,05$ SNP vs. Control; $n=7$). Zugabe von 1 $\mu\text{mol/L}$ ODQ hob diesen Effekt komplett auf (# $P < 0,05$ ODQ vs. SNP; $n=7$).

4.2 Beteiligung der MLCP an der Calciumsensitivität

In dieser Versuchsreihe sollte eine mögliche Beteiligung der MLCP an der durch den Agonisten NO ausgelösten Calciumdesensitivierung untersucht werden. Um dies zu überprüfen, wurden isolierte Widerstandsarterien mit 120 nmol/L Calyculin A vorbehandelt. In dieser Konzentration gilt Calyculin A als spezifischer Inhibitor der MLCP (Ishihara et al. 1989). Mit 120 nmol/L Calyculin A vorbehandelte Gefäße ($P < 0,05$; $n=7$) entwickelten keinen signifikant höheren basalen Ruhetonus als Kontrollgefäße, und auch nach Depolarisation mit 120 mmol/L K^+ und anschließender schrittweiser Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration kam es zu keiner signifikanten Zunahme der Konstriktion. Vergleicht man allerdings die Durchmesseränderung von Arterien unter Erhöhung der extrazellulären Konzentration von Ca^{2+} in Anwesenheit von 10 $\mu\text{mol/L}$ SNP ($n=7$) mit solchen, die sowohl mit 10 $\mu\text{mol/L}$ SNP, als auch mit 120 nmol/L Calyculin A behandelt wurden ($P < 0,05$; $n=7$), so zeigte sich, dass die NO-vermittelte Desensitivierung fast vollständig von Calyculin A aufgehoben werden konnte. Wieder zeigten die Messungen des freien intrazellulären Ca^{2+} in den glatten Muskelzellen der einzelnen Behandlungsgruppen keine nennenswerten Unterschiede (Abb. 4).

Abb. 4:

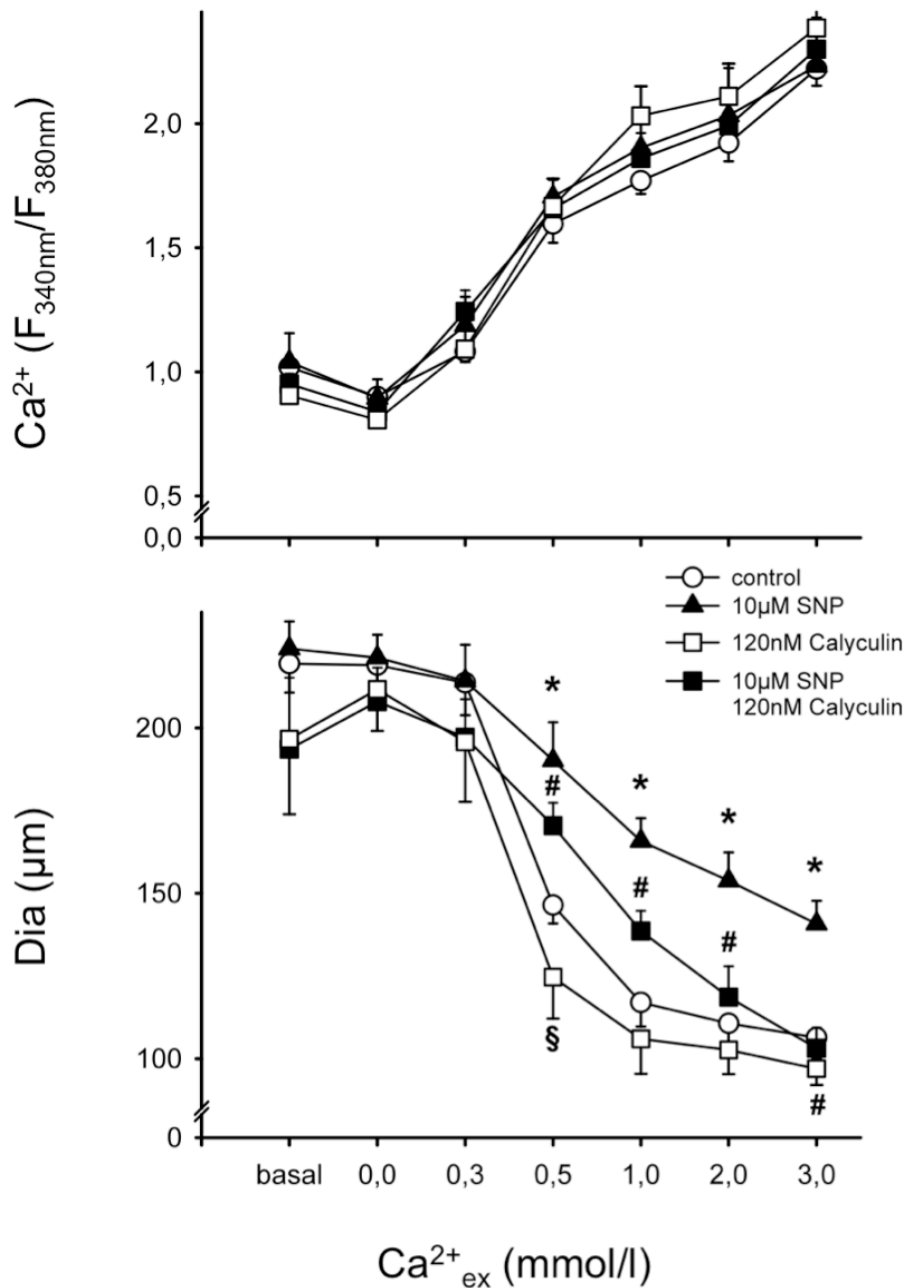


Abb. 4: Graphische Darstellung der SNP-induzierten Kontraktilitätsabschwächung depolarisierter Widerstandsgefäße (* $P < 0,05$ SNP vs. Control; $n=7$). Dieser Effekt wurde durch Inhibition der MLCP durch Calyculin A (120 nmol/L) weitgehend aufgehoben (# $P < 0,05$ Calyculin A + SNP vs. Control; $n=7$). Calyculin alleine verstärkte die Kontraktion nach Calcium-Erhöhung teilweise signifikant (§ $P < 0,05$ Calyculin vs. Control; $n=7$).

4.3 Antagonisierbarkeit des NO-vermittelten Einflusses auf die Calciumsensitivität glatter Muskelzellen

Aus Untersuchungen an Zellkulturen ist bekannt, dass der Sphingolipidmetabolit S1P die RhoA/Rhokinase-Signaltransduktionskaskade aktivieren kann. MacDonald und Mitarbeiter identifizierten in glatten Muskelzellen von Hühnermägen eine Proteinkinase, die selbst von der Rhokinase aktiviert wird, und in der Lage ist, die MLCP zu inaktivieren (MacDonald et al. 2001). Deshalb sollte in einer Versuchsreihe untersucht werden, ob S1P in der Lage ist, die Desensitivierung zu antagonisieren, und ob dies abhängig von RhoA und der Rhokinase geschieht. Tabelle 1 fasst diese Ergebnisse zusammen.

Tabelle 1:

S1P, µmol/L	Kontrolle (n=7), Konstriktion (% von Dia _{max})	Y27632 (n=7), Konstriktion (% von Dia _{max})	C3 Transferase (n=7), Konstriktion (% von Dia _{max})
0,001	0,2 ± 0,4	- 0,1 ± 0,4*	- 0,7 ± 0,3*
0,01	7,7 ± 2,4	0,4 ± 0,2*	-0,5 ± 0,6*
0,1	27,0 ± 3,4	3,4 ± 1,8*	2,8 ± 0,7*
1	45,0 ± 2,0	20,0 ± 7,2*	18,1 ± 2,9*

* = Signifikantes Ergebnis (P < 0,05 Kontrolle vs. Y27632, bzw. Kontrolle vs. C3 Transferase)

Eine Konstriktion durch S1P war dosisabhängig und konnte ab einer Konzentration von 10 nmol/L beobachtet werden. In Gefäßen, die mit dem RhoA-Inhibitor *C3-Transferase* transfiziert wurden, waren diese Konstriktionen deutlich abgeschwächt (P<0,05; n=7). Auch nach Inhibition der nachgeschalteten Rhokinase durch 1 µmol/L der Substanz *Y27632* konnte dieses Phänomen beobachtet werden (P<0,05; n=7).

4.4 Einfluss von S1P auf die Aktivität der MLCP

Um zu überprüfen, ob es sich dabei möglicherweise um einen Mechanismus handelt, der die NO-vermittelte Calciumdesensitivierung antagonisiert, wurde der Effekt von S1P auf die MLCP untersucht. Dazu wurde immunhistologisch die Lokalisation von MYPT1 in den glatten Muskelzellen analysiert, da Shin et al. die Translokation von MYPT1 an die Zellmembran als Inaktivierungsmechanismus der MLCP beschrieben (Shin et al. 2002).

Abbildung 5a zeigt das Verteilungsmuster von MYPT1 in den glatten Muskelzellen einer unbehandelten Kontrollarterie. Es zeigte sich dabei, dass der überwiegende Teil der regulatorischen Untereinheit cytosolisch lokalisiert war. Stimulierte man nun intakte

Widerstandsarterien 2 min mit 100 nmol/L S1P, so zeigte sich ein grundlegend verändertes Verteilungsmuster. In Abbildung 5b sieht man, dass MYPT1 nun fast ausschließlich membrangebunden war.

Abb. 5:

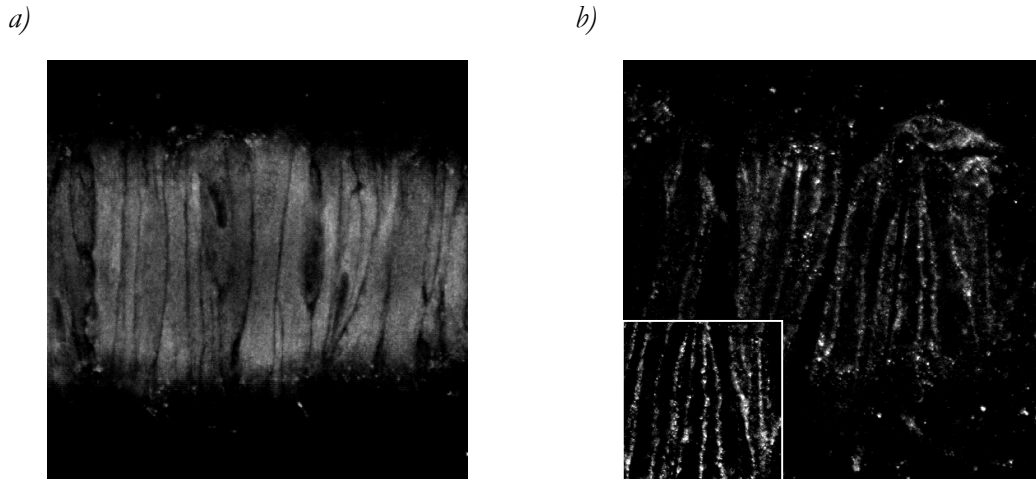


Abb. 5: Die immunhistochemische Färbung der MYPT1 einer Widerstandsarterie unter Ruhebedingungen zeigt ein homogenes zytosolisches Verteilungsmuster (Abb. 5 a; die Darstellung ist repräsentativ für 3 Versuche). Stimulierung eines intakten Widerstands-gefäßes mit S1P (100 nm/L) für 2 Minuten führt zu einer Translokation der MYPT1 an die Zellmembran (Abb. 5 b; die Darstellung ist repräsentativ für 5 Versuche).

Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch Immunoblotting der MYPT1. Wie im Methodenteil bereits beschrieben, wurden Hamsteraorten wieder 2 min mit 100 nmol/L S1P stimuliert, anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und nach Homogenisierung durch Ultrazentrifugation in cytosolisches und partikuläres Kompartiment getrennt. Abbildung 6 c zeigt die Ergebnisse dieser Versuchsreihe. In unbehandelten Kontrollarterien liegt der überwiegende Teil der regulatorischen Untereinheit cytosolisch gelöst vor. S1P bewirkt dagegen eine Translokation an die Zellmembran.

In einem ähnlichen Ansatz sollte bestätigt werden, dass die S1P-vermittelte Inaktivierung der MLCP durch RhoA und die Rhokinase moduliert wird. Zu diesem Zweck wurden isolierte Widerstandsgefäße kultiviert und mit einer dominant-inaktiven Mutante des RhoA (N19RhoA) transfiziert. Die Beteiligung der Rhokinase wurde durch Vorbehandlung mit 1 μ mol/L Y27632 untersucht. So behandelte Arterien wurden wieder mit 100 nmol/L S1P stimuliert, fixiert und anschließend immunhistochemisch mittels konfokaler Mikroskopie das Verteilungsmuster der MYPT1 ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 a und b dargestellt.

Abb. 6:

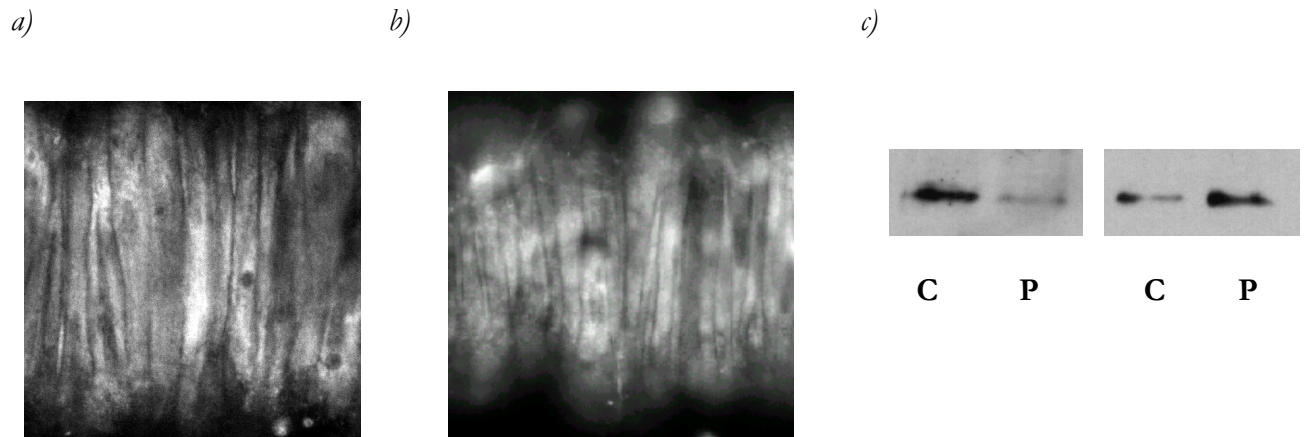


Abb. 6: Immunohistochemische Darstellung der Verteilung von MYPT1 nach Stimulation mit 100 nmol/l S1P in Widerstandsgefäßen, die mit der dominant-inaktiven Mutante N19RhoA transfiziert wurden (a; die Darstellung ist repräsentativ für 4 Experimente) oder mit 1 µmol/L Y27632(b; die Darstellung ist repräsentativ für 4 Experimente) vorbehandelt waren. Detailaufnahme des Verteilungsmusters von MYPT1 im Westernblot aus isolierten Aorten des Hamsters. Links ist das Homogenat von 4 Kontrollaorten dargestellt, rechts von 4 Aorten, die 2 min mit 100 nmol/l SNP vorbehandelt wurden (c; c = cytosolisch, p = partikulär; die Darstellung ist repräsentativ für 4 unabhängige Experimente).

Sowohl eine Überexpression der dominant-inaktiven Variante N19RhoA, als auch die Vorbehandlung mit dem Rhokinase-Inhibitor Y27632 unterbanden also die von S1P ausgelöste Translokation an die Zellmembran glatter Muskelzellen.

4.5 Funktionelle Messung des Einflusses von S1P auf die NO-vermittelte Calciumdesensitivierung

In den oben beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Lipidmediator S1P in der Lage war Kontraktionen auszulösen und die zelluläre Lokalisation der MLCP zu beeinflussen. Diese Effekte von S1P wurden durch Hemmung des RhoA/Rhokinaseweg abgeschwächt. Es sollte nun auch funktionell geklärt werden, ob S1P in der Lage ist, die NO-vermittelte Calciumdesensitivierung zu antagonisieren. Isolierte und kultivierte Widerstandsgefäße wurden mit 120 mmol/L K^+ depolarisiert und die Durchmesseränderungen nach schrittweiser Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration von 0 auf 3 mmol/L registriert. Der Sphingolipidmediator steigerte im mittleren Bereich der extrazellulären Calciumkonzentration

(0,25 bis 0,75 mmol/L) die Calciumsensitivität im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgefäßen signifikant (# $P < 0,05$; $n=11$). Die Vorbehandlung (10 min) mit S1P (10 nmol/L; $n=7$) hob die normalerweise von SNP ausgelöste Calciumdesensitivierung über den gesamten Bereich der extrazellulären Calciumkonzentration weitgehend auf (* $P < 0,05$; $n=6$). Die gemessenen $[Ca^{2+}]_i$ unterschieden sich in allen 4 verglichenen Gruppen nicht signifikant ($P > 0,05$, nicht gezeigt). Abbildung 7 stellt die Diameterkurven dieser Versuche dar.

Abb. 7:

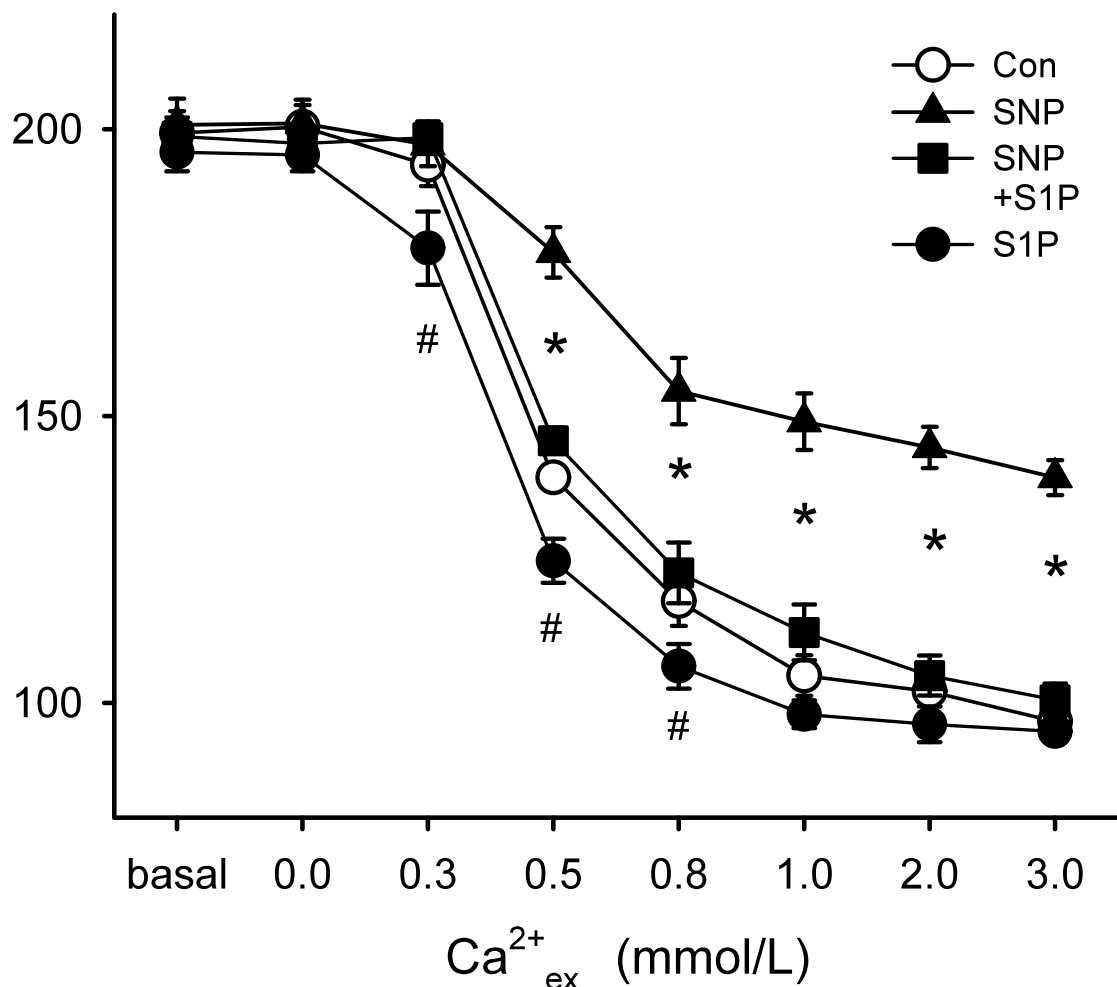


Abb. 7: Graphische Darstellung der Calcium-Durchmesser-Beziehung isolierter Widerstandsgefäße. Die durch NO (SNP) -induzierte Ca^{2+} -Desensitivierung in depolarisierten Kontrollgefäßen (con) (* $P < 0,05$, Control vs. SNP; $n=7$) wird durch Vorbehandlung mit S1P abgeschwächt. Stimulation der RhoA/ Rhokinase Signalkaskade durch 10 nmol/l S1P führte zu einer signifikanten Abschwächung des SNP Effektes (Control vs. SNP + S1P; $n=6$). S1P alleine führte im mittleren Bereich der $[Ca^{2+}]_{ex}$ zu einer signifikanten Verstärkung der Calcium-induzierten Kontraktion (# $P < 0,05$, Control vs. S1P; $n=11$).

4.6 Einfluss von S1P und SNP auf die subzelluläre Verteilung von RhoA

Um seine Funktion innerhalb der Signalkaskade auszuüben und mit der Rhokinase zu interagieren, muss RhoA an der Membran gebunden sein. Der Quotient aus membrangebundenem und cytosolischem RhoA kann also als Aktivitätsparameter angesehen werden. Die Verteilung von RhoA unter Ruhebedingungen, nach Stimulation mit 100 nmol/L S1P und nach Vorbehandlung mit 100 nmol/L S1P und anschließender Gabe SNP (10 μ mol/L; 3 min) wurde in isolierten und kanülierten Widerstandsgefäßen mittels Immunfluoreszenz untersucht. In Abbildung 8 werden die dabei erhobenen Befunde einander gegenübergestellt. Unter Ruhebedingungen zeigt sich überwiegend ein cytosolisches Verteilungsmuster, in dem RhoA inaktiv als RhoA-GDP-GDI-Komplex vorliegt (Abb. 8 a). Werden Arterien mit S1P stimuliert beobachtet man eine Änderung der Lokalisierung an der Zellmembran glatter Muskelzellen (Abb. 8 b). Wie aus Abbildung 8 c ersichtlich, wird diese Lokalisationsänderung auch durch vorherige Behandlung mit 10 μ mol/L SNP nicht sichtbar beeinflusst. Das Verteilungsmuster gleicht dem der mit S1P stimulierten.

Abb. 8:

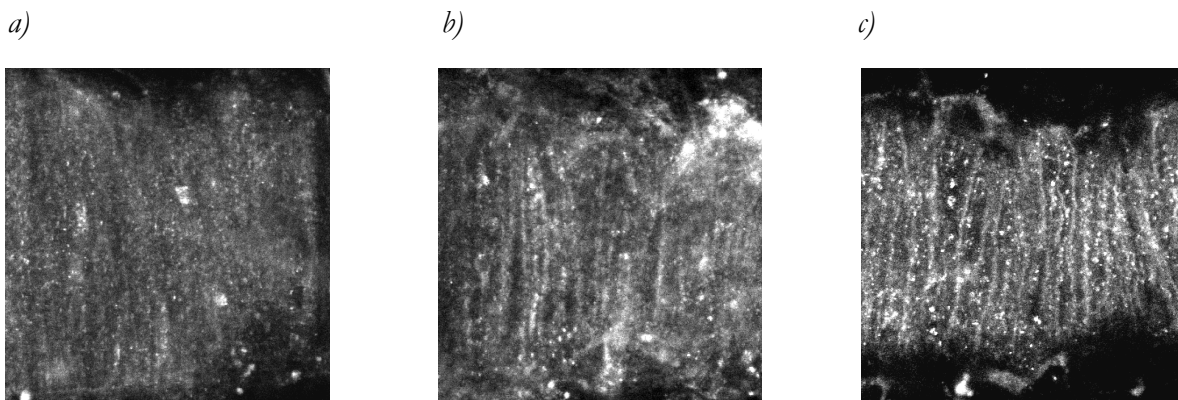


Abb. 8: Die immunhistochemische Darstellung des Verteilungsmusters von RhoA in unbehandelten Kontrollgefäßen zeigte eine homogen zytosolische Verteilung (a; die Darstellung ist repräsentativ für 4 Experimente). Stimulierung mit S1P (10 nmol/L, 2 min) führte zu einer Translokation von RhoA an die Zellmembran glatter Muskelzellen (b; die Abbildung ist repräsentativ für 4 Versuche), auch bei vorheriger Behandlung mit 10 μ mol/L SNP (c; Abbildung ist repräsentativ für 4 Versuche).

Um zu untersuchen, ob NO auch funktionell nicht in der Lage ist, durch S1P hervorgerufene Konstriktionen zu unterbinden, wurden Arterien entweder mit Noradrenalin oder mit S1P gleich stark vorkontrahiert ($130 \pm 10 \mu\text{m}$ in der S1P-Gruppe gegenüber $128 \pm 2 \mu\text{m}$ bei mit NA konstringierten RA), um danach mit 1 μ mol/l SNP dilatiert zu werden. Dabei waren die durch

SNP hervorgerufenen Dilatationen in Arterien, die durch S1P vorkonstringiert wurden, signifikant kleiner, als Dilatationen in mit Noradrenalin vorbehandelten Arterien. 1 $\mu\text{mol/L}$ SNP dilatierte Gefäße aus der S1P-Gruppe (1 $\mu\text{mol/L}$; n=4) um $64 \pm 8\%$ ($P < 0,05$; S1P vs. NA) weniger, als solche aus der NA-Gruppe (0,3 $\mu\text{mol/L}$; n=4).

4.7 Möglichkeit der Modulation von RhoA durch NO über die cGK

Die Arbeitsgruppe um Sauzeau konnte an permeabilisierten Aortenringen eine direkte Inaktivierung von RhoA durch SNP zeigen (Sauzeau et al. 2000). Dies wird in diesem Abschnitt der Strombahn durch die cGK mediiert, die die Translokation von aktiviertem, membranständigem RhoA ins Cytosol der Zelle bewirkt. In einer gesonderten Serie von Experimenten sollte getestet werden, ob diese cGK-vermittelte Translokation als möglicher Mechanismus der durch NO ausgelösten Calciumdesensitivierung in Widerstandsgefäßen in Frage kommt. Um dies zu testen, wurden isolierte Mikrogefäße mit einer Mutante des RhoA transfiziert, welche eine Punktmutation in Position 188 trägt. Der Austausch eines Serin durch Alanin in dieser Position verhindert, dass diese Mutante durch die cGK phosphoryliert werden kann (Sauzeau et al. 2000). Abbildung 9 stellt die erhobenen Daten dieser Untersuchungen dar. Mit RhoA^{Ala188} transfizierte Arterien wurden mit 120 mmol/L K^+ depolarisiert und die extrazelluläre Calciumkonzentration im Organbad schrittweise von 0,0 bis 3,0 mmol/L erhöht (n=6). Die dabei gemessenen Außendurchmesser wurden mit denen von Gefäßen verglichen, die in Gegenwart von SNP erhoben wurden (10 $\mu\text{mol/L}$; n=6). Die Durchmesser der Gruppe, die mit SNP stimuliert wurden, waren signifikant größer, als die in Abwesenheit dieser Substanz erhobenen ($P < 0,05$). Nicht mit abgebildet sind die gemessenen $[\text{Ca}^{2+}]_i$, die dabei jeweils identisch waren. Die calciumdesensitivierenden Eigenschaften des NO blieben also auch nach Transfektion der Mutante erhalten.

Abb. 9:

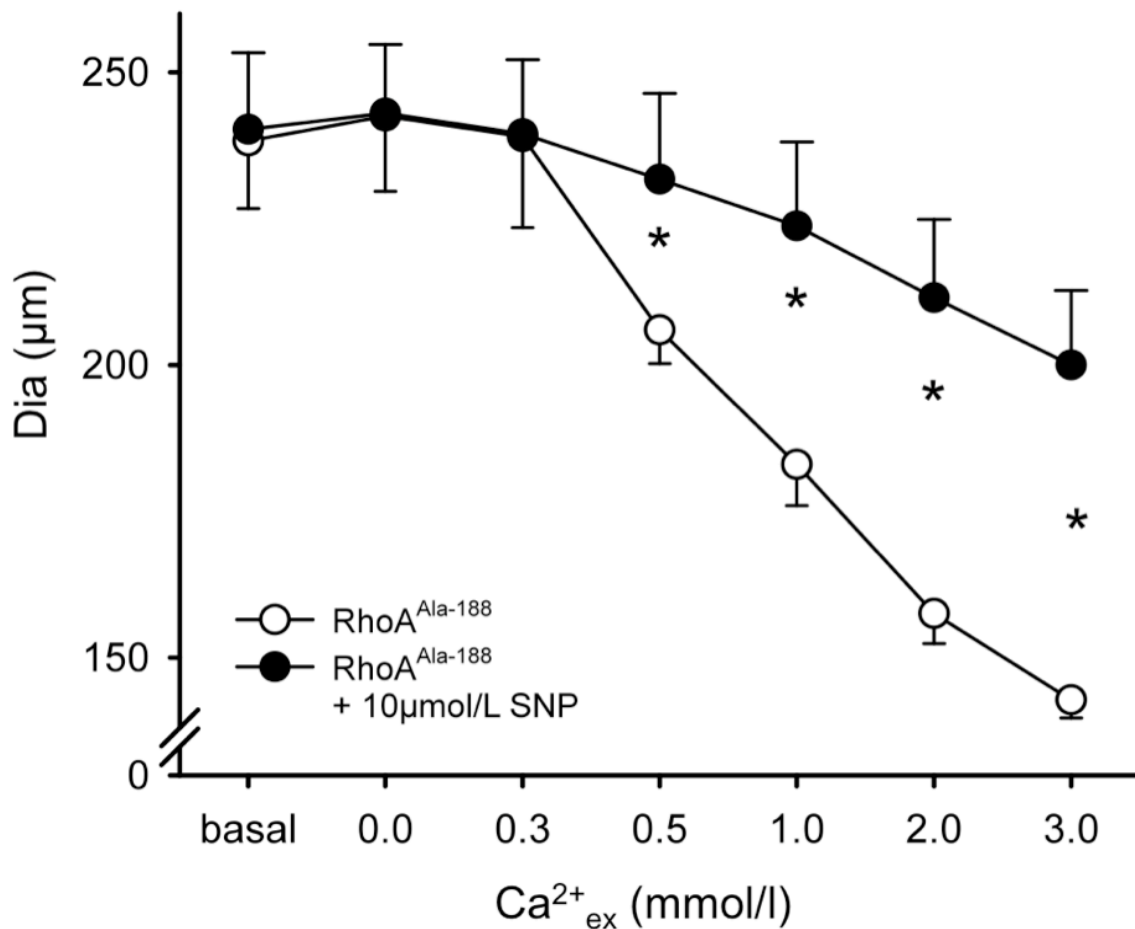


Abb. 9: Graphische Darstellung der SNP-induzierte Ca²⁺-Desensitivierung in Widerstandsgefäßen, die mit RhoA^{Ala-188} transfiziert wurden. Die desensitivierenden Effekte von S1P wurden durch die Expression dieser Mutante nicht unterbunden (* P < 0,05 RhoA^{Ala-188} vs. RhoA^{Ala-188} + SNP; n=6).

4.8 Effekte einer Inhibierung von RhoA/Rhokinase auf NO-vermittelte Dilatationen

Funktionelle Calcium- und Durchmessermessungen an Widerstandsgefäßen, die mit C3-Transferase Plasmiden transfiziert wurden, zeigten eine deutliche Rechtsverschiebung der Ca²⁺/Durchmesser-Kurven. Dies spricht für eine hohe intrinsische Aktivität von RhoA und der Rhokinase in isolierten Arterien. Diese Beobachtung stimmt mit anderen Arbeiten überein (z. B.: (Gong et al. 1997)). Eine weitere Serie von Experimenten sollte deshalb die Frage klären, ob in Widerstandsgefäßen unter Ruhebedingungen die Ca²⁺-desensitivierenden bzw. dilatatorischen Effekte von NO durch diesen Einfluss antagonisiert werden können.

Um dies zu überprüfen, wurden die von NO hervorgerufenen Dilatationen in Gefäßen gemessen, in denen die inaktive Mutante N19RhoA exprimiert, beziehungsweise der Kinaseinhibitor Y27632 appliziert wurde. Kontroll- (n=8), N19RhoA exprimierende (n=6) und mit Y27632 vorbehandelte Gefäße wurden nach Vorkonstriktion mit 0,3 µmol/L Noradrenalin durch aufsteigende Konzentrationen (von 10 nmol/L bis 10 µmol/L) SNP. In Abbildung 10 sind die Dilatationen als Prozent der maximalen dilatatorischen Kapazität angegeben. Die Resultate dieser Versuche zeigen eine signifikante Verstärkung der Gefäßdilatationen in der N19RhoA- und der Y27632-Gruppe über das gesamte Spektrum der untersuchten SNP-Konzentrationen (P<0,05).

Abb. 10:

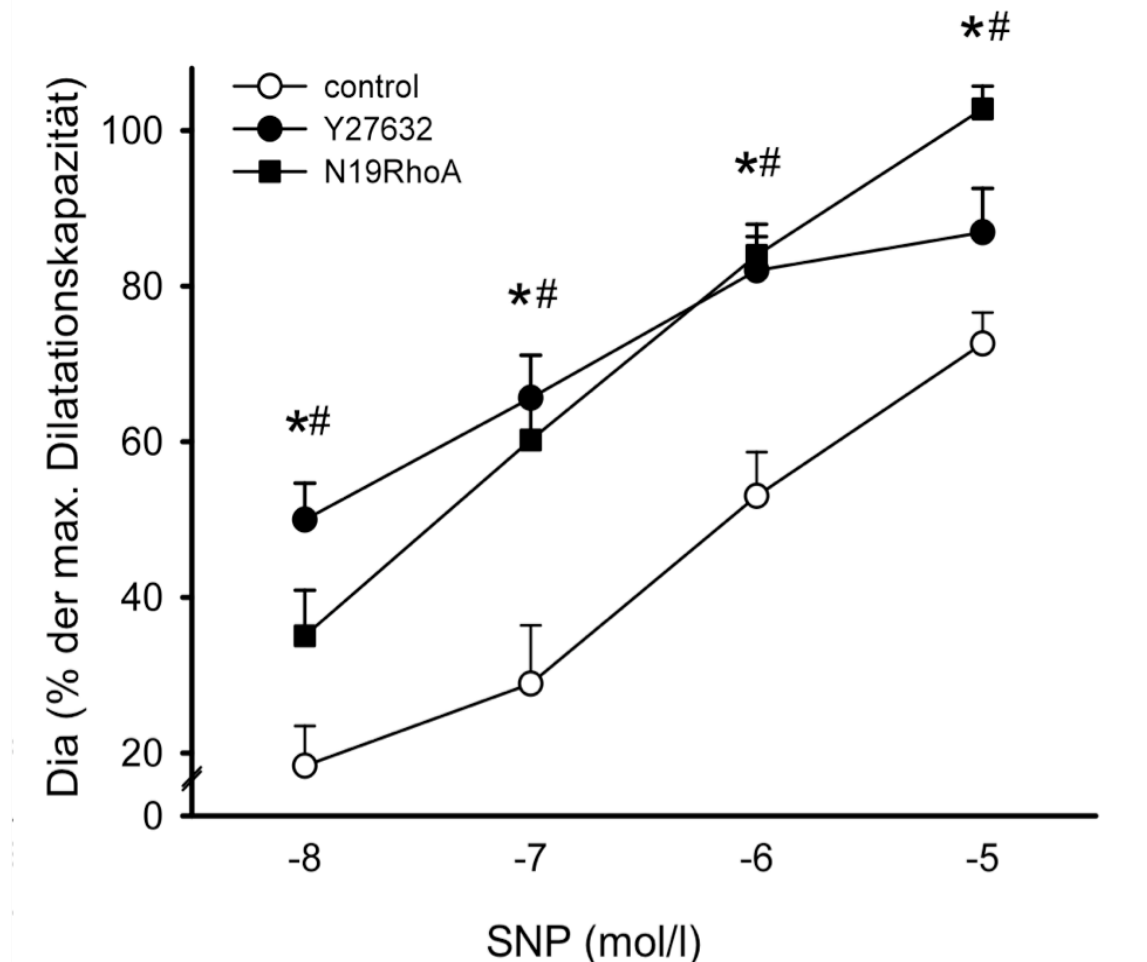


Abb. 10: SNP-induzierte Dilatationen in mit 0,3 µmol/L NA vorkonstringierten Gefäßen waren signifikant verstärkt in solchen, die mit der dominant-inaktiven Mutante N19RhoA transfiziert (P < 0,05; Control vs. N19RhoA; n=6) oder mit 1 µmol/L Y27632 vorbehandelt waren (P < 0,05; Control vs. Y27632; n=5).

Es wurde noch untersucht, ob RhoA und die nachgeschaltete Rhokinase auch die Effektivität anderer Vasodilatoren beeinflussten. Zu diesem Zwecke wurden Gefäße mit Plasmiden, die die Mutante N19RhoA kodieren, transfiziert und die dilatatorische Potenz von *Acetylcholin* (ACh) und *NS1619* gemessen. In der Mikrozirkulation entfaltet ACh seine Effekt auf endothelialer Ebene über den EDHF, der eine Hyperpolarisation vaskulärer glatter Muskelzellen und konsekutiv eine Dilatation bewirkt. Ähnliches gilt für die Substanz NS1619. Bei ihr handelt es sich um einen K_{Ca} -Kanalöffner, der die selbe physiologische Antwort hervorruft. Beide Agonisten entfalten ihre Wirkung unabhängig von NO. Analog zu den Dosis-Wirkungsversuchen mit SNP wurden verschiedene Konzentrationen von ACh (10 nmol/L bis 1 μ mol/L; n=4) und NS1619 (1 bis 100 μ mol/L; n=4) an präkonstringierten Arterien (NA 0,3 μ mol/L) untersucht. Um mögliche Effekte von NO oder Prostacyclin in dieser Versuchsanordnung auszuschließen, fanden diese in Anwesenheit von L-Nitroarginin (30 μ mol/L) und Indometazin (30 μ mol/L) statt. Sowohl für ACh als auch für NS1619 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den transfizierten Gefäßen festgestellt werden ($P < 0,05$). Wie aus Abbildung 11 ersichtlich wird, verlaufen die Dosis-Wirkungskurven nahezu identisch. Ein Einfluss der Transfektion mit N19RhoA auf die Wirkung beider Substanzen konnte somit in diesem System nicht beobachtet werden.

Abb. 11:

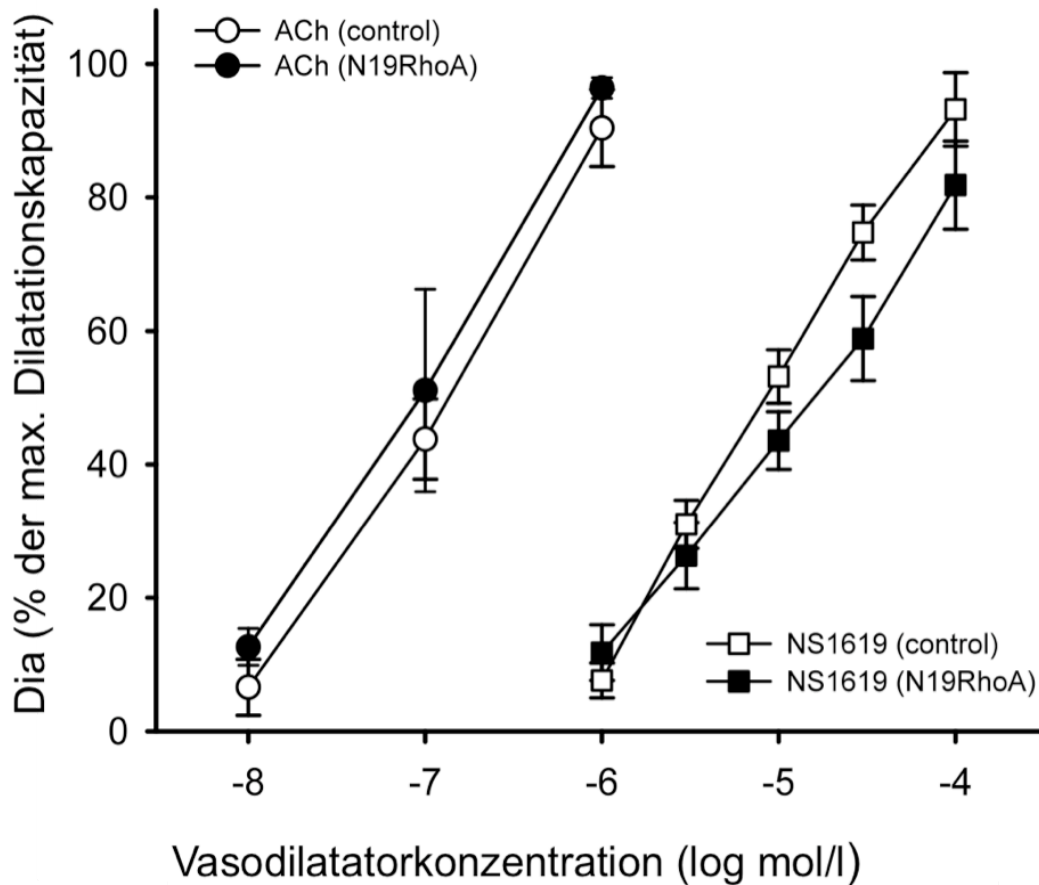


Abb. 11: Die Transfektion von Widerstandsgefäßen mit der dominant-inaktiven Mutante N19RhoA hatte keinen Einfluss auf die (EDHF-induzierte) Dilatation durch ACh (in Gegenwart von je 30 µmol/L L-Nitroarginin und Indometacin, n=4) oder durch den KCa Agonisten NS1619 (n=4).

5. Diskussion

5.1 Diskussion der erhobenen Befunde

Ausgangspunkt unserer Überlegungen waren die Ergebnisse einer von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchung, die sich mit den Mechanismen der durch Acetylcholin (ACh) ausgelösten Dilatation in Widerstandsgefäßen beschäftigte. In dieser zeigte sich, dass NO weitgehend ohne Beeinflussung des Calcium Spiegels eine Dilatation auslöst während, EDHF diese über einen Abfall der intrazellulären Calciumkonzentration bewirkt (Bolz et al. 1999). Obwohl es verschiedene Publikationen gibt, die zeigen, dass auch NO in glatten Gefäßmuskelzellen die intrazelluläre Calciumkonzentration senken kann, steht diese Beobachtung im Einklang mit neueren Beobachtungen, die dem NO einen calcium-unabhängigen Effekt auf den Gefäßtonus zuschreiben (Nishimura & van Breemen 1989).

Die Relaxation von glatten Muskelzellen kann auf der einen Seite das Resultat einer Reduktion der $[Ca^{2+}]_i$ sein, auf der anderen Seite aber auch durch eine Verminderung der Empfindlichkeit des kontraktile Apparates für Ca^{2+} ausgelöst werden. Somit könnte NO seine Ca^{2+} -unabhängigen dilatatorischen Eigenschaften auch über eine Modulation der Ca^{2+} -Sensitivität bewirken. Es wurde daher überprüft, ob Stickstoffmonoxid in Widerstandsgefäßen zu einer Calciumdesensitivierung glatter Muskelzellen führen kann. In einer ersten Versuchsreihe konnten wir zeigen, dass durch pharmakologische Stimulierung mit Natriumnitroprussid, welches NO und O_2^- freisetzt (Misra 1984), die Empfindlichkeit des kontraktile Apparates für Ca^{2+} in der Tat abnimmt. Depolarisation von glatten Muskelzellen durch eine Lösung mit hoher K^+ -Konzentration führt zu einer potentialabhängigen dauerhaften Öffnung von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen und bietet somit die Möglichkeit, die Konzentration des intrazellulären Ca^{2+} durch Änderung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration $[Ca^{2+}]_{ex}$ zu beeinflussen. Die beobachtete Abschwächung der Konstriktion bei identischer schrittweiser Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{ex}$ in Gegenwart von SNP ist demnach am ehesten auf eine Desensibilisierung des kontraktile Apparats zurückzuführen.

Diese Calciumdesensitivierung ist durch die sGC vermittelt, da eine Inhibierung dieses Enzyms durch ODQ (Garthwaite et al. 1995) diesen Effekt aufhob und ist damit sehr wahrscheinlich cGMP-abhängig. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Befunden an glatten Muskelzellen aus dem Ileum von Kaninchen in denen 8-Br-cGMP über eine Aktivitätszunahme der MLCP zu einer Calciumdesensitivierung führte (Wu et al. 1996). Durch Gabe von Calyculin A, das die MLCP antagonisiert, wurde die NO-induzierte Abnahme der Ca^{2+} -Empfindlichkeit des kontraktile Apparates aufgehoben, was dafür spricht, dass NO/cGMP über eine Aktivierung dieses Enzyms wirkt. Die strukturelle und funktionelle Intaktheit dieses Enzyms scheint dabei

von essentieller Bedeutung zu sein, da die Inhibierung der MLCP zu einem totalen Verlust des desensitivierenden Effektes von NO führt. Der Rechtsverschiebung der Calcium-Durchmesserkurve nach NO-Applikation scheint eine Aktivitätssteigerung der MLCP zu Grunde zu liegen, die zu einer Abnahme der MLC_{20} -Phosphorylierung führt. Interessanterweise lässt sich dieser Mechanismus nur in Gegenwart von SNP beobachten. Die alleinige Gabe von Calyculin A in einer Konzentration von 120 nmol/L führte dabei nicht zu einer Linksverschiebung der Calcium-Durchmesserkurve. Diese Dosierung wurde gewählt, um eine unspezifische Inhibierung anderer Phosphatasen möglichst zu vermeiden. Die Tatsache, dass Calyculin A nicht zu vermehrter Konstriktion führte obwohl die Effekte von SNP antagonisiert wurden, spricht somit entweder für eine geringe Ruheaktivität der MLCP, oder für eine hohe basale RhoA/ROK-Aktivität, die unter Ruhebedingungen die MLCP-Wirkung antagonisiert.

RhoA und Rhokinase beeinflussen ebenfalls die Calciumsensitivität glatter Muskelzellen, indem sie die Aktivität der MLCP modulieren (Kimura et al. 1996). Im Kaninchenileum konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine Präexposition für NO in der Lage ist, Kontraktionen, die durch den RhoA-Agonisten GTP- γ S ausgelöst wurden, zumindest partiell abzuschwächen. In Anbetracht der möglichen Bedeutung von RhoA und der Rhokinase im Rahmen der Arteriosklerose und der Hypertonie interessierte uns der umgekehrte Weg, da unter pathophysiologischen Bedingungen die Aktivität dieser Signaltransduktionskaskade stark erhöht ist. Uns erschien deshalb die Möglichkeit plausibler, dass unter diesen Bedingungen RhoA und die Rhokinase in der Lage sind, die dilatatorischen und calciumdesensitivierenden Eigenschaften von NO aufzuheben. Da es sich bei unserem Versuchsmodell um intakte, isolierte Widerstandsgefäße handelt, in dem die glatten Gefäßmuskelzellen nicht ohne Weiteres mit Hilfe von α -Toxin oder β -Escin gleichmässig und damit zuverlässig permeabilisiert werden können, konnten wir diese Kaskade nicht, wie in Muskelzellkulturen beschrieben, mit GTP- γ S aktivieren. Wir stimulierten daher die Widerstandsgefäße mittels des Lipidmediators Sphingosin-1-Phosphat, da von diesem endogenen Signalmetaboliten bekannt ist, dass er die mitogenen Effekte des atherogenen oxLDL vermittelt (Auge et al. 1999) und zytoskelettale Veränderungen beeinflusst, die durch die Aktivierung der Rho-Familie reguliert werden (Kimura et al. 2003) (Spiegel & Milstien 2002). In der Tat zeigten mit S1P stimulierte Widerstandsarterien dosisabhängige Konstriktionen, die durch Blockade von RhoA oder der Rhokinase unterbunden wurden. S1P, das Produkt der membranständigen *Sphingosinkinase*, wird von glatten Muskelzellen gebildet, wirkt auf autokrinen und parakrinen Weg und entfaltet seine Wirkung über eine Gruppe von spezifischen Rezeptoren, den $S1PR_1 - S1PR_5$ (Pyne & Pyne 2000) (Pyne & Pyne 2000). Von diesen Rezeptoren ist bekannt, dass die Rezeptoren $S1PR_2$ und $S1PR_3$ sich intrazellulär der Rhokaskade bedienen, um ihre Wirkung zu vermitteln (Pyne & Pyne 2002) (Takuwa et al. 2001).

In einer weiteren Untersuchung konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass Widerstandsgefäße des Hamsters S1PR₂ exprimieren und dass S1P in diesen Arterien zu einer Erhöhung des Basaltonus und der myogenen Antwort führen (Vogel et al., 2004).

Bereits in geringen Konzentrationen ist S1P in der Lage, die calciumdesensitivierende Wirkung von NO komplett aufzuheben. Diese komplette Antagonisierung ist überraschend, da man bei einer pharmakologischen Inhibierung einen Dosis-abhängigen Effekt mit inkompletter Antagonisierung erwarten würde. Für diese Beobachtung kommen zwei Erklärungsmöglichkeiten in Frage: 1) Bei der Konzentration von 10 nmol/l S1P handelt es sich bereits um eine maximale Dosis. Gegen diese Überlegung spricht zum einen, dass diese Konzentration in Widerstandsgefäßen nur zu einer Konstriktion von 8 %, ausgehend vom maximalen Durchmesser, führt. Durch schrittweise Erhöhung der S1P-Konzentration auf 100 nmol/l und 1 µmol/l ist diese Konstriktion auf 27 respektive auf 45 % steigerbar (vgl. Tabelle 2). Dies spricht gegen die Erklärung, dass eine Konzentration von 10 nmol/l bereits im Sättigungsbereich einer sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurve liegt. 2) Shin et al. konnten zeigen, dass die Translokation der regulatorischen Untereinheit mit einer Inaktivierung der MLCP assoziiert ist (Shin et al. 2002). In dieser Untersuchung wurde die Lokalisation des Holoenzym nach Stimulierung mit der calciumsensitivierenden Substanz Prostaglandin F_{2α} (P_g F_{2α}) konfokalmikroskopisch untersucht. P_g F_{2α} führt zunächst zu einer Translokation des kompletten Holoenzym an die Zellmembran. In der Tat konnte in unserer Arbeit ebenfalls gezeigt werden, dass S1P zu einer Translokation der regulatorischen Untereinheit MYPT1 an die Zellmembran führt. Unserem Wissen nach ist dies die erste Arbeit, die dieses Phänomen in Gefäßen der Mikrozirkulation untersucht und nachgewiesen hat. Innerhalb von kurzer Zeit dissoziiert die MLCP jedoch. Die katalytische Untereinheit PP1Cδ diffundiert zurück ins Zytosol, während die MYPT1 an der Zellmembran gebunden bleibt. Da die MYPT1 für die direkte Interaktion von PP1Cδ mit der MLC₂₀ verantwortlich ist, kommt es durch diesen Prozess zu einer Inhibierung des Targeting-Mechanismus der MLCP. Es handelt sich also nicht um eine pharmakologische Hemmung, bei der zwei Substanzen um eine Bindungsstelle konkurrieren, sondern um eine räumliche Trennung der MLCP von ihrem natürlichen Substrat was die vollständige Hemmwirkung erklären kann. Zusammengefasst lassen diese Untersuchungen den Schluss zu, dass S1P die Kontraktilität und die Calciumsensitivität in glatten Gefäßmuskelzellen des Hamsters erhöht und dass dieser Mechanismus von RhoA und den nachgeschalteten Proteinen vermittelt wird.

In Einklang mit diesem Mechanismus der Inhibierung wurde auch ein unterschiedliches Antwortverhalten auf SNP in Abhängigkeit von der Vorbehandlung der Widerstandsgefäße beobachtet. So fanden wir bei mit S1P vorkonstringierten Arterien im Vergleich zu Gefäßen, die mit NA vorkonstringiert waren, eine deutlich verminderte Amplitude der NO-vermittelten

Dilatation. Die von ACh ausgelöste Vasorelaxation, die in der Gegenwart von Indometazin und L-NA rein EDHF- und damit Ca^{2+} -abhängig ist, war in mit S1P vorbehandelten Gefäßen dagegen unbeeinträchtigt. Da in dieser Versuchsanordnung keine Vergleichsmöglichkeit mit einem unstimulierten Kontrollgefäß bestand, lässt sich nicht untersuchen, ob eine Stimulation von Widerstandsgefäßen mit NA ebenfalls zu einer Hemmung der Aktivität der MLCP führt. Da sich jedoch die NO-vermittelte Relaxation in der S1P vorbehandelten Gruppe signifikant von der NA-Gruppe unterschied, ist anzunehmen, dass in isolierten Widerstandsgefäßen des Hamsters lediglich S1P zu einer nennenswerten, physiologisch relevanten Inhibierung der Phosphataseaktivität der MLCP führt.

Die gegensätzlichen Effekte von NO und RhoA auf die Aktivität von MLCP und MLCK, und damit auf den Quotienten von $MLC_{20}\text{-P}/MLC_{20}$, sind die entscheidenden Akteure der Calciumsensitivierung. Das komplexe Zusammenspiel dieser beiden Signalwege determiniert, ob Widerstandsgefäße dilatieren oder konstringieren.

Es ist bekannt, dass SNP in der Lage ist, über eine $cGKI\alpha$ -abhängige Phosphorylierung eine Translokation des RhoA an die Zellmembran und damit eine Inaktivierung zu bewirken (Sauzeau et al. 2000). In glatten Muskelzellen der von uns untersuchten Widerstandsgefäßen scheint dieser Mechanismus jedoch nur eine untergeordnete Bedeutung zu haben. Dafür sprechen die Befunde, die an Arterien mit der Mutante $RhoA^{Ala-188}$ erhoben wurden. Eine Punktmutation an dieser Position verhindert die Phosphorylierung des RhoA durch die $cGKI\alpha$ (Sauzeau et al. 2000). Allerdings können wir nicht ausschließen, dass endogenes Wildtyp RhoA weiterhin zur Verfügung stand und für den Effekt von cGMP mitverantwortlich war obwohl beschrieben ist, dass die Transfektion von mutierten Proteinen durch Plasmide dazu führen kann, dass das plasmidcodierte Protein die Expression des nativen Proteins komplett hemmt. Einmal gebundenes oder transloziertes RhoA kann durch NO offensichtlich nicht wieder ins Zytosol reloziert werden: Wir konnten mittels Immunfluoreszenz zeigen, dass SNP, die S1P-induzierte Translokation von RhoA an die Zellmembran nicht verhinderte bzw. aufhob. Es muss erwähnt werden, dass sich die Calcium-Durchmesser-Kurven von unbehandelten Kontrollgefäßen und solchen, welche die $RhoA^{Ala-188}$ -Mutante exprimierten, deutlich voneinander unterschieden. Ein unspezifischer Effekt der Transfektionsmethode scheint dabei nicht die Ursache der Verschiebung des Anstieges der Kurve zu sein, da sich GFP-transfizierte Arterien nicht von untransfizierten Arterien unterschieden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Punktmutation zu einer Änderung der Quartärstruktur und damit zu einer Abnahme der intrinsischen Aktivität des RhoA führte. Eine direkte Interaktion von NO mit RhoA/Rhokinase scheint aber in der Mikrozirkulation für die Calciumdesensitivierung nicht notwendig zu sein.

Bisher sind acht verschiedene Positionen in der Aminosäuresequenz der MYPT1 identifiziert worden, die durch Kinasen phosphoryliert werden können. Von diesen konnte jedoch nur für drei Stellen eine biologische Funktion gesichert werden. Als inhibitorisch wirksame Phosphorylierungsstellen sind dabei Threonin 696, welches die Aktivität der Phosphatase drosselt, Threonin 854, welches die Bindung von Myosin erschwert und als aktivierend Threonin 435, welches die Affinität zu Myosin steigert, beschrieben. Tabelle 2 fasst dies zusammen.

Tabelle 2:

<u>MYPT1</u>	<u>Verantwortl. Kinase(n)</u>	<u>Effekt</u>
T696	ROK, MRCK, PAK, DMPK, ILK, MYPT1-kinase	Inhibierung der PP1C δ
T854	ROK, MYPT1-kinase	Verminderte Myosinbindung
T34	PKC	Unbekannt
T435	Mitosis-activated kinase	Verbesserte Myosinbindung
S695	PKA	Unbekannt
T710	ILK	Unbekannt
T717	MYPT1-kinase	Unbekannt
S852	PKA	Unbekannt

Anmerkung zu Tabelle 2: Die Phosphorylierungsstellen mit bekannter inhibitorischer und aktivierender Funktion beziehen sich die MYPT1-Sequenz von Säugetieren, obwohl sie zum Teil im avinen System ermittelt wurden. Diese unterscheidet sich geringfügig von den MYPT-Sequenzen in Säugetieren.

Die Rhokinase ist in-vitro in der Lage, die regulatorische Untereinheit MYPT1 der MLCP an Position Thr 854 und – allerdings in geringerem Ausmaß - Thr 696 zu phosphorylieren (Hartshorne et al. 1998). Dieser Mechanismus scheint in-vivo jedoch nur von untergeordneter Bedeutung zu sein. Vielmehr konnten MacDonald *et al.* eine bisher unbekannte Kinase identifizieren, die mit hoher Affinität MYPT1 an Position (Thr 696) phosphoryliert (MacDonald et al. 2001). Die Regulation dieser *MYPT1-kinase* (ehemals *zip-like kinase*) ist bisher nicht aufgeklärt worden. Bekannt ist lediglich, dass die Rhokinase nicht selbst in der Lage ist, die MYPT1-Kinase zu phosphorylieren. Die Existenz dieser Kinase könnte eine Erklärungsmöglichkeit für die Diskrepanz unserer Ergebnisse mit der RhoA^{Ala-188}-Mutante und den von Sauzeau präsentierten Daten sein. Im Gegensatz zur Aorta scheint in glatten Muskelzellen der Mikrozirkulation nicht die Aktivität von RhoA durch NO moduliert zu werden, sondern die MLCP selbst oder ein Protein, das zwischen der Rhokinase und der MLCP vermittelt. Die MYPT1-kinase wäre ein solches Protein, dessen Regulation in zukünftigen Untersuchungen ein interessantes Ziel für den Mechanismus der NO-vermittelten Calciumdesensitivierung darstellt. Darüber hinaus gilt es zu untersuchen, an welcher der Phosphorylierungsstellen eine solche Interaktion stattfindet.

Ein Ergebnis, das vor allem für zukünftige klinische Anwendungen bedeutsam sein könnte, ist die Antagonisierbarkeit der S1P- vermittelten Calciumsensitivierung. Aktivierung des RhoA/ROK-Signalweges führt zur Calciumsensitivierung. Dieser Prozess lässt sich jedoch auch umkehren. Inhibierung dieser Signaltransduktionskaskade durch Transfektion einer dominant-inaktiven RhoA-Mutante oder durch pharmakologische Blockade der Rhokinase steigerten das Ausmaß der von NO hervorgerufenen Dilatationen. Die Beobachtung, dass im atheromatös veränderten Gefäßbett Dilatationen auf NO gestört ist lange bekannt und wird in der Literatur als endotheliale Dysfunktion bezeichnet (Harrison 1997). Interessanterweise liegt dieser Beeinträchtigung der Dilatationsfähigkeit nicht notwendigerweise eine quantitative Verminderung produzierten NOs zugrunde. Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass die Synthese von NO in hypercholesterinämischen Kaninchen um das Dreifache gesteigert war, obwohl diese Tiere eine deutlich eingeschränkte endothelabhängige Gefäßdilatation haben (Minor et al. 1990) (Mügge et al. 1991). In der Literatur wird diese Beobachtung im allgemeinen durch eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO erklärt und unter dem Begriff endotheliale Dysfunktion subsumiert. Abbildung 12 und Legende fassen dieses Konzept zusammen.

Abb. 12:

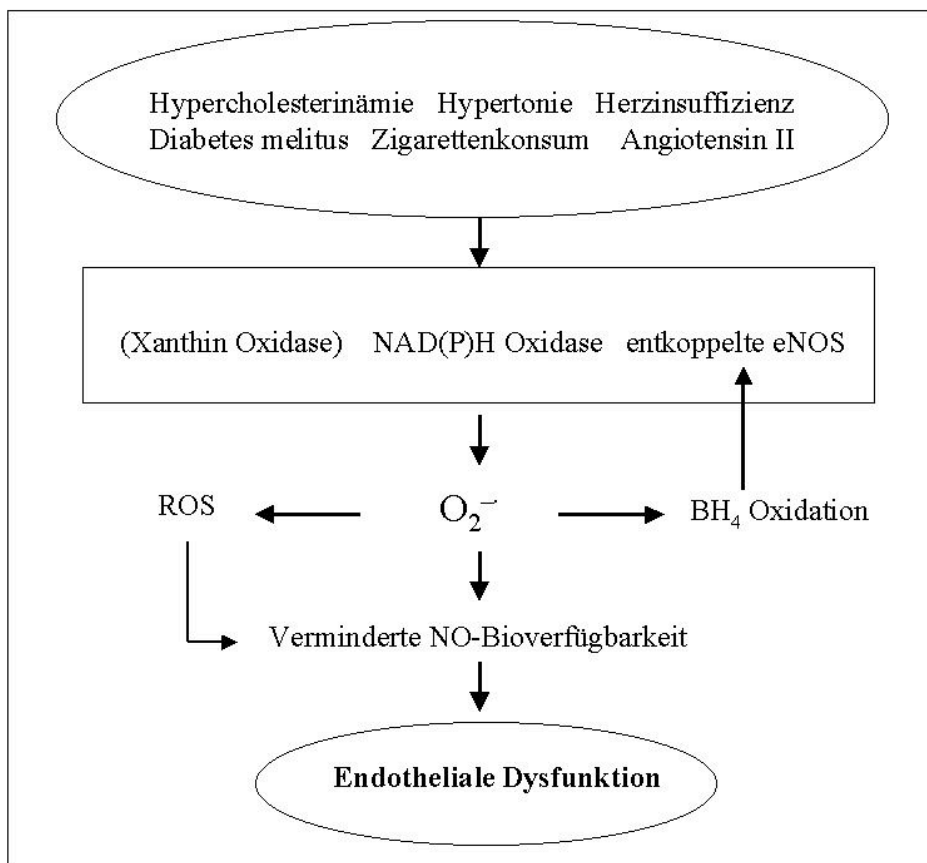


Abb. 12: Der *endothelialen Dysfunktion* liegt eine verminderte Bioverfügbarkeit aufgrund eines gesteigerten Abbaus des verfügbaren NO zugrunde (Harrison 1997). Verantwortlich für diese Degradierung ist die Reaktion von NO mit O_2^- und anderen Molekülen aus der Familie der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu dem biologisch inaktivem Peroxynitrit (Thomson et al. 1995). Risikofaktoren, wie z. B. Hypercholesterinämie, Zigarettenkonsum oder erhöhte Spiegel an Angiotensin II, führen zu einer Zunahme der Produktion von Substanzen aus der Gruppe der reaktiven Sauerstoffspezies, ein Zustand, den man oxidativen Stress nennt (Cai & Harrison 2000). Verantwortlich für die Produktion von ROS sind folgende Enzyme: die *Xanthin Oxidase* (Nakazono et al. 1991; Suzuki et al. 1995), die *NAD(P)H Oxidase* (De Keulenaer et al. 1998; Griendling et al. 1994) und die *endotheliale NO-Synthase* (eNOS). Dieses Enzym braucht für die NO-Synthese L-Arginin und *Tetrahydrobiopterin* (BH_4) als Cofaktoren. Unter pathologischen Bedingungen sind beide nicht in ausreichendem Maße vorhanden und es kommt zu einer Entkopplung der eNOS und anstatt NO werden ROS produziert. Das Endprodukt der Reaktion von NO mit O_2^- , das Peroxynitrit, ist darüber hinaus in der Lage, BH_4 zu oxidieren, und somit den einmal gestarteten pathologischen Vorgang der eNOS-Entkoppelung im Sinne eines *circulus vitiosus* zu unterhalten (Laursen et al. 2001).

Aus den oben zitierten Arbeiten könnte der Schluss gezogen werden, dass es sich bei dem Konzept der endothelialen Dysfunktion um einen Prozess handelt, in dem ausschließlich die Funktionstüchtigkeit der Endothelzellen für die Fähigkeit eines Gefäßes, auf eine Stimulus mit einer ausreichenden Dilatation zu antworten, verantwortlich ist. Die Befunde von Mügge et al. an hypercholesterolemischen Kaninchen lassen sich jedoch auch so interpretieren, dass die eingeschränkte endothelabhängige Relaxation das Resultat einer Abnahme der NO-Wirkung ist, obwohl diese Substanz in ausreichender Menge produziert wird. In unserer Arbeit konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen der Calciumsensitivierung zu einer Abnahme der Empfindlichkeit von glatten Muskelzellen gegenüber NO kommt. Substanzen, die zu einer Steigerung der Aktivität von RhoA und/oder der Rhokinase führen, antagonisieren die dilatatorische Wirkung des NO, in dem sie das von ihm angesteuerte Zielenzym, die MLCP, inaktivieren. Der molekulare Hintergrund dieser Inaktivierung scheint dabei eine Translokation der regulatorischen Untereinheit MYPT1 und damit eine funktionelle Desintegration des Enzyms zu sein. Ob es sich dabei um einen kurzfristigen Effekt oder um eine langanhaltende oder sogar irreversible Hemmung der MLCP aufgrund der Dissoziation des Holoenzymes handelt, ist noch unklar und muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Interessanterweise führen die meisten kardiovaskulären Risikofaktoren, die mit der endothelialen Dysfunktion assoziiert sind, auch zu einer Zunahme der RhoA-Aktivität. Darüber hinaus haben ROS auch einen direkten Effekt auf endothel-denudierte Gefäße. So konnte eine jüngst publizierte Arbeit zeigen, dass ROS in Aorten von Ratten die RhoA/ROK-Signaltransduktionskaskade aktivieren können (Jin et al. 2004).

Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse auf eine enge Verbindung endothelabhängigen Gefäßdilatation und der Calciumsensitivität glatter Muskelzellen hin. Eine zukünftige therapeutische Konsequenz dieser Arbeit könnte die Entwicklung von Substanzen sein, die die Aktivität des RhoA/ ROK- Signalweges reduzieren, und somit glatte Muskelzellen für die Wirkung des NO zu sensibilisieren. Weitere Studien sind jedoch notwendig, um zu untersuchen, ob eine Antagonisierung calciumsensitivierender Mechanismen zu einer besseren Effektivität von endogenem NO oder exogener Nitratre unter pathophysiologischen Bedingungen führt, und somit ein alternativer Therapieansatz kardiovaskulärer Erkrankungen sein kann.

5.2 Vergleich mit anderen Arbeiten

Nach der Interpretation unserer Daten sollen diese Ergebnisse mit Beobachtungen anderer Publikationen verglichen werden. Am besten untersucht ist der Mechanismus der Calciumsensitivierung in glatten Muskelzellen des Kaninchenileums. In diesen konnte nachgewiesen werden, dass Telokin die Empfindlichkeit des kontraktile Apparates beeinflusst. Neben der Fähigkeit in-vitro die Oligomerisation der MLCK zu hemmen (Nieznanski & Sobieszek 1997) und die Phosphorylierung der MLC_{20} zu antagonisieren (Silver et al. 1997), konnte die Gruppe um Somlyo zeigen, dass Telokin darüber hinaus auch die Aktivität der MLCP beeinflusst. In glatten Muskelzellen des Ileums führen Forskolin und 8-Br-cGMP über eine Phosphorylierung des Telokins zur Ca^{2+} -unabhängigen Relaxation. Zellen mit thiophosphorylierter MLC_{20} und telokindepletierte Zellen hingegen waren nicht in der Lage, auf Forskolin oder 8-Br-cGMP adäquat mit Relaxation und MLC_{20} -P-Abfall zu reagieren, was bewies, dass es sich bei diesem Phänomen um ein MLCP abhängige Calciumdesensitivierung handelte (Wu et al. 1998). Glatte Gefäßmuskelzellen exprimieren Telokin jedoch nur in geringen Mengen. Ein Einfluss auf die Calciumsensitivität konnte bisher nicht gefunden werden (Choudhury et al. 2004) (Hoggatt et al. 2002). Dies scheint ein grundlegender Unterschied zwischen den phasischen Muskelzellen des Magen-Darmtraktes und den vaskulären tonischen zu sein (Herring & Smith 1996). Im Gefäßsystem müssen also andere Mechanismen existieren, die diese Wirkung vermitteln.

Erste Hypothesen gingen davon aus, dass es sich bei der NO-vermittelten Ca^{2+} -Desensitivierung um eine direkte Interaktion der $cGKI\alpha$ mit der regulatorischen Untereinheit der MLCP handelt. Diese Vermutungen basierten auf Analysen der Aminosäuresequenzen der $cGKI\alpha$ und der MYPT1 von Hühnern, die beide über eine sogenannte Leuzin-Reißverschluss-Sequenz (*leucine-zipper Motif*) verfügen. Über dieses Motiv ist es der $cGKI\alpha$ möglich an MYPT1 zu binden (Surks et al. 1999). Da sich jedoch dieses Strukturmotiv nicht in der Sequenz aller Splicevarianten der MYPT1 nachweisen lässt und die direkte Interaktion beider Proteine nicht zu einer

Aktivitätssteigerung der MLCP führt (Nakamura et al. 1999), scheint diese Hypothese nicht zuzutreffen. In großen Leitungsgefäßen von Ratten führen der NO-Donor SNP und 8-Br-cGMP zur Ca^{2+} -unabhängigen Relaxation von durch Phenylephrin vorkonstringierten Muskelfasersteifen und zur Auflösung von *stress fiber* Formationen, einem Aktivitätsparameter des RhoA/ROK-Tonus. Diese Beobachtungen führten zur Hypothese, dass NO seine Effekte über eine Phosphorylierung von RhoA und/oder der ROK durch die cGKI α ausübt. In der Tat fand sich in der Primärstruktur des RhoA, im Gegensatz zur ROK, eine Konsensussequenz für eine Phosphorylierung durch die cGKI α . Es handelt sich hierbei um Ser-188, das in phosphoryliertem Zustand zu einer Inaktivierung von RhoA führt. Eine Punktmutation in dieser Position von Ser nach Ala (RhoA^{Ala-188}) verhindert, dass RhoA durch 8-Br-cGMP inaktiviert werden kann (Sauzeau et al. 2000). Zu ähnlichen Ergebnissen kam die Arbeitsgruppe um Chitaley und Webb (Chitaley & Webb 2002). In ihrer Arbeit äußern sich die Autoren jedoch nicht zu den molekularen Mechanismen dieses Effektes. Eine jüngst publizierte dritte Arbeit, ebenfalls an großen Leitungsgefäßen von Ratten, vergleicht unterschiedliche NO-Donoren in ihren calciumdesensitivierenden Eigenschaften (Soloviev et al. 2004). Verglichen wurden Glyceroltrinitrat (GTN), SNP und molekulares, in Wasser gelöstes NO in ihrer Fähigkeit, präkontrahierte glatte Gefäßmuskelzellen zu relaxieren. Es zeigte sich dabei, dass im Gegensatz zu GTN sowohl SNP als auch molekulares NO in der Lage sind, glatte Muskelzellen auch in der Anwesenheit von Inhibitoren der cGKI α (ODQ bzw. LY83583) zu relaxieren. Applikation von Dithioerythritol (DET), eine Substanz, die in der Lage ist, Sulfhydryl-gruppen (SH) in ihrem reduzierten Zustand zu halten und die Bildung von Nitrosylaten zu verhindern, reduzierte die relaxierende Potenz von NO jedoch erheblich. Ein möglicher Mechanismus für diese cGMP unabhängige Desensitivierung könnte also eine direkte Interaktion von SH-Gruppen von Membran- und/oder intrazellulären Proteinen mit NO sein. Die Existenz eines solchen Mechanismus könnte eine Erklärung für die Diskrepanz unserer Ergebnisse mit denen von Sauzeau et al. liefern. Eine zusätzliche Modifikation der Aktivität von RhoA und/oder nachgeschalteten Schritten durch NO könnte ein alternativer Weg der Calciumdesensitivierung sein, der nicht mit einer Translokation des RhoA an die Zellmembran einhergehen würde.

Die Interpretation der einzelnen Arbeiten hinsichtlich der dilatatorischen Fähigkeit von NO und der dabei beteiligten intrazellulären Mechanismen wird darüber hinaus noch durch die Tatsache erschwert, dass NO die Aktivität der Ca^{2+} -abhängigen K-Kanäle (BK, IK und SK) und somit die in der Mikrozirkulation vorherrschende EDHF-Antwort beeinflussen kann. Sowohl eine Aktivierung als auch eine Inhibierung der Leitfähigkeit der Ca^{2+} -abhängigen K-Kanäle wurden beobachtet. So zeigten elektrophysiologische Untersuchungen an glatten Muskelzellen des Kolons von Hamstern eine Zunahme der Leitfähigkeit von IK und BK in Anwesenheit der NO

–Donoren SNP und S-Nitroso-L-Cystein (Watson et al. 1996) (Lang & Watson 1998). Anders scheint es sich bei langfristiger Applikation von NO zu verhalten. Einer Untersuchungen an isolierten Aortenklappenendothelzellen von Hamstern zeigte, dass eine langfristige Applikation des NO-Donors Nitroglycerin zu einer Abschwächung der Acetylcholin vermittelten Hyperpolarisation führte (Kusama et al., 2005).

Ein weiteres Organgebiet, in dem die Mechanismen der Calciumsensitivität untersucht wurden, ist der pulmonale Kreislauf. Bekannt ist, dass chronische Hypoxie zu Vasokonstriktion und pulmonaler Hypertonie führt. Begrenzt wird dieser Prozess physiologischerweise durch NO. So ist die endothelabhängige Gefäßdilatation in Ratten, die experimentell chronischer Hypoxie ausgesetzt waren, deutlich gesteigert (Isaacson et al. 1994) (Resta & Walker 1996). Chronische Hypoxie führt dabei zum einen zu einer gesteigerten Expression der eNOS (Le Cras et al. 1996), zum anderen zu einer verminderten Calciumsensitivität pulmonaler glatter Gefäßmuskelzellen (Jernigan et al. 2004). In zwei jüngst publizierten Arbeiten widmete sich die Gruppe um Jernigan, Walker und Resta dem Mechanismus der Ca^{2+} -Desensitivierung in kleinen pulmonalen Arterien (Jernigan et al. 2003) (Jernigan et al. 2004). Chronische Hypoxie führt dabei zu einer erhöhten Basalaktivität der RhoA/ROK-Kaskade bei unveränderter basaler Expression, ein Effekt der durch die Gabe des Lipidmediators Sphingosinphosphorylcholin (SPC) noch verstärkt werden konnte. Analog zu den von uns erhobenen Befunden verhindert NO sGC- und cGKI \square -abhängig diese Calciumsensitivierung. Dieser desensitivierende Effekt ist jedoch nur bei gesteigertem RhoA/ROK-Tonus zu beobachten. Im Gegensatz zu den an isolierten Widerstandsgefäßen des Hamsters erhobenen Befunden wurde dieser Effekt auf eine Inhibierung von RhoA zurückgeführt, da NO zu einer Reduzierung der GTP-beladenen RhoA-Fraktion und einer Abnahme der Translokation der Rhokinase an die Zellmembran führt. Es bleibt abzuwarten, ob die Diskrepanz dieser Untersuchungen in funktionellen Unterschieden der beiden Strombahngebiete liegt, oder durch den unterschiedlichen Versuchsaufbau bedingt ist.

In unseren Versuchen konnten wir zeigen, dass der Lipidmediator S1P in der Lage ist, die desensitivierende Wirkung über eine Aktivitätssteigerung der Rhokaskade zu antagonisieren. Die Bedeutung, die S1P im Rahmen der Ca^{2+} -Sensitivierung besitzt, ist allerdings noch Gegenstand der aktuellen Diskussion. Neure Studien liefern recht unterschiedliche Ergebnisse. So konnte gezeigt werden, dass High Density Lipoproteine (HDL) über S1P zur Vasorelaxation glatter Muskelzellen in isolierten Aorten führt (Nofer et al. 2004). Sie identifizierten Sphingosylphosphorylcholin (SPC), Lysosulfatid (LSF) und S1P als vasoaktive Bestandteile des HDL und stellten die Hypothese auf, dass HDL seine atheroprotektive Wirkung zum Teil über eine Dilatation von Gefäßen ausübt. Es konnte in der Tat gezeigt werden, dass SPC, LSF und S1P zu einer Vasorelaxation von mittels Phenylephrin präkonstringierten Aorten führt. Dieser

Effekt ist von der Anwesenheit eines intakten Endothels und einer intakten eNOS abhängig, also von Versuchsbedingungen, die den in dieser Arbeit vorliegenden sehr ähnlich sind. Darüber hinaus waren SPC, LSF und S1P in der Lage, in kultivierten Endothelzellen direkt die NO Produktion dosisabhängig zu steigern, ein Mechanismus der die Kinase *Akt* involviert. Die Verbindung zwischen HDL und seinen Lipidmediatoren auf der einen Seite und der Aktivitätssteigerung der eNOS auf der anderen Seite scheint in diesem Model der S1PR₃ zu sein. S1PR₃-defiziente Mäuse waren nicht in der Lage, auf Stimulierung durch HDL mit einer Dilatation zu reagieren. In dieser Arbeit scheint S1P also Effekte auf das Endothel auszuüben, die zu Ergebnissen führen, die konträr zu den unsrigen sind. In einer weiteren Arbeit zu den Effekten von HDL in der koronaren Zirkulation von Mäusen kommt dieselbe Gruppe allerdings zu divergenten Resultaten (Levkau et al. 2004). In diesen Versuchen wurden die dilatatorischen Eigenschaften des HDL im koronaren Gefäßbett von Wildtyp-, eNOS-knock-out und S1PR₃-knock-out Mäusen in vivo bestätigt. Im Gegensatz zu den an präkonstringierten Aorten erhaltenen Daten, führte jedoch die Stimulation mit S1P unter diesen Versuchsbedingungen zu einer Konstriktion der Koronararterien und zu einer Abnahme der myokardialen Durchblutung. Interessanterweise scheint dieser Effekt ebenfalls S1PR₃ vermittelt zu sein, da die S1P-vermittelte Konstriktion in S1PR₃ defizienten Mäusen vollkommen aufgehoben war. Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine Arbeitsgruppe an der Harvard Universität, die ebenfalls S1PR₃-vermittelte Konstriktionen in cerebralen Arterien beobachtete (Salomone et al. 2003). In der Literatur existieren unterschiedliche Ansätze, um die Diskrepanz dieser Befunde zu erklären. Offensichtlich ist S1P in der Lage, unter basalen Bedingungen glatte Gefäßmuskelzellen zu kontrahieren, während es in bereits präkonstringierten Gefäßen Dilatationen hervorruft. Dabei scheinen zwei unterschiedliche Mechanismen involviert zu sein: ein endothelialer (S1PR₃ vermittelt) und einer, welcher die glatten Muskelzellen einschließt (S1PR₂ und S1PR₃ vermittelt). Der endothelvermittelte scheint dabei zu einer Dilatation zu führen und ist auf eine funktionell intakte eNOS angewiesen. In glatten Gefäßmuskelzellen hingegen ist RhoA und die Rhokinase involviert und S1P führt zur Kontraktion. Das Überwiegen des einen oder des anderen Mechanismus mag von Gefäßbett zu Gefäßbett und in unterschiedlichen Spezies variieren (vgl auch Levkau et al., 2004). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit dieses Phänomens könnte in divergierenden K_m und V_{max} dieser beiden Mechanismen liegen. Niedrige K_m und V_{max} würden bei basalem S1P-Spiegel zu Dilatation führen, während die hohe K_m und V_{max} eines kontraktiven Mechanismus bei weiter erhöhter S1P-Konzentration zu Konstriktion führen würde. Es liegen bis heute jedoch noch keine in vivo Daten über S1P-Konzentrationen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen vor.

Eine letzte Erklärungsmöglichkeit für die Diskrepanz zwischen unseren Ergebnissen und den in Mäusen erhobenen Daten könnte das Fehlen von S1PR₃ im Hamsterendothel sein, was dazu führen würde, dass auf Stimulation mit S1P lediglich die glattmuskulären konstringierenden Effekte zum Tragen kommen. Da in der Literatur aber lediglich Daten zur Sequenz des S1PR₃ von Mäusen, jedoch keine für den Hamster existieren, wurde dieser Ansatz nicht weiter von uns untersucht.

5.2 Methodenkritik

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten stützen sich auf das experimentelle Modell der isolierten Widerstandsgefäße von Hamstern. Die in diesem Modell erhobenen Daten können nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen werden, ohne die Methode kritisch zu diskutieren und mit anderen Modellen zu vergleichen.

Die Wahl dieses Versuchsmodells folgt der Erkenntnis, dass diese Gefäße im distalen Teil des Gefäßbaumes den peripheren Widerstand mit regulieren (Joyner et al. 1981) und, dass sich die tonusregulierenden Mechanismen in diesen kleinen Arterien signifikant von denen in bisher vorrangig untersuchten, großen Leitungsgefäßen unterscheiden (Nagao et al. 1992) (Nagao & Vanhoutte 1993) (Tang et al. 1995) Tang & Joyner 1992). Basierend auf diesen Beobachtungen wurde das experimentelle Modell der isolierten Widerstandsgefäße aus dem *M. gracilis* des Hamsters weiterentwickelt, das zunächst validiert werden musste. Dabei muss jedoch erwähnt werden, dass die Annahme, dass die untersuchte Arterie ein Widerstandsgefäß darstellt, auf einem Analogieschluss basiert. Bei dem untersuchten Gefäß handelt es sich um eine Seitenast erster Generation der *A. femoralis* des Hamsters. Wir vermuten dabei, dass es sich um ein Widerstandsgefäß handelt, da beim Menschen Arterien mit ähnlichem Außendurchmesser (180 – 240 µm) für den Hauptteil des peripheren Widerstandes verantwortlich sind (vgl. Einleitung). In der Zirkulation des Hamsters wurde jedoch nie untersucht, ob es sich bei Arterien in dieser Größe um Widerstandsgefäße handelt, d.h hier schon ein deutlicher Abfall des Perfusionsdrucks festzustellen ist.

Untersuchungen an isolierten Widerstandsgefäßen stellen ein Bindeglied zwischen Zellkulturversuchen auf der einen und intravitalen Beobachtungen an intakten Tieren auf der anderen Seite dar. Dabei gehen die Aussagemöglichkeiten aufgrund der erhaltenen Funktionalität der isolierten Widerstandsgefäße weit über die einer Zellkultur hinaus. Das Modell bietet gleichzeitig die Möglichkeit, die Versuchsbedingungen in gewissem Maße zu kontrollieren, und unabhängige Störfaktoren zu eliminieren. Dabei wird jedoch nicht die Komplexität des Gesamtorganismus erreicht, aus dem sie entnommen worden sind, so dass diese Einschränkungen bei der Interpretation der gewonnenen Daten stets beachtet werden muss.

Somit sind Extrapolationen auf die Relevanz eines Befundes im Gesamtorganismus stets als, wenn auch durchaus zulässige, Spekulationen zu kennzeichnen, die in einem sich anschließenden Schritt im intakten Tier und später im Menschen bestätigt werden müssen.

Zunächst soll versucht werden, die Wertigkeiten von Befunden, die an einem aus dem *M. gracilis* des Hamsters isolierten Skelettmuskelwiderstandsgefäß erhoben und denen, die im intakten Hamster gewonnen wurden, zu vergleichen. In unserer eigenen Arbeitsgruppe haben wir Befunde über die Wirkungen und die Bedeutung der endothelialen Faktoren Stickstoffmonoxid (NO), Prostacyclin (PGI₂) und dem endothelabhängigen hyperpolarisierenden Faktor (EDHF) aus dem isolierten Widerstandsgefäß des *M. gracilis* mit *in vivo* Daten verglichen, die an der Mikrozirkulation des *M. cremaster* dieser Tierspecies erhoben wurden. Dabei wurden Unterschiede hinsichtlich der Sensitivität für Prostacyclin (PGI₂) festgestellt. Im Gegensatz zu Befunden am *M. cremaster* des intakten narkotisierten Hamsters (de Wit et al. 1994) waren weder endogenes, endotheliales noch exogen zugegebenes Prostacyclin in der Lage, Dilatationen zu induzieren (Bolz et al. 1999) (Bolz et al. 2000). Der direkte Vergleich wird jedoch auch hier durch den Umstand erschwert, dass es sich hier zwar um dieselbe Spezies handelte, die untersuchten Gefäßbetten sich jedoch voneinander unterschieden.

Ein weiterer Aspekt, der von einer Arbeitsgruppe unseres Instituts systematisch untersucht wurde, ist die Abhängigkeit der Gefäßdilatation von der verwendeten Narkose der Versuchstiere, da es Hinweise gab, die zeigten, dass Isoformen des Cytochrom P450, die Kandidaten für die damals noch unbekannte EDHF-Synthase waren, durch das zur Narkose routinemäßig benutzte Pentobarbital gehemmt werden. In der Tat konnte unter *in vivo* Bedingungen gezeigt werden, dass ein wesentlicher Anteil der EDHF-Antwort unter *in vivo* Bedingungen tatsächlich durch Pentobarbital gehemmt wurde (de Wit et al. 1999). Wir leiteten hieraus die Hypothese ab, dass in bisherigen *in vivo* Untersuchungen die Bedeutung des EDHF eher fälschlich unterschätzt wurde, während die physiologische Relevanz dieses Metaboliten durch das Versuchsmodell der isolierten Widerstandsgefäße, welches ohne Anästhetika auskommt, exakter dargestellt wird. Leider existieren aus versuchstechnischen Gründen keine *in vivo* Befunde für Widerstandsgefäße aus dem *M. gracilis* des Hamsters, welche einen detaillierten Vergleich der *in vivo* Ergebnisse mit denen im isolierten Modell zulassen würden.

Untersuchungen an isolierten Widerstandsgefäßen ermöglichen im Gegensatz zur Zellkultur funktionelle Messungen. Dieser Vorteil wurde jedoch ursprünglich durch die mangelnde Aussagemöglichkeiten über Vorgänge auf subzellulärer molekularer Ebene stark eingeschränkt. Die Einführung von Fluoreszenzfarbstoffen, wie z.B. dem Fura 2 (Grynkiewicz et al. 1985) ermöglichte es, die Änderungen von Ionenkonzentrationen in Zellen sichtbar zu machen und damit die erhaltenen Befunde um eine Dimension zu erweitern. Meininger et al. und andere

etablierten diese Technik an isolierten Widerstandsgefäßen und erweiterten dadurch wesentlich die Analysemöglichkeiten der vaskulären Forschung (Meininger et al. 1991). Um die Aussagekraft dieses experimentellen Modells weiter zu steigern, hat unsere eigene Arbeitsgruppe ein Verfahren entwickelt, welches zunächst erlaubte, isolierte Gefäße außerhalb des Körpers für mehr als zwei Tage funktionell und strukturell intakt zu halten (Bolz et al. 2000) und anschließend mittels Plasmiden mit sehr hoher Effizienz genetisch zu verändern (Bolz & Pohl 2003). Beide Techniken sind eine wichtige Basis der in dieser Arbeit vorgestellten Befunde.

Die Analyse isolierter Widerstandsgefäße ist eine komplexe Untersuchungsmethode. Da sich mögliche Fehler auf jeder Ebene der Versuchsdurchführung einschleichen können, ist eine effektive Qualitätskontrolle unverzichtbar, um die erzielten Ergebnisse mit anderen Methoden zu vergleichen. Die atraumatische Präparation des Gefäßes (also die Vermeidung von mechanischen Irritationen des Gewebes während des Präparationsvorgangs), die sorgfältige Kanülierung und die Optimierung der Kulturmedien, mit denen die Gefäße nach Entnahme aus dem Muskel für die erforderliche Zeit per- und superfundiert werden, sind wesentliche Faktoren für den Erfolg dieser Methode. Um Verfälschungen der erhobenen Befunde durch etwaige Schädigungen der präparierten Gefäße, die sich auch bei behutsamem Vorgehen nicht gänzlich ausschließen ließen, zu unterbinden, wurden vor Versuchsbeginn alle Arterien hinsichtlich ihrer funktionellen Integrität untersucht. Hierzu wurde die Vasokonstriktion nach Gabe von Noradrenalin sowie die Acetylcholin- induzierte Vasodilatation überprüft. Nur Gefäße, die in diesem Test auf beide Stimuli in ausreichendem Maße reagierten, wurden untersucht und in die folgenden Auswertungen aufgenommen. Derselbe Test wurde sowohl in Gefäßen, an denen pharmakologische Experimente durchgeführt wurden, als auch in transfizierten Arterien durchgeführt, um eine Beeinträchtigung durch unspezifische Effekte der Transfektionsmethode auszuschließen.

Für die Befundinterpretation weiterhin wichtig war eine gleichbleibende Transfektionseffizienz der untersuchten Proteine. Überprüft wurde dies mittels Immunfluoreszenz, indem Mutanten transfiziert wurden, die entweder mit dem molekularen Marker c-myc oder FLAG-markiert waren. Beides sind Epitope, die in nativen, untransfizierten glatten Muskelzellen gar nicht (FLAG) oder nur in sehr geringer Mengen exprimiert werden (c-myc). Darüber hinaus wurden noch Experimente mit GFP-Fusionsproteinen durchgeführt. Stichprobenartig konnte so mit beiden Methoden die hohe Transfektionseffizienz bestätigt werden, die wir bereits mit reinem GFP dokumentiert hatten (Abb. 13 (Bolz et al. 2000) (Bolz et al. 2000)).

Abb. 13:

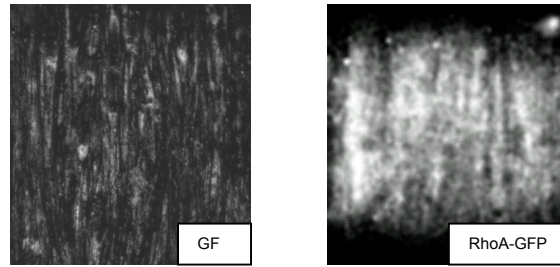


Abb. 13: Expression von reinem GFP und den Fusionsproteinen Sphk1-GFP und RhoA-GFP in den glatten Muskelzellen intakter Widerstandsgefäße. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für jeweils 5 unabhängige Experimente.

Für die Interpretation der Befunde war weiterhin wichtig, dass gewährleistet werden konnte, dass entweder nur Endothelzellen (bei luminaler Applikation des Transfektionsmediums) oder nur glatte Muskelzellen (bei adventitieller Applikation) genetisch verändert wurden. Befunde aus früheren Untersuchungen, in denen fluoreszenzmarkierte (FITC) Antisenseoligonukleotide von luminal mit dem Ziel inkubiert wurden, zeigten, dass die Expression einer putativen EDHF-Synthase (Cyt P₄₅₀ 2C8) selektiv in den Endothelzellen reduziert werden konnte (Bolz *et al.*, 2000a). Es stellte sich heraus, dass die Basalmembran zwischen dem Endothel und der darunter liegenden *Tunica muscularis* von dem Transfektionsmittel (Superfect[®]) und den Oligonukleotiden offensichtlich nicht in einem funktionell relevanten Ausmass passiert wurde, da bei luminaler Inkubation keine glatten Muskelzellen mit FITC-markierten Oligonukleotiden angefärbt wurden. Erst nach mechanischer Zerstörung des Endothels kam es bei luminaler Applikation der Transfektionslösung zu einer Aufnahme der FITC-markierten Oligonukleotide in die glatten Muskelzellen. In die selbe Richtung deuten die Transfektionsversuche mit GFP-Plasmiden, bei denen sich die Expression auf die glatten Muskelzellen beschränkte, während in den Endothelzellen keine GFP-Fluoreszenz in konfokalmikroskopischen Aufnahmen nachweisbar war (Bolz & Pohl 2003).

Transfektion und Überexpression von Proteinen sind neue und sehr potente Untersuchungsmethoden. Es ist deswegen von einigen Autoren vorgeschlagen worden, dass Kriterien, wie die von Krebs und Beavo (Krebs & Beavo 1979) auf diese Untersuchungen ausgeweitet werden. Eines dieser ist die funktionelle Plausibilität der Befunde im Hinblick auf den erwarteten Effekt der genetischen Manipulation, der zeitliche Zusammenhang ein weiteres. Beiden Kriterien wurde bei der Interpretation unserer Daten Rechnung getragen.

Ein weiteres Problem mit dem Versuchsmodell ergibt sich aus der geringen Gewebemasse, die ein solches Widerstandsgefäß darstellt und die somit die Anwendung molekularbiologischer Techniken erheblich erschwert. So lassen sich Proteine, die nur in geringem Maße von glatten Muskelzellen exprimiert werden, mittels Western-Blot nur sehr schwer oder gar nicht darstellen.

Wir entschieden uns deshalb, den Mechanismus der Translokation, den wir in Immunfluoreszenzexperimenten in isolierten Widerstandsgefäßen beobachtet hatten, durch Western-Blot Experimente an Aorten zu bestätigen.

Die Wahl des Versuchstieres Hamster für unseres experimentelles Modells der isolierten und kultivierten Widerstandsgefäße erfolgte aus technischen Überlegungen. Bisher ist uns die Kultivierung von Widerstandsgefäßen mit der Möglichkeit diese anschließend mittels Plasmidtransfektion genetisch zu manipulieren lediglich mit dieser Spezies möglich. Bei kritischer Betrachtung stellt sich hier die Frage, in wie weit sich die erhobenen Befunde auf die Regulation menschlicher Widerstandsgefäße übertragen lässt. Bereits bei der Interpretation unserer Daten mit Arbeiten anderer Arbeitsgruppen muss immer die Frage gestellt werden, ob beobachtete Unterschiede auf die unterschiedlichen Tierspezies zurückgeführt werden müssen. Dies trifft natürlich auch auf die Übertragung auf den Menschen zu.

5.4 Klinische Relevanz der Befunde zur Calciumsensitivität der Gefäßmuskelzellen

Die Beschreibung des Konzeptes der Calciumsensitivität von Andrew Somlyo und Avril Somlyo im Jahre 1968 stellt einen bedeutenden Meilenstein in der vaskulären Forschung dar. Die Bedeutung des Konzeptes liegt zunächst einmal in der Möglichkeit begründet, experimentelle Befunde zu deuten, die sich durch Beobachtung der Calciumbewegungen alleine nicht erklären ließen. In der Einleitung dieser Arbeit wurden einige Versuchsansätze exemplarisch dargestellt, auf die dieser Sachverhalt zutrifft. Die Bedeutung dieses Konzeptes geht aber über die rein physiologische Erklärung glattmuskulären Verhaltens hinaus. In jüngerer Zeit haben verschiedene Untersuchungen gezeigt, dass Krankheiten mit einer pathologischen Veränderung der Calciumsensitivität glatter Muskelzellen assoziiert sind und dass diese das Ziel von spezifischer Therapieansätzen sein kann. So wurde eine Beteiligung von RhoA im Rahmen verschiedener Krankheiten wie Bluthochdruck, koronare und cerebrale Vasospasmen, Asthma bronchialae und die erektile Dysfunktion beschrieben. Die Arbeitsgruppe um Narumiya konnte als erstes zeigen, dass durch Inhibierung der Rhokinase mit Y27632 der Blutdruck gesenkt werden kann (Uehata et al. 1997). Weitere Indizien für den pathogenetischen Einfluss von RhoA sind die erhöhte Konzentration der ROK mRNA im spontaneously hypertensive rats (SHR) Model (Mukai et al. 2001) und gesteigerte RhoA-Aktivität in aortalen Muskelzellen hypertensiver Ratten (Seasholtz et al. 2001) (Seko et al. 2003). Auch die Empfindlichkeit menschlicher glatter Muskelzellen auf Rhokinaseinhibitoren deutet auf das klinische Potential von Substanzen, wie Y27632 oder HA-1077, in der antihypertensiven Therapie hin (Wang et al. 2002). Neben den recht langfristigen Effekten von RhoA und den nachgeschalteten Proteinen gibt es auch Hinweise auf kurzfristige, die im Rahmen der subarachnoidalen Blutung auftreten. Bei diesen

Patienten kommt es in 10% der Fälle zu einer gefürchteten Komplikation: dem cerebralen Vasospasmus (Baldwin et al. 2004). Experimentell durch Blutungen ausgelöste Vasospasmen wurden von einem Anstieg der Rhokinaseaktivität und vermehrter MYPT1-Phosphorylierung (an Position 854) begleitet (Sato et al. 2000). Der Einsatz von Y27632 führt auch in diesem Fall zu einer vermehrten cerebralen Vasodilatation (Chrissobolis & Sobey 2001). Dies hat dazu geführt, dass Japan das erste Land ist, welches Rhokinaseinhibitoren als Therapeutikum in der Therapie des cerebralen Vasospasmus nutzt (Sasaki et al. 2002). Als letztes Beispiel zur Verdeutlichung der klinischen Bedeutung der Calciumsensitivität sollen die Befunde aus der Asthma-bronchiale-Forschung dienen. In glatten Muskelzellen der Atemwege führten Antigene zu einer Ca^{2+} -Sensitivierung, die durch den Einsatz von Y27632 und der C3-Transferase reversibel war (Chiba et al. 2005; Iizuka et al. 2000).

Die hier genannten Beobachtungen unterstreichen nochmals die klinische Bedeutung der Calciumsensitivität und verdeutlichen warum die Untersuchung der genauen physiologischen und biochemischen Zusammenhänge dieses Mechanismus in der Mikrozirkulation und in anderen Organstromgebieten für zukünftige therapeutische Konzepte wichtig sein könnte. In der Hoffnung, dass sich aus der genauen Kenntnis des Mechanismus der Calciumsensitivität unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen in Zukunft neue Strategien in der Behandlung von Hypertonie und anderer kardiovaskulärer Erkrankungen ergeben, haben wir uns diesem Phänomen in der Mikrozirkulation gewidmet.

6. Zusammenfassung

Der Gefäßtonus glatter Muskelzellen von Widerstandsgefäßen wird von unterschiedlichen Mechanismen reguliert. Zum einen führen Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration zu Dilatation oder Kontraktion von vaskulären glatten Muskelzellen. Es gibt darüber aber noch calciumunabhängige Mechanismen, bei dem nicht die intrazelluläre Calciumkonzentration, sondern eine Empfindlichkeit des kontraktilen Apparates für Calcium den Änderungen des Gefäßtonus zugrunde liegt. Entscheidend für die „Empfindlichkeit“ des kontraktilen Apparates für Calcium und somit für die Calciumsensitivität ist das Verhältnis der Aktivität von kontraktionsvermittelnder Myosin Leichtketten Kinase und dilatationsvermittelnder Myosin Leichtketten Phosphatase.

Die Veränderungen der Calciumsensitivität glatter Muskelzellen stellt potentiell einen bedeutenden Mechanismus der Durchmesserregulation von Widerstandsgefäßen dar. Bisher ist bekannt, dass über den RhoA/Rhokinase-Signaltransduktionsweg Signale im Sinn einer Änderung der Calcium-Sensitivität durch Hemmung der MLCP vermittelt werden. Auf der anderen Seite stehen diesem Signalweg Mechanismen gegenüber, die zu einer Aktivierung der MLCP und somit zu einer Antagonisierung dieser Effekte führen. Es ist bisher in Widerstandsgefäßen jedoch nicht bekannt, welcher Transmitter zu dieser Antagonisierung führt und welche Schritte sich diese Signaltransduktion bedient.

Neueren Untersuchungen zufolge beruht die dilatatorische Wirkung des Transmitters NO nur zu einem geringen Teil auf einer direkten Reduktion der intrazellulären Calciumkonzentration. Wir vermuteten deswegen, dass NO möglicherweise eine entscheidende Rolle in der Vermittlung der Calciumdesensitivierung vaskulärer glatter Muskelzellen spielen könnte.

Stimulation von isolierten Widerstandsgefäßen durch exogene Applikation des NO-Donors SNP (10 $\mu\text{mol/L}$) führte zu einer signifikanten Abschwächung der Gefäßkonstriktion unter schrittweiser Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration. Die Tatsache, dass die Behandlung mit dem Guanylatzyklase Hemmer ODQ diese calciumdesensitivierenden Eigenschaften von NO aufhob, legt die Schlussfolgerung nahe, dass dieser Effekt durch die lösliche Guanylatzyklase/cGMP vermittelt wird. Im Rahmen der intrazellulären Signaltransduktionskaskade von NO scheint eine funktionell intakte MLCP von eminenter Bedeutung zu sein, da eine Antagonisierung dieses Enzyms durch 120 nmol/L des Phosphataseinhibitors Calyculin A, eine Dosierung, für die gezeigt werden konnte, dass sie spezifisch die MLCP hemmt, zu einem Verlust der calciumdesensitivierenden Wirkung von SNP führte.

NO mit seinen desensitivierenden Eigenschaften scheint der Lipidmediator S1P als „Calcium-Sensitizer“ gegenüber zu stehen. Exogenes S1P (0,01 – 1 $\mu\text{mol/L}$) führte zu einer dosisabhängigen, aber nicht von Calciumerhöhung begleiteten Konstriktion von Widerstandsgefäßen, welche durch Antagonisten des RhoA/ Rhokinasewegs wie Y27632 oder eine Transfektion der C3-Transferase signifikant abgeschwächt wurde. Darüber hinaus hob die vorherige Inkubation mit S1P die calciumdesensitivierenden Eigenschaften des NO-Donors SNP vollständig auf. Der Mechanismus dieses Effektes scheint dabei eine strukturelle Desintegration der MLCP sein, da nachgewiesen werden konnte, dass S1P zu einer Translokation der regulatorischen Untereinheit MYPT1 der MLCP an die Membran führte. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass wiederum der RhoA/ Rhokinaseweg diese S1P-Effekt vermittelt, da diese Translokation der MYPT1 in Gefäßen, welche die dominant-inaktive Mutante N19RhoA exprimierten oder mit dem spezifischen Rhokinaseinhibitor Y27632 (1 $\mu\text{mol/L}$) vorbehandelt waren, nicht nachweisbar war.

Neben den Einflüssen auf die Lokalisation der MYPT1 bewirkte eine Stimulation von isolierten Widerstandsgefäßen durch S1P (10 nmol/L) auch eine Translokation von RhoA an die Zellmembran glatter Muskelzellen, ein Effekt der mit einer Aktivierung dieses Signalweges einhergeht. Im Unterschied zu Befunden, welche an permeabilisierten glatten Muskelzellen der Aorta (Sauzeau et al. 2000) erhoben wurden, war SNP in unseren Untersuchungen nicht in der Lage, diese Aktivierung zu antagonisieren. Zum einen hatte nachträgliche Stimulation von mit S1P vorbehandelten Widerstandsgefäßen keinen Einfluss auf die Translokation von RhoA, zum anderen führte eine Transfektion von RhoA^{Ala188}, einer Mutante welche nicht durch die cGK phosphoryliert werden kann, zu keiner Abschwächung der calciumdesensitivierenden Eigenschaften von SNP. In unserem Modell wird der calciumdesensitivierende Effekt von NO offenbar nicht über einen direkten Einfluß der cGK auf RhoA ausgeübt. Gleichwohl ist es wichtig zu erwähnen, dass eine Inhibierung des RhoA/ Rhokinasewegs zu einer deutlichen Verstärkung der Dilatation von Widerstandsgefäßen auf exogenen Zugabe von SNP führte. In unserem Modell konvergieren offensichtlich der NO- und der RhoA/ Rhokinaseweg auf zellulärer Ebene im Bereich der MLCP, ohne jedoch (wie z. B. von Sauzeau et al. nachgewiesen) direkt miteinander zu interagieren.

Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnten wir in dieser Arbeit zeigen, dass NO in glatten Muskelzellen isolierter Widerstandsgefäße des Hamsters zu einer Calciumdesensitivierung des kontraktiven Apparates führt. Dieser Effekt ist cGMP abhängig und bedarf einer funktionell intakten MLCP. Die calciumdesensitivierenden Eigenschaften des NO können durch Aktivierung des RhoA/ Rhokinaseweges über eine Inaktivierung – vermutlich eine Desintegration der drei einzelnen

Untereinheiten der MLCP - antagonisiert werden. Dem entsprechend führt eine Inhibierung des RhoA/ Rhokinaseweges zu einer Verstärkung der NO-induzierten Dilatation isolierter Widerstandsgefäße. Den desensitivierenden Eigenschaften des NO steht eine durch S1P – und somit über den RhoA/ Rhokinaseweg – vermittelte Zunahme der Calciumempfindlichkeit des kontraktilen Apparates gegenüber.

Eine pharmakologische Beeinflussung des beschriebene Mechanismus ist demnach ein interessante Option, das Antwortverhalten von vaskulären glatten Muskelzellen auf NO in Widerstandsgefäßen zu beeinflussen und so therapeutisch den peripheren Widerstand, etwa bei Hochdruckerkrankungen, zu senken.

7. Literaturverzeichnis

- Aaronson, P.I. & Benham, C.D. (1989) Alterations in $[Ca^{2+}]_i$ mediated by sodium-calcium exchange in smooth muscle cells isolated from the guinea-pig ureter. *J Physiol* 416: 1-18.
- Alessi, D., MacDougall, L.K., Sola, M.M., Ikebe, M. & Cohen, P. (1992) The control of protein phosphatase-1 by targeting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1. *Eur J Biochem* 210(3): 1023-35.
- Andriantsitohaina, R., Lagaud, G.J., Andre, A., Muller, B. & Stoclet, J.C. (1995) Effects of cGMP on calcium handling in ATP-stimulated rat resistance arteries. *Am J Physiol* 268(3 Pt 2): H1223-31.
- Auge, N., Nikolova-Karakashian, M., Carpentier, S., Parthasarathy, S., Negre-Salvayre, A., Salvayre, R., Merrill, A.H., Jr. & Levade, T. (1999) Role of sphingosine 1-phosphate in the mitogenesis induced by oxidized low density lipoprotein in smooth muscle cells via activation of sphingomyelinase, ceramidase, and sphingosine kinase. *J Biol Chem* 274(31): 21533-8.
- Baldwin, M.E., Macdonald, R.L., Huo, D., Novakovic, R.L., Goldenberg, F.D., Frank, J.I. & Rosengart, A.J. (2004) Early vasospasm on admission angiography in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage is a predictor for in-hospital complications and poor outcome. *Stroke* 35(11): 2506-11.
- Bhattacharyya, R. & Wedegaertner, P.B. (2003) Characterization of G alpha 13-dependent plasma membrane recruitment of p115RhoGEF. *Biochem J* 371(Pt 3): 709-20.
- Bhattacharyya, R. & Wedegaertner, P.B. (2003) Mutation of an N-terminal acidic-rich region of p115-RhoGEF dissociates alpha13 binding and alpha13-promoted plasma membrane recruitment. *FEBS Lett* 540(1-3): 211-6.
- Birukov, K.G., Schavocky, J.P., Shirinsky, V.P., Chibalina, M.V., Van Eldik, L.J. & Watterson, D.M. (1998) Organization of the genetic locus for chicken myosin light chain kinase is complex: multiple proteins are encoded and exhibit differential expression and localization. *J Cell Biochem* 70(3): 402-13.
- Bolz, S.S., de Wit, C. & Pohl, U. (1999) Endothelium-derived hyperpolarizing factor but not NO reduces smooth muscle Ca^{2+} during acetylcholine-induced dilation of microvessels. *Br J Pharmacol* 128(1): 124-34.
- Bolz, S.S., Fisslthaler, B., Pieperhoff, S., De Wit, C., Fleming, I., Busse, R. & Pohl, U. (2000) Antisense oligonucleotides against cytochrome P450 2C8 attenuate EDHF-mediated Ca^{2+} changes and dilation in isolated resistance arteries. *Faseb J* 14(2): 255-60.
- Bolz, S.S., Galle, J., Derwand, R., de Wit, C. & Pohl, U. (2000) Oxidized LDL increases the sensitivity of the contractile apparatus in isolated resistance arteries for Ca^{2+} via a rho- and rho kinase-dependent mechanism. *Circulation* 102(19): 2402-10.

- Bolz, S.S., Pieperhoff, S., De Wit, C. & Pohl, U. (2000) Intact endothelial and smooth muscle function in small resistance arteries after 48 h in vessel culture. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279(3): H1434-9.
- Bolz, S.S. & Pohl, U. (2003) Highly effective non-viral gene transfer into vascular smooth muscle cells of cultured resistance arteries demonstrated by genetic inhibition of sphingosine-1-phosphate-induced vasoconstriction. *J Vasc Res* 40(4): 399-405.
- Bolz, S.S., Vogel, L., Sollinger, D., Derwand, R., Boer, C., Pitson, S.M., Spiegel, S. & Pohl, U. (2003) Sphingosine kinase modulates microvascular tone and myogenic responses through activation of RhoA/Rho kinase. *Circulation* 108(3): 342-7.
- Cai, H. & Harrison, D.G. (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87(10): 840-4.
- Chiba, Y., Ueno, A., Shinozaki, K., Takeyama, H., Nakazawa, S., Sakai, H. & Misawa, M. (2005) Involvement of RhoA-mediated Ca²⁺ sensitization in antigen-induced bronchial smooth muscle hyperresponsiveness in mice. *Respir Res* 6(1): 4.
- Chikumi, H., Fukuhara, S. & Gutkind, J.S. (2002) Regulation of G protein-linked guanine nucleotide exchange factors for Rho, PDZ-RhoGEF, and LARG by tyrosine phosphorylation: evidence of a role for focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 277(14): 12463-73.
- Chitale, K. & Webb, R.C. (2002) Nitric oxide induces dilation of rat aorta via inhibition of rho-kinase signaling. *Hypertension* 39(2 Pt 2): 438-42.
- Choudhury, N., Khromov, A.S., Somlyo, A.P. & Somlyo, A.V. (2004) Telokin mediates Ca²⁺-desensitization through activation of myosin phosphatase in phasic and tonic smooth muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 25(8): 657-65.
- Chrissobolis, S. & Sobey, C.G. (2001) Evidence that Rho-kinase activity contributes to cerebral vascular tone in vivo and is enhanced during chronic hypertension: comparison with protein kinase C. *Circ Res* 88(8): 774-9.
- Clark, S.G. & Fuchs, L.C. (1997) Role of nitric oxide and Ca⁺⁺-dependent K⁺ channels in mediating heterogeneous microvascular responses to acetylcholine in different vascular beds. *J Pharmacol Exp Ther* 282(3): 1473-9.
- Conti, M.A. & Adelstein, R.S. (1981) The relationship between calmodulin binding and phosphorylation of smooth muscle myosin kinase by the catalytic subunit of 3':5' cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 256(7): 3178-81.
- De Keulenaer, G.W., Chappell, D.C., Ishizaka, N., Nerem, R.M., Alexander, R.W. & Griendling, K.K. (1998) Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. *Circ Res* 82(10): 1094-101.
- de Wit, C., Esser, N., Lehr, H.A., Bolz, S.S. & Pohl, U. (1999) Pentobarbital-sensitive EDHF comediates ACh-induced arteriolar dilation in the hamster microcirculation. *Am J Physiol* 276(5 Pt 2): H1527-34.
- de Wit, C., von Bismarck, P. & Pohl, U. (1994) Synergistic action of vasodilators that increase cGMP and cAMP in the hamster cremaster microcirculation. *Cardiovasc Res* 28(10): 1513-8.

- Ebashi, S., Ebashi, F. & Kodama, A. (1967) Troponin as the Ca^{++} -receptive protein in the contractile system. *J Biochem (Tokyo)* 62(1): 137-8.
- Enoki, T., Miwa, S., Sakamoto, A., Minowa, T., Komuro, T., Kobayashi, S., Ninomiya, H. & Masaki, T. (1995) Functional coupling of ETA receptor with $Ca(2+)$ -permeable nonselective cation channel in mouse fibroblasts and rabbit aortic smooth-muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 26 Suppl 3: S258-61.
- Enoki, T., Miwa, S., Sakamoto, A., Minowa, T., Komuro, T., Kobayashi, S., Ninomiya, H. & Masaki, T. (1995) Long-lasting activation of cation current by low concentration of endothelin-1 in mouse fibroblasts and smooth muscle cells of rabbit aorta. *Br J Pharmacol* 115(3): 479-85.
- Eto, M., Senba S., Morita F., & Yazawa M. (1997) Molecular cloning of a novel phosphorylation-dependent inhibitory protein of protein phosphatase 1 (CPI17) in smooth muscle: its specific localization in smooth muscle. *FEBS Lett.* 410 (2-3): 356-60.
- Ferris, C.D. & Snyder, S.H. (1992) Inositol 1,4,5-trisphosphate-activated calcium channels. *Annu Rev Physiol* 54: 469-88.
- Fisher, S.A. & Ikebe, M. (1995) Developmental and tissue distribution of expression of nonmuscle and smooth muscle isoforms of myosin light chain kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 217(2): 696-703.
- Fleischmann, B.K., Wang, Y.X., Pring, M. & Kotlikoff, M.I. (1996) Voltage-dependent calcium currents and cytosolic calcium in equine airway myocytes. *J Physiol* 492 (Pt 2): 347-58.
- Furukawa, K., Tawada, Y. & Shigekawa, M. (1988) Regulation of the plasma membrane Ca^{2+} pump by cyclic nucleotides in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 263(17): 8058-65.
- Furukawa, K., Tawada, Y. & Shigekawa, M. (1989) Protein kinase C activation stimulates plasma membrane Ca^{2+} pump in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 264(9): 4844-9.
- Ganitkevich, V. & Isenberg, G. (1993) Ca^{2+} entry through $Na(+)$ - Ca^{2+} exchange can trigger Ca^{2+} release from Ca^{2+} stores in $Na(+)$ -loaded guinea-pig coronary myocytes. *J Physiol* 468: 225-43.
- Garthwaite, J., Southam, E., Boulton, C.L., Nielsen, E.B., Schmidt, K. & Mayer, B. (1995) Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazol[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol* 48(2): 184-8
- Gong, M.C., Fujihara, H., Somlyo, A.V. & Somlyo, A.P. (1997) Translocation of rhoA associated with Ca^{2+} sensitization of smooth muscle. *J Biol Chem* 272(16): 10704-9.
- Griendling, K.K., Minieri, C.A., Ollerenshaw, J.D. & Alexander, R.W. (1994) Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74(6): 1141-8.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R.Y. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260(6): 3440-50.

- Hamilton, C.A., Howie, C.A., Jardine E. & Reid, J.L. (1998) Endothelium dependent and independent relaxation of aortic rings from Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits after exposure to free radical generating system. *Free Radic Res* 28(3): 251-7.
- Harrison, D.G. (1997) Endothelial function and oxidant stress. *Clin Cardiol* 20(11 Suppl 2): II-11-7.
- Hartshorne, D.J., Ito, M. & Erdodi, F. (1998) Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J Muscle Res Cell Motil* 19(4): 325-41.
- Herring, B.P. & Smith, A.F. (1996) Telokin expression is mediated by a smooth muscle cell-specific promoter. *Am J Physiol* 270(6 Pt 1): C1656-65.
- Hoggatt, A.M., Simon, G.M. & Herring, B.P. (2002) Cell-specific regulatory modules control expression of genes in vascular and visceral smooth muscle tissues. *Circ Res* 91(12): 1151-9.
- Horman, S., Morel, N., Vertommen, D., Hussain, N., Neumann, D., Beauloye, C., El Najjar, N., Forcet, C., Viollet, B., Walsh, M.P., Hue, L. & Rider, M.H. (2008) AMP-activated protein kinase phosphorylates and desensitizes smooth muscle myosin light chain kinase. *J Biol Chem* 283(27):18505-12.
- Hwa, J.J., Ghibaudi, L., Williams, P. & Chatterjee, M. (1994) Comparison of acetylcholine-dependent relaxation in large and small arteries of rat mesenteric vascular bed. *Am J Physiol* 266(3 Pt 2): H952-8.
- Iizuka, K., Shimizu, Y., Tsukagoshi, H., Yoshii, A., Harada, T., Dobashi, K., Murozono, T., Nakazawa, T. & Mori, M. (2000) Evaluation of Y-27632, a rho-kinase inhibitor, as a bronchodilator in guinea pigs. *Eur J Pharmacol* 406(2): 273-9.
- Isaacson, T.C., Hampl, V., Weir, E.K., Nelson, D.P. & Archer, S.L. (1994) Increased endothelium-derived NO in hypertensive pulmonary circulation of chronically hypoxic rats. *J Appl Physiol* 76(2): 933-40.
- Ishihara, H., Martin, B.L., Brautigan, D.L., Karaki, H., Ozaki, H., Kato, Y., Fusetani, N., Watabe, S., Hashimoto, K., Uemura, D. & et al. (1989) Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 159(3): 871-7.
- Ito, M., Nakano, T., Erdodi, F. & Hartshorne, D.J. (2004) Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Mol Cell Biochem* 259(1-2): 197-209.
- Iwamoto, T., Harada, K., Nakajima, F. & Sukamoto, T. (1992) Effects of ouabain on muscle tension and intracellular Ca²⁺ level in guinea-pig aorta. *Eur J Pharmacol* 224(1): 71-6.
- Jernigan, N.L., Resta, T.C. & Walker, B.R. (2004) Contribution of oxygen radicals to altered NO-dependent pulmonary vasodilation in acute and chronic hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286(5): L947-55.
- Jernigan, N.L., Walker, B.R. & Resta, T.C. (2003) Pulmonary PKG-1 is upregulated following chronic hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285(3): L634-42.

- Jernigan, N.L., Walker, B.R. & Resta, T.C. (2004) Chronic hypoxia augments protein kinase G-mediated Ca²⁺ desensitization in pulmonary vascular smooth muscle through inhibition of RhoA/Rho kinase signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287(6): L1220-9.
- Jin, L., Ying, Z. & Webb, R.C. (2004) Activation of Rho/Rho kinase signaling pathway by reactive oxygen species in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287(4): H1495-500.
- Joyner, W.L., Davis, M.J. & Gilmore, J.P. (1981) Intravascular pressure distribution and dimensional analysis of microvessels in hamsters with renovascular hypertension. *Microvasc Res* 22(2): 190-8.
- Kamm, K.E. & Stull, J.T. (1985) The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 25: 593-620.
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A. & Kaibuchi, K. (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273(5272): 245-8.
- Kimura, T., Sato, K., Malchinkhuu, E., Tomura, H., Tamama, K., Kuwabara, A., Murakami, M. & Okajima, F. (2003) High-density lipoprotein stimulates endothelial cell migration and survival through sphingosine 1-phosphate and its receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(7): 1283-8.
- Kitazawa, T., Gaylinn, B.D., Denney, G.H. & Somlyo, A.P. (1991) G-protein-mediated Ca²⁺ sensitization of smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem* 266(3): 1708-15.
- Kitazawa, T., Kobayashi, S., Horiuti, K., Somlyo, A.V. & Somlyo, A.P. (1989) Receptor-coupled, permeabilized smooth muscle. Role of the phosphatidylinositol cascade, G-proteins, and modulation of the contractile response to Ca²⁺. *J Biol Chem* 264(10): 5339-42.
- Klemke, R.L., Cai, S., Giannini, A.L., Gallagher, P.J., de Lanerolle, P. & Cheresch, D.A. (1997) Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol* 137(2): 481-92.
- Krebs, E.G. & Beavo, J.A. (1979) Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu Rev Biochem* 48: 923-59.
- Kuriyama, H., Kitamura, K. & Nabata, H. (1995) Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. *Pharmacol Rev* 47(3): 387-573.
- Kusama, N., Kajikuri J., Yamamoto, T., Watanabe, Y., Suzuki, Y. Katsuya, H. & Itoh, T. (2005) Reduced hyperpolarization in endothelial cells of rabbit aortic valve following chronic nitroglycerine administration. *Br J Pharmacol* 146(4): 487-97
- Lang R.J. & Watson, M.J. (1998) Effects of nitric oxide donors, s-nitroso-L-cysteine and sodium nitroprusside, on the whole-cell and single channel currents in single myocytes of the guinea-pig proximal colon. *Br J Pharmacol* 123(3): 505-17
- Laursen, J.B., Somers, M., Kurz, S., McCann, L., Warnholtz, A., Freeman, B.A., Tarpey, M., Fukai, T. & Harrison, D.G. (2001) Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 103(9): 1282-8.

- Le Cras, T.D., Xue, C., Rengasamy, A. & Johns, R.A. (1996) Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung. *Am J Physiol* 270(1 Pt 1): L164-70.
- Le Stunff, H., Mikami, A., Giussani, P., Hobson, J.P., Jolly, P.S., Milstien, S. & Spiegel, S. (2004) Role of sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 in epidermal growth factor-induced chemotaxis. *J Biol Chem* 279(33): 34290-7.
- Levkau, B., Hermann, S., Theilmeyer, G., van der Giet, M., Chun, J., Schober, O. & Schafers, M. (2004) High-density lipoprotein stimulates myocardial perfusion in vivo. *Circulation* 110(21): 3355-9.
- Mabuchi, K., Gong, B.J., Langsetmo, K., Ito, M., Nakano, T. & Tao, T. (1999) Isoforms of the small non-catalytic subunit of smooth muscle myosin light chain phosphatase. *Biochim Biophys Acta* 1434(2): 296-303.
- MacDonald, J.A., Borman, M.A., Muranyi, A., Somlyo, A.V., Hartshorne, D.J. & Haystead, T.A. (2001) Identification of the endogenous smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(5): 2419-24.
- Meininger, G.A., Zawieja, D.C., Falcone, J.C., Hill, M.A. & Davey, J.P. (1991) Calcium measurement in isolated arterioles during myogenic and agonist stimulation. *Am J Physiol* 261(3 Pt 2): H950-9.
- Minor, R.L., Jr., Myers, P.R., Guerra, R., Jr., Bates, J.N. & Harrison, D.G. (1990) Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. *J Clin Invest* 86(6): 2109-16.
- Mitsui, T., Inagaki, M. & Ikebe, M. (1992) Purification and characterization of smooth muscle myosin-associated phosphatase from chicken gizzards. *J Biol Chem* 267(23): 16727-35.
- Misra H.P. (1984) Inhibition of superoxide dismutase by nitroprusside and electron spin resonance observations on the formation of a superoxide-mediated nitroprusside nitroxyl free radical. *J Biol Chem* 259(20): 12678-84
- Morrison, D.L., Sanghera, J.S., Stewart, J., Sutherland, C., Walsh, M.P. & Pelech, S.L. (1996) Phosphorylation and activation of smooth muscle myosin light chain kinase by MAP kinase and cyclin-dependent kinase-1. *Biochem Cell Biol* 74(4): 549-57.
- Motulsky, H.J. & Ransnas, L.A. (1987) Fitting curves to data using nonlinear regression: a practical and nonmathematical review. *Faseb J* 1(5): 365-74.
- Mugge, A., Elwell, J.H., Peterson, T.E., Hofmeyer, T.G., Heistad, D.D. & Harrison, D.G. (1991) Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. *Circ Res* 69(5): 1293-300.
- Mukai, Y., Shimokawa, H., Matoba, T., Kandabashi, T., Satoh, S., Hiroki, J., Kaibuchi, K. & Takeshita, A. (2001) Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease: a novel therapeutic target in hypertension. *Faseb J* 15(6): 1062-4.

- Mulvany, M.J., Persson, A.E. & Andresen, J. (1991) No persistent effect of angiotensin converting enzyme inhibitor treatment in Milan hypertensive rats despite regression of vascular structure. *J Hypertens* 9(7): 589-93.
- Nagao, T., Illiano, S. & Vanhoutte, P.M. (1992) Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to NG-nitro-L-arginine in rats. *Am J Physiol* 263(4 Pt 2): H1090-4.
- Nagao, T. & Vanhoutte, P.M. (1993) Endothelium-derived hyperpolarizing factor and endothelium-dependent relaxations. *Am J Respir Cell Mol Biol* 8(1): 1-6.
- Nakamura, M., Ichikawa, K., Ito, M., Yamamori, B., Okinaka, T., Isaka, N., Yoshida, Y., Fujita, S. & Nakano, T. (1999) Effects of the phosphorylation of myosin phosphatase by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Cell Signal* 11(9): 671-6.
- Nakazono, K., Watanabe, N., Matsuno, K., Sasaki, J., Sato, T. & Inoue, M. (1991) Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(22): 10045-8.
- Nelson, M.T., Standen, N.B., Brayden, J.E. & Worley, J.F., 3rd (1988) Noradrenaline contracts arteries by activating voltage-dependent calcium channels. *Nature* 336(6197): 382-5.
- Nieznanski, K. & Sobieszek, A. (1997) Telokin (kinase-related protein) modulates the oligomeric state of smooth-muscle myosin light-chain kinase and its interaction with myosin filaments. *Biochem J* 322 (Pt 1): 65-71.
- Nishimura, J. & van Breemen, C. (1989) Direct regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers. *Biochem Biophys Res Commun* 163(2): 929-35.
- Nofer, J.R., van der Giet, M., Tolle, M., Wolinska, I., von Wnuck Lipinski, K., Baba, H.A., Tietge, U.J., Godecke, A., Ishii, I., Kleuser, B., Schafers, M., Fobker, M., Zidek, W., Assmann, G., Chun, J. & Levkau, B. (2004) HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest* 113(4): 569-81.
- Okubo, S., Ito, M., Ichikawa, K., Konishi, T., Nakano, T., Kawamura, T. & Hartshorne, D.J. (1992) Smooth muscle myosin light chain phosphatase. *Jpn J Pharmacol* 58 Suppl 2: 267P.
- Okubo, S., Ito, M., Takashiba, Y., Ichikawa, K., Miyahara, M., Shimizu, H., Konishi, T., Shima, H., Nagao, M., Hartshorne, D.J. & et al. (1994) A regulatory subunit of smooth muscle myosin bound phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* 200(1): 429-34.
- Olivera, A., Romanowski, A., Rani, C.S. & Spiegel, S. (1997) Differential effects of sphingomyelinase and cell-permeable ceramide analogs on proliferation of Swiss 3T3 fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1348(3): 311-23.
- Ozaki, H., Karaki, H. & Urakawa, N. (1978) Possible role of Na-Ca exchange mechanism in the contractions induced in guinea-pig aorta by potassium free solution and ouabain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 304(3): 203-9.
- Putney, J.W., Jr. (1990) Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 11(10): 611-24.
- Pyne, S. & Pyne, N. (2000) Sphingosine 1-phosphate signalling via the endothelial differentiation gene family of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 88(2): 115-31.

- Pyne, S. & Pyne, N.J. (2000) Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem J* 349(Pt 2): 385-402.
- Pyne, S. & Pyne, N.J. (2002) Sphingosine 1-phosphate signalling and termination at lipid phosphate receptors. *Biochim Biophys Acta* 1582(1-3): 121-31.
- Raeymaekers, L., Wuytack, F. & Casteels, R. (1985) Subcellular fractionation of pig stomach smooth muscle. A study of the distribution of the (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase activity in plasmalemma and endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 815(3): 441-54.
- Resta, T.C. & Walker, B.R. (1996) Chronic hypoxia selectively augments endothelium-dependent pulmonary arterial vasodilation. *Am J Physiol* 270(3 Pt 2): H888-96.
- Salomone, S., Yoshimura, S., Reuter, U., Foley, M., Thomas, S.S., Moskowitz, M.A. & Waeber, C. (2003) S1P3 receptors mediate the potent constriction of cerebral arteries by sphingosine-1-phosphate. *Eur J Pharmacol* 469(1-3): 125-34.
- Sasaki, Y., Suzuki, M. & Hidaka, H. (2002) The novel and specific Rho-kinase inhibitor (S)-(+)-2-methyl-1-[(4-methyl-5-isoquinoline)sulfonyl]-homopiperazine as a probing molecule for Rho-kinase-involved pathway. *Pharmacol Ther* 93(2-3): 225-32.
- Sato, M., Tani, E., Fujikawa, H. & Kaibuchi, K. (2000) Involvement of Rho-kinase-mediated phosphorylation of myosin light chain in enhancement of cerebral vasospasm. *Circ Res* 87(3): 195-200.
- Sauzeau, V., Le Jeune, H., Cario-Toumaniantz, C., Smolenski, A., Lohmann, S.M., Bertoglio, J., Chardin, P., Pacaud, P. & Loirand, G. (2000) Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 275(28): 21722-9.
- Seasholtz, T.M., Zhang, T., Morissette, M.R., Howes, A.L., Yang, A.H. & Brown, J.H. (2001) Increased expression and activity of RhoA are associated with increased DNA synthesis and reduced p27(Kip1) expression in the vasculature of hypertensive rats. *Circ Res* 89(6): 488-95.
- Seko, T., Ito, M., Kureishi, Y., Okamoto, R., Moriki, N., Onishi, K., Isaka, N., Hartshorne, D.J. & Nakano, T. (2003) Activation of RhoA and inhibition of myosin phosphatase as important components in hypertension in vascular smooth muscle. *Circ Res* 92(4): 411-8.
- Shin, H.M., Je, H.D., Gallant, C., Tao, T.C., Hartshorne, D.J., Ito, M. & Morgan, K.G. (2002) Differential association and localization of myosin phosphatase subunits during agonist-induced signal transduction in smooth muscle. *Circ Res* 90(5): 546-53.
- Silver, D.L., Vorotnikov, A.V., Watterson, D.M., Shirinsky, V.P. & Sellers, J.R. (1997) Sites of interaction between kinase-related protein and smooth muscle myosin. *J Biol Chem* 272(40): 25353-9.
- Smith, A.F., Bigsby, R.M., Word, R.A. & Herring, B.P. (1998) A 310-bp minimal promoter mediates smooth muscle cell-specific expression of telokin. *Am J Physiol* 274(5 Pt 1): C1188-95; discussion C7.

- Soloviev, A., Lehen'kyi, V., Zelensky, S. & Hellstrand, P. (2004) Nitric oxide relaxes rat tail artery smooth muscle by cyclic GMP-independent decrease in calcium sensitivity of myofilaments. *Cell Calcium* 36(2): 165-73.
- Somlyo, A.P. & Somlyo, A.V. (2003) Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 83(4): 1325-58.
- Somlyo, A.V. & Somlyo, A.P. (1968) Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 159(1): 129-45.
- Spiegel, S. & Milstien, S. (2002) Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *J Biol Chem* 277(29): 25851-4.
- Spiegel, S., Olivera, A., Zhang, H., Thompson, E.W., Su, Y. & Berger, A. (1994) Sphingosine-1-phosphate, a novel second messenger involved in cell growth regulation and signal transduction, affects growth and invasiveness of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 31(2-3): 337-48.
- Surks, H.K., Mochizuki, N., Kasai, Y., Georgescu, S.P., Tang, K.M., Ito, M., Lincoln, T.M. & Mendelsohn, M.E. (1999) Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase I α . *Science* 286(5444): 1583-7.
- Suzuki, H., Swei, A., Zweifach, B.W. & Schmid-Schonbein, G.W. (1995) In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hydroethidine microfluorography. *Hypertension* 25(5): 1083-9.
- Sward, K., Dreja, K., Susnjar, M., Hellstrand, P., Hartshorne, D.J. & Walsh, M.P. (2000) Inhibition of Rho-associated kinase blocks agonist-induced Ca²⁺ sensitization of myosin phosphorylation and force in guinea-pig ileum. *J Physiol* 522 Pt 1: 33-49.
- Takuwa, Y., Okamoto, H., Takuwa, N., Gonda, K., Sugimoto, N. & Sakurada, S. (2001) Subtype-specific, differential activities of the EDG family receptors for sphingosine-1-phosphate, a novel lysophospholipid mediator. *Mol Cell Endocrinol* 177(1-2): 3-11.
- Tang, T., Connelly, B.A. & Joyner, W.L. (1995) Heterogeneity of endothelial cell function for angiotensin conversion in serial-arranged arterioles. *J Vasc Res* 32(2): 129-37.
- Tang, T. & Joyner, W.L. (1992) Differential role of endothelial function on vasodilator responses in series-arranged arterioles. *Microvasc Res* 44(1): 61-72.
- Thomson, L., Trujillo, M., Telleri, R. & Radi, R. (1995) Kinetics of cytochrome c²⁺ oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems. *Arch Biochem Biophys* 319(2): 491-7.
- Torrecillas, G., Diez-Marques, M.L., Garcia-Escribano, C., Bosch, R.J., Rodriguez-Puyol, D. & Rodriguez-Puyol, M. (2000) Mechanisms of cGMP-dependent mesangial-cell relaxation: a role for myosin light-chain phosphatase activation. *Biochem J* 346 Pt 1: 217-22.
- Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M. & Narumiya, S. (1997) Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 389(6654): 990-4.

Verin, A.D., Gilbert-McClain, L.I., Patterson, C.E. & Garcia, J.G. (1998) Biochemical regulation of the nonmuscle myosin light chain kinase isoform in bovine endothelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19(5): 767-76.

Verin, A.D., Lazar, V., Torry, R.J., Labarrere, C.A., Patterson, C.E. & Garcia, J.G. (1998) Expression of a novel high molecular-weight myosin light chain kinase in endothelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19(5): 758-66.

Vogalis, F., Publicover, N.G., Hume, J.R. & Sanders, K.M. (1991) Relationship between calcium current and cytosolic calcium in canine gastric smooth muscle cells. *Am J Physiol* 260(5 Pt 1): C1012-8.

Vogalis, F., Publicover, N.G. & Sanders, K.M. (1992) Regulation of calcium current by voltage and cytoplasmic calcium in canine gastric smooth muscle. *Am J Physiol* 262(3 Pt 1): C691-700.

Vouret-Craviari, V., Bourcier, C., Boulter, E. & van Obberghen-Schilling, E. (2002) Distinct signals via Rho GTPases and Src drive shape changes by thrombin and sphingosine-1-phosphate in endothelial cells. *J Cell Sci* 115(Pt 12): 2475-84.

Wang, H., Eto, M., Steers, W.D., Somlyo, A.P. & Somlyo, A.V. (2002) RhoA-mediated Ca²⁺ sensitization in erectile function. *J Biol Chem* 277(34): 30614-21.

Watson, M.J., Bywater, R.A., Taylor, G.S. & Lang, R.J. (1996) Effects of nitric oxide (NO) and NO donors on the membrane conductance of circular smooth muscle cells of the guinea-pig proximal colon. *Br J Pharmacol* 118(7): 1605-14

Wells, C.D., Gutowski, S., Bollag, G. & Sternweis, P.C. (2001) Identification of potential mechanisms for regulation of p115 RhoGEF through analysis of endogenous and mutant forms of the exchange factor. *J Biol Chem* 276(31): 28897-905.

Wu, X., Haystead, T.A., Nakamoto, R.K., Somlyo, A.V. & Somlyo, A.P. (1998) Acceleration of myosin light chain dephosphorylation and relaxation of smooth muscle by telokin. Synergism with cyclic nucleotide-activated kinase. *J Biol Chem* 273(18): 11362-9.

Wu, X., Somlyo, A.V. & Somlyo, A.P. (1996) Cyclic GMP-dependent stimulation reverses G-protein-coupled inhibition of smooth muscle myosin light chain phosphate. *Biochem Biophys Res Commun* 220(3): 658-63.

Wuytack, F., Raeymaekers, L., De Schutter, G. & Casteels, R. (1982) Demonstration of the phosphorylated intermediates of the Ca²⁺-transport ATPase in a microsomal fraction and in a (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase purified from smooth muscle by means of calmodulin affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta* 693(1): 45-52.

Yoshida, Y., Sun, H.T., Cai, J.Q. & Imai, S. (1991) Cyclic GMP-dependent protein kinase stimulates the plasma membrane Ca²⁺ pump ATPase of vascular smooth muscle via phosphorylation of a 240-kDa protein. *J Biol Chem* 266(29): 19819-25.

Zhang, H., Desai, N.N., Olivera, A., Seki, T., Brooker, G. & Spiegel, S. (1991) Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *J Cell Biol* 114(1): 155-67.

Zucchi, R. & Ronca-Testoni, S. (1997) The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol Rev* 49(1): 1-51.

8. Danksagung

Ich möchte meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Pohl, dafür danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, an seinem Lehrstuhl zu promovieren. Sowohl seine fachliche Kompetenz, als auch seine menschliche Seite waren mir während der gesamten Dauer der Promotion stets eine Hilfe und Stütze. Professor Pohl verdanke ich eine außergewöhnliche Lernzeit an seinem Institut, die für immer prägend und mir noch lange nach Beendigung dieser Dissertation in vielen Bereichen meines Lebens hilfreich sein wird.

gilt mein besonderer Dank meinem Betreuer, Herrn PD Dr. med. Steffen-Sebastian Bolz, ohne dessen umfassende Unterstützung über den gesamten Zeitraum meiner Zeit als Doktorand am Institut für kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie im Walter-Brendel-Zentrum diese Arbeit in dieser Form nie gelungen wäre. Auf seinen fachlichen wie auch persönlichen Rat konnte und kann ich mich auch über die Belange dieser Doktorarbeit hinaus stets verlassen.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, Elisabeth Sollinger-Fiuza und Martinho Fiuza sowie meinen Freunden Lukas Vogel, Stefan Paul und Daniel Noß, ohne deren Unterstützung, Aufmunterung und Diskussion über die gesamte Dauer meiner Ausbildung diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

9. Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Daniel Florian Sollinger
Geburtsdatum/ Ort	02.05.1976/ Ravensburg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

10/2004	Approbation als Arzt
04/2004	3. Staatsexamen in Medizin und Erlangung der Teilapprobation als Arzt
11/1997 - 04/2004	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
06/1996	Abitur am Ludwigsgymnasium in München

Auslandsaufenthalte sowie sonstige Tätigkeiten und Kenntnisse

- Aufenthalt an der Hillsdale High School in Hillsdale, Michigan, USA im Rahmen eines Schüleraustausches (08/1992 - 07/1993)
- Praktisches Jahr, Universitätsklinikum Edgar Santos der Universidade Federal Bahia, Salvador, Brasilien (08/2003-11/2003)
- Sprachen: Englisch und Portugiesisch sehr gut, Französisch gut
- Hobbies: Reisen, Literatur, Kunst und Sport
- Computerkenntnisse: Allgemeine Anwenderkenntnisse, MS Office, SPSS, Stata

Berufserfahrung

07/2009 - heute	Klinikum Augustinum, München, Assistenzarzt Innere Medizin
10/2007 - 06/2009	Klinikum rechts der Isar, II. Medizinische Klinik, Abteilung für Nephrologie, München, Assistenzarzt Innere Medizin
10/2005 - 09/2007	Inselspital, Department für Innere Medizin, Bern, Schweiz, Assistenzarzt Innere Medizin
10/2004 - 09/2005	Inselspital, Department für Dermatologie, Urologie, Rheumatologie und Nephrologie, Bern, Schweiz, wissenschaftlicher Assistent