

Aus dem Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Institut für Kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie
Vorstand: Professor Dr. med. Ulrich Pohl

Thema der Dissertation

„Einfluss der Sphingosin-1-Phosphat Phosphohydrolase 1 (SPP1) und
modulatorischer Veränderungen der Sphingosinkinase 1 (Sk1) Aktivität
auf den mikrovaskulären Tonus von isolierten Widerstandsarterien“.

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

vorgelegt von

Bernhard Friedrich Décard geb. Peter

aus

Hannover

Jahr

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. Ulrich Pohl

2. Berichtererstatter: Professor Dr. Claus J. Mayer

Mitberichterstatter: PD Dr. Bruno Luckow
PD Dr. Stefan Lichtenthaler
PD Dr. Heiko Methe

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Steffen-Sebastian Bolz

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 14.01.2010

Mein Dank gilt PD Dr. med. Steffen-Sebastian Bolz
und Professor Dr. med Ulrich Pohl für ihre intensive Betreuung.

Für ihre unermüdliche Unterstützung danke ich meiner Frau Florence
und meinen Eltern Waltraud und Hans-Hartmut Peter.

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	8
1.1	Bedeutung der Hypertonie	8
1.2	Regulation des arteriellen Blutdrucks.....	8
1.3	Calciumabhängige Regulationsmechanismen der vaskulären glatten Muskelzellen in Widerstandsarterien	10
1.4	Calciumunabhängige Regulationsmechanismen der vaskulären glatten Muskelzellen in Widerstandsarterien	11
1.5	Sphingosin-1-Phosphat, ein Sphingolipid mit pleiotropen Effekten	13
1.6	Hypothesen der vorliegenden Arbeit.....	20
2.	MATERIALIEN	22
2.1	Versuchstiere	22
2.2	Präparat	22
2.3	Versuchsaufbau	22
2.4	Lösungen und Pharmaka	24
2.5	Hersteller der für die Puffer und das Kulturmedium verwendeten Substanzen	27
2.6	Sonstige verwendete Substanzen.....	27
3.	METHODEN	30
3.1	Präparation von arteriellen Widerstandsgefäßen	30
3.2	Kanülierung von isolierten Widerstandsgefäßen.....	31
3.3	Kultivierung und Transfektion von isolierten Widerstandsgefäßen.....	33
3.4	Inkubation der glatten Muskelzellen mit FURA 2-Acetoxymethylester (AM)34	
3.5	Mikroskop und Versuchsaufbau.....	34

3.6	Fluoreszenzmikroskopie	35
3.7	FURA 2-Acetoxy-methylester (AM) Methode	36
3.8	Messung des Calciumsignals.....	37
3.9	Durchmesserregistrierung.....	39
3.10	mRNA Isolierung aus Widerstandsgefäßen	40
3.11	Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	40
3.12	Nachweis der RT-PCR Produkte durch Gelelektrophorese	42
3.13	Immunfluoreszenz und konfokale Mikroskopie	43
3.14	Überprüfung der Funktionalität und Transfektionsrate von isolierten Widerstandsgefäßen.....	44
3.15	Experimentelle Ansätze und Methoden zur Bearbeitung der gestellten Hypothesen.....	45
3.16	Statistik	47
4.	ERGEBNISSE	50
4.1	Bedeutung der SPP1 in der Tonusregulierung von Widerstandsarterien....	51
4.1.1	Expression von SPP1 in Widerstandsgefäßen des Hamsters	51
4.1.2	Effekte von SPP1 auf den Ruhetonus	52
4.1.3	Effekte von SPP1 auf die intrazellulären Ruhecalciumspiegel von VSMC in isolierten Widerstandsarterien.	54
4.1.4	SPP1 und Calciumsensitivität in VSMC.....	55
4.1.5	Effekte der SPP1 auf die myogene Vasokonstriktion.....	56
4.1.6	SPP1 moduliert Effekte von exogen appliziertem S1P	58
4.1.7	Kontrollexperimente mit der phosphataseinaktiven Mutante SPP1 ^{H208A}	59
4.1.8	Immunhistochemische Lokalisation der SPP1	61

4.2	Bedeutung der Serin 225 Phosphorylierung der Sphingosinkinase 1 in glatten Muskelzellen für ihre biologische Wirkung in Widerstandsarterien..	62
4.2.1	Auswirkungen einer Ausschaltung der Serin 225 Phosphorylierbarkeit auf die Translokation der Sphingosinkinase an die Zellmembran.....	62
4.2.2	Funktionelle Effekte der Sk ^{S225A} auf den Ruhetonus und die basale Calciumkonzentration in Widerstandsarterien	64
4.2.3	Einfluss der Sk ^{S225A} auf die Calciumsensitivität	65
4.2.4	Bedeutung der Serin 225 Phosphorylierung und der Translokation der Sphingosinkinase 1 für die myogene Vasokonstriktion.....	67
4.2.5	Funktionelle Effekte einer membranfixierten, nicht phosphorylierbaren Sphingosinkinase Mutante (mp-Sk ^{S225A}) in Widerstandsarterien.....	67
4.2.6	Funktionelle Effekte einer membranfixierten, <i>wild-type</i> Sphingosinkinase (mp-Sk ^{wt}) in Widerstandsarterien.....	68
4.2.7	Grafische Zusammenfassung der Effekte auf die druckinduzierte myogene Vasokonstriktion von Widerstandsarterien nach Behandlung mit unterschiedlichen Sphingosinkinase Mutanten. .	70
4.2.8	Grafische Zusammenfassung der funktionellen Effekte der mp-Sk ^{S225A} und der mp-Sk ^{wt} Mutanten in Widerstandsarterien.....	71
4.2.9	Funktionelle Effekte des MEK Inhibitors PD98059	73
5.	DISKUSSION.....	76
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	99
7.	IM TEXT VERWENDETE ABKÜRZUNGEN.....	102

8.	ANHANG	104
9.	LITERATURVERZEICHNIS.....	106
	CURRICULUM VITAE	119

1. Einleitung

1.1 Bedeutung der Hypertonie

Herz-Kreislauf Erkrankungen gehören in den westlichen Industrienationen zu den häufigsten Todesursachen und stellen unter gesellschaftlich-ökonomischen Gesichtspunkten eine erhebliche Belastung für die Gesundheitssysteme dar (Levenson *et al.*, 2002). Neben einigen anderen Risikofaktoren wie Diabetes, Nikotinabusus und pathologischem Lipidstatus gilt der Hypertonus als pathogenetisch entscheidender Faktor für die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen (koronare Herzerkrankung (KHK), Arteriosklerose, cerebrale Ischämie und intracerebrale Blutung). 90% der Fälle müssen mit der Diagnose „essentieller“ bzw. „primärer“ Hypertonus versehen werden, da ein Verständnis der Ätiologie und Pathogenese fehlt. Folglich können diese Patienten bisher auch nur symptomatisch behandelt werden. Weitere Forschung für ein genaueres Verständnis der Entstehung eines pathologisch erhöhten Blutdrucks ist daher eine zwingende Voraussetzung für die Entwicklung neuer medikamentöser Therapieansätze zur kausalen Behandlung der Hypertonie.

1.2 Regulation des arteriellen Blutdrucks

Dem Organismus stehen im Wesentlichen zwei Stellgrößen für die Regulierung des arteriellen Blutdrucks (AB) zur Verfügung: das Herzzeitvolumen (HZV) und der durch die Gesamtheit der Blutgefäße generierte totale periphere Widerstand (TPR). Das Produkt dieser beiden Größen bestimmt in Analogie zum Ohm'schen Gesetz $AB = HZV \times TPR$ die Höhe des arteriellen Blutdrucks (AB). An der Entstehung des TPR sind die verschiedenen Abschnitte des Gefäßsystems in unterschiedlichem Maße beteiligt. So tragen beispielsweise die Aorta und die nachgeschalteten großen

1. Einleitung

Arterien nur ca. 19%, das Kapillarbett 25% und das venöse System etwa 7% zum Aufbau des TPR bei. Den mit ca. 50% weitaus größten Beitrag leisten die dem Kapillarbett vorgeschalteten Arteriolen und kleinen Arterien (engl. resistance arteries; RA), die deshalb auch Widerstandsgefäße genannt werden. Die zirkulär um das Lumen der Blutgefäße angeordneten glatten Muskelzellen (engl. vascular smooth muscle cell; VSMC) können durch Kontraktion oder Erschlaffung den Durchmesser des Gefäßes aktiv beeinflussen. Wesentlich für den ausgeprägten Einfluss der Widerstandsgefäße auf den TPR sind das annähernd ausgeglichene Wanddicken / Radius Verhältnis ($\approx 1:1$) sowie die im Vergleich zu Kapillaren wesentlich geringere Anzahl und damit geringere „Parallelschaltung“ dieser Gefäße. Hierdurch haben bereits kleine Änderungen des Kontraktionszustands der VSMC einen verhältnismäßig großen Einfluss auf den Strömungswiderstand im einzelnen Gefäß und in der Summe aller Gefäße auf den TPR. Durch Radiusänderungen der RA kann überdies die Durchblutung des nachgeschalteten Kapillarbetts effektiv kontrolliert und der jeweiligen Stoffwechsellage angepasst werden. Unter Berücksichtigung des Gesetzes von Hagen – Poiseuille wird deutlich, dass der Radius eines Widerstandsgefäßes entscheidend den Blutfluss durch das Gefäß bestimmt:

$$I = r_i^4 \pi \Delta P / 8 \eta l.$$

Unter Zuhilfenahme des Ohm'schen Gesetzes ($R = \Delta P / I$) lässt sich die Gleichung umformen, um so hieraus den Strömungswiderstand zu bestimmen:

$$R = 8 \eta l / r_i^4 \pi.$$

Stromstärke und Widerstand ändern sich demnach direkt bzw. umgekehrt proportional zur vierten Potenz des Gefäßradius. Aus diesen Überlegungen wird deutlich, dass ein genaues Verständnis der Mechanismen, die zu einer Änderung des Gefäßradius in RA führen, Hinweise auf die Entstehung von Hypertonusformen

und deren kausale Therapie geben könnten. Unter Berücksichtigung dieser Bedeutung der RA im Rahmen der Blutdruckregulierung hat unsere Arbeitsgruppe konsequent alle Befunde an isolierten RA des Hamsters erhoben, um so Kontraktionsmechanismen in den für den Gefäßwiderstand relevanten Gefäßen zu untersuchen.

1.3 Calciumabhängige Regulationsmechanismen der vaskulären glatten Muskelzellen in Widerstandsarterien

Eine Änderung des Radius entsteht durch Kontraktion oder Relaxation der zirkulär um das Gefäßlumen angeordneten vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC). Der Tonus einer RA wird aus einem komplexen Zusammenspiel von endothelialen und glattmuskulären Signalen sowie humoralen Faktoren bestimmt (Sparks, 1980).

Bisher wurden an Leitungsgefäßen bzw. Zellkulturen vorrangig calciumabhängige Kontraktions- und Relaxationsmechanismen in VSMC beschrieben (Cornwell & Lincoln, 1989; Morgan *et al.*, 1989; Moreland *et al.*, 1991). Eine Kontraktion tritt auf, wenn es in Folge einer von Agonisten und deren „second messengern“ (z.B. Inositoltriphosphat (IP₃)) ausgelösten Freisetzung von Calcium aus den intrazellulären Speichern und / oder Einstrom von Calcium über spannungsabhängige Kanäle zu einer Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels kommt (Volpe *et al.*, 1985; Hashimoto *et al.*, 1985). In der Folge bindet Calmodulin dieses Calcium (Bildung eines (Ca²⁺)₄ CAM-Komplexes) und führt zu einer allosterischen Aktivierung der Myosinleichtkettenkinase (engl. myosin light chain kinase, MLCK) (Blumenthal & Stull, 1980; Sobieszek, 1991; Stull *et al.*, 1998). Die aktivierte MLCK phosphoryliert dann eine der leichten Ketten des Myosins (engl. myosin light chain 20; MLC20) am Serin 19 und ermöglicht so die Interaktion

1. Einleitung

zwischen dem Myosin und Aktinfilament (Sweeney *et al.*, 1994). Erst in diesem aktivierten Zustand der MLC20 kann eine Kraftentwicklung durch Querbrückenbildung zwischen Myosin und Aktin erfolgen (Ishikawa & Hidaka, 1990; Trybus *et al.*, 1994). Eine Relaxation des glatten Muskels wird durch einen Abfall der intrazellulären Calciumkonzentration eingeleitet. Eine Verringerung des intrazellulären freien Calciums resultiert beispielsweise, wenn als Folge hoher Nukleotidspiegel (cAMP und/oder cGMP) Calcium ATP-abhängig in das sarkoplasmatische Retikulum zurückgepumpt oder durch Calciumpumpen der Zellmembran bzw. den Natrium-Calcium Austauscher in den Extrazellulärraum befördert wird. Bedingt durch sinkende Calciumspiegel wird die MLCK gehemmt, und die an die MLC20 des Myosins angehängten Phosphatgruppen werden durch die konstitutiv aktive Myosinleichtkettenphosphatase (engl. myosin light chain Phosphatase, MLCP) wieder dephosphoryliert (Takuwa, 1996; Driska *et al.*, 1989; Alessi *et al.*, 1992; Gong *et al.*, 1992; Shirazi *et al.*, 1994).

1.4 Calciumunabhängige Regulationsmechanismen der vaskulären glatten Muskelzellen in Widerstandsarterien

Neuere Erkenntnisse weisen jedoch darauf hin, dass der Tonus der glatten Muskulatur nicht ausschließlich von der intrazellulären Calciumkonzentration bestimmt wird, sondern dass auch calciumunabhängige Parameter an der Tonusregulierung beteiligt sind (Kitazawa *et al.*, 1991; Bolz *et al.*, 1998; Yokoyama & Henry, 1979; Himpens *et al.*, 1990; Himpens *et al.*, 1989; Somlyo *et al.*, 1989; Kitazawa & Somlyo, 1990). Wie bereits dargelegt, hängt der Kontraktionszustand einer glatten Muskelzelle weitgehend vom Ausmaß der Myosinphosphorylierung ab. Dabei verharrt der glatte Muskel meist in einem intermediären Spannungs- und

1. Einleitung

Phosphorylierungszustand des Myosins, denn phosphorylierende und dephosphorylierende Prozesse sind in Ruhe in einem dynamischen Gleichgewicht ausbalanciert. Im Gegensatz zu der bisherigen Annahme, der Kontraktionszustand der glatten Muskulatur sei primär über die Achse Calcium/Calmodulin/MLCK, und damit strikt calciumabhängig reguliert, kann das Verhältnis der Aktivität von MLCK/MLCP auch „calciumunabhängig“ beeinflusst werden. Diese „calciumunabhängige“ Regulation des Phosphorylierungszustands der MLC20 über eine Modulation der MLCP-Aktivität bedeutet letztendlich, dass die Umsetzung eines gegebenen Calciumsignals in einer glatten Muskelzelle in Kontraktion direkt von der Aktivität der MLCP abhängt. Dieses Konzept weist also der Phosphatase eine wesentliche Funktion bei der Kontrolle der Calciumsensitivität des kontraktilen Apparates zu (Somlyo & Somlyo, 2003; Somlyo *et al.*, 1989). Wird beispielsweise die MLCP gehemmt, so kommt es zu einem erhöhten Phosphorylierungszustand der MLC20. Dies hat zur Folge, dass die glatten Muskelzellen schon bei einer viel geringeren intrazellulären Calciumkonzentration kontrahieren als dies bei ungehemmter MLCP der Fall wäre. Dieser Prozess wird als Calciumsensitivierung bezeichnet (Himpens *et al.*, 1990; Kitazawa *et al.*, 1991; Somlyo *et al.*, 1989). Kommt es hingegen zu einer Aktivierung der MLCP, hat dies selbst bei konstant gehaltenen Calciumspiegeln eine schwächere Kontraktion zur Folge. Man spricht in diesem Fall von einer Calciumdesensitivierung. (Himpens *et al.*, 1989)

Calciumunabhängige, tonusmodulierende Effekte in RA sind unter anderem für die kleine GTPase RhoA nachgewiesen worden (Sauzeau *et al.*, 2000; Bolz *et al.*, 2003a; Bolz *et al.*, 2000c). RhoA beeinflusst die Calciumsensitivität des kontraktilen Apparates durch Aktivierung der Rhokinase (ROK) (Ishizaki *et al.*, 1997; Ishizaki *et al.*, 1996; Fujisawa *et al.*, 1996) und vermutlich einer weiteren „zip-like MLCP-

associated kinase“ (MacDonald *et al.*, 2001) und führt so zu einer Inhibition der MLCP.

Die auch therapeutisch genutzten vasodilatatorischen Effekte von NO beruhen in größeren Leitungsgefäßen unter anderem auf einer Senkung der intrazellulären Calciumkonzentration. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass im Unterschied zu der Wirkung an Leitungsgefäßen NO in Widerstandsarterien des Hamsters auch calciumunabhängige Mechanismen aktiviert. Wir konnten nachweisen, dass es durch NO über cGMP zu einer Aktivierung der MLCP kommt und somit die Dilatation in Widerstandsgefäßen im Wesentlichen auf calciumdesensitivierenden Effekten beruht. Diese Wirkung konnte durch den RhoA/Rhokinase-Signalweg antagonisiert und anschließend wieder mit dem ROK Inhibitor Y27632 hergestellt werden (Bolz *et al.*, 2003b). Die tonusregulierende Potenz von RhoA/Rhokinase in RA legt den Verdacht nahe, dass dieser Mechanismus auch einen Einfluss auf die Kontrolle des systemischen Blutdrucks hat. Uehata *et al.* konnten dies bereits *in vivo* im Tiermodell bestätigen, indem sich bei drei pathogenetisch unterschiedlichen Hypertonusformen der Blutdruck der Tiere nach Behandlung mit dem chemischen Rhokinaseinhibitor Y27632 normalisierte (Uehata *et al.*, 1997). Diese potentiell pathophysiologische Bedeutung des RhoA/Rhokinase-Signalweges im Rahmen der Kontrolle des mikrovaskulären Tonus und der Entstehung von Hypertonusformen wirft die Frage nach ihrer physiologischen Regulierung auf.

1.5 Sphingosin-1-Phosphat, ein Sphingolipid mit pleiotropen Effekten

Für den endogenen Sphingolipidbotenstoff Sphingosin-1-Phosphat (S1P) konnte eine tonusregulierende Potenz durch Aktivierung des RhoA/Rhokinase-Signalweges gezeigt werden (Bolz *et al.*, 2003a; Dantas *et al.*, 2003; Ohmori *et al.*, 2003).

1. Einleitung

Weiterhin konnten wir nachweisen, dass exogen appliziertes S1P ein hochpotenter, primär „calciumunabhängig“ wirksamer Vasokonstriktor an isolierten RA ist.

S1P gehört zu den Sphingolipiden, deren Grundgerüst aus Ceramid besteht. Ceramid kann sowohl aus Serin und Palmitoyl-CoA *de novo* synthetisiert als auch aus dem Membranlipid Sphingomyelin abgespalten werden (Hannun *et al.*, 2001; Levade *et al.*, 1999). Nach Phosphorylierung der Zwischenstufe Sphingosin durch die Sphingosinkinase entsteht der aktive Lipidmediator S1P. Zwei Isoformen der Sphingosinkinase wurden bisher identifiziert (Kohama *et al.*, 1998; Nava *et al.*, 2000; Olivera *et al.*, 1998), wobei neue Erkenntnisse darauf hinweisen, dass die Sphingosinkinase 2 überwiegend im Nukleoplasma lokalisiert ist (Liu *et al.*, 2000a; Igarashi *et al.*, 2003). Die Sphingosinkinase 1 befindet sich hingegen in ihrem nicht aktivierten Zustand im Zytosol und sorgt hier für eine basale Produktion von S1P. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von der so genannten „housekeeping function“ der Sphingosinkinase 1 (Pitson *et al.*, 2000). Durch Phosphorylierung am Serin 225, unter anderem durch die „extracellular related kinase1/2“ (ERK1/2) oder Protein Kinase C (PKC), kann sie aktiviert und an die Zellmembran transloziert werden (Pitson *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2002).

Inzwischen sind einige Agonisten bekannt, die auf bisher nicht genau geklärte Weise zu einer Aktivierung der Sphingosinkinase 1 führen. Hierzu gehören insbesondere Wachstumsfaktoren wie PDGF, EGF, VEGF, NGF; aber auch für das pro-inflammatorische Zytokin TNF α konnte eine Aktivierung der Sphingosinkinase 1 nachgewiesen werden (Spiegel & Milstien, 2002).

Interessanterweise wurde bei Überexpression der Sphingosinkinase 1 eine pro-mitogene und onkogene Wirkung in Zellkulturen beobachtet (Cuvillier *et al.*, 1996; Olivera & Spiegel, 1993), wohingegen für die im Zellkern lokalisierte

1. Einleitung

Sphingosinkinase 2 eine Zellzyklus verlangsamende und apoptotische Wirkung gezeigt wurde (Igarashi *et al.*, 2003). Diese und andere Beobachtungen legen den Verdacht nahe, dass die subzelluläre Lokalisation der Sphingosinkinase und somit der Entstehungsort von S1P entscheidend für die biologische Wirkweise dieses pleiotrop wirksamen Botenstoffes sein könnte (Pitson *et al.*, 2005; Safadi-Chamberlain *et al.*, 2005).

Die unterschiedlichen physiologischen Prozesse, die durch S1P als extra- und intrazellulärer Botenstoff reguliert werden, sind in den letzten Jahren zunehmend Gegenstand der Forschung geworden. Die Wirkungen von extrazellulärem S1P werden über fünf spezifische, G-Protein gekoppelte Rezeptoren (früher EDG Rezeptoren 1-5, heute S1P Rezeptoren 1-5) vermittelt und können so zu einer Aktivierung u. a. von Phospholipase C, Adenylatcyclase sowie kleinen GTPasen führen (Lee *et al.*, 1998; Pyne & Pyne, 2000). Intrazellulär ist S1P an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt und vermittelt pro-mitogene und anti-apoptotische Wirkungen. Die Abbauprodukte von S1P, Sphingosin und Ceramid, besitzen dem S1P entgegengesetzte Eigenschaften und wirken pro-apoptotisch und wachstumshemmend. Aufgrund dieser Erkenntnisse schlagen die Autoren Spiegel und Milstien den Begriff eines zellulären *Sphingolipid Rheostat* vor (Spiegel & Milstien, 2003; Cuvillier *et al.*, 1996). Auf bisher nicht vollends geklärte Weise ist intrazelluläres S1P zudem in der Lage, Calcium in IP3-unabhängiger Form aus intrazellulären Speichern freizusetzen (Mattie *et al.*, 1994; Mao *et al.*, 1996). Über die rezeptorabhängigen Wirkungen von extrazellulärem S1P an der Plasmamembran ist dagegen deutlich mehr bekannt.

Neben einer Bedeutung von S1P in der Entwicklung und Reifung des vaskulären Systems (Wang *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000b) konnte in kontrollierten Studien der

1. Einleitung

S1P-Rezeptor Agonist FTY720p bereits erfolgreich als Immunsuppressivum nach Nierentransplantation und zur Behandlung der schubförmigen Multiplen Sklerose eingesetzt werden (Brinkmann et al., 2004; Brinkmann & Lynch, 2002; Kappos et al., 2006). FTY720p verhindert hierbei das Auswandern von T-Lymphozyten aus den lymphatischen Organen (engl. "egress") (Brinkmann *et al.*, 2002; Mandala *et al.*, 2002; Massberg & von Andrian, 2006).

In Widerstandsarterien konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass Änderungen der Sphingosinkinase 1 Expression tonusmodulierende Effekte haben. Das von der Sphingosinkinase 1 generierte S1P löst über den S1P₂ Rezeptor an VSCM eine Aktivierung des RhoA/Rhokinase-Signalweges aus und führt so zu einer Calciumsensitivierung des kontraktiven Apparates. Hierdurch erklärt sich auch die bereits eingangs erwähnte vasokonstriktorische Wirkung von exogen appliziertem S1P. Pathophysiologisch besonders interessant war jedoch die Tatsache, dass die Sphingosinkinase 1 und S1P unter unseren Versuchsbedingungen wesentlich an der Entstehung der myogenen Antwort (engl. myogenic response, MR) in RA beteiligt sind (Bolz *et al.*, 2003a). Dieser Vasokonstriktionsmechanismus wurde 1902 erstmals von Bayliss beschrieben und wird daher auch heute noch als Bayliss-Effekt bezeichnet. Er beschreibt die intrinsische Fähigkeit glatter Muskelzellen, auf Dehnung mit einer anhaltenden Kontraktion zu reagieren, um so unter physiologischen Bedingungen auch bei Erhöhungen des Blutdruckes die Durchblutung des nachgeschalteten Gewebes weitgehend konstant zu halten (Bayliss, 1919). Damit ist der Bayliss-Effekt ein wesentliches Element der Autoregulation der Organdurchblutung.

Die MR verstärkt auch systemische vasokonstriktorische Effekte, wobei die durch den Vasokonstriktor verursachte Drucksteigerung das Signal für eine myogene

1. Einleitung

Antwort darstellt und so eine weitere signifikante Erhöhung des TPR erfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass beispielsweise nach Infusion von Vasokonstriktoren bis zu zwei Drittel des Anstiegs des systemischen Blutdrucks aus einer myogen bedingten Erhöhung des totalen peripheren Widerstandes resultieren können (Metting *et al.*, 1989).

An der Entstehung der MR sind sowohl calciumabhängige als auch calciumsensitivierende Mechanismen beteiligt, wobei jüngere Literatur hier auf eine wesentliche Rolle des RhoA/Rhokinase Signalweges hinweist (VanBavel *et al.*, 1998; VanBavel *et al.*, 2001). Die Sphingosinkinase 1 und das von ihr produzierte S1P sind ein wichtiger Bestandteil dieser druckinduzierten Signalkaskade (Bolz *et al.*, 2003a). In erster Linie wirkt S1P im Rahmen der MR als extrazellulärer Botenstoff über den RhoA/Rhokinase-Signalweg calciumsensitivierend und ist dadurch für eine lang anhaltende Vasokonstriktion verantwortlich. Weiterhin wäre es denkbar, dass S1P im Rahmen der MR durch intrazelluläre Calciummobilisierung auch eine Rolle beim initialen Calciumanstieg nach druckinduzierter Gefäßdehnung spielen könnte. Die Möglichkeit, dass eine Überexpression der Sphingosinkinase 1 mit daraus resultierender erhöhter S1P Produktion eine verstärkte Vasokonstriktion zur Folge hätte, macht dieses Enzym zu einem potentiellen Kandidaten für eine genetisch bedingte Hypertonieform. Die Schlüsselstellung von S1P im vaskulären System macht eine enge zeitliche und räumliche Kontrolle der S1P Bioverfügbarkeit durch genaue Regelung der Synthese und des Abbaus notwendig. Diese These wird auch durch die Tatsache gestützt, dass Deutschman *et al.* in Patienten mit erhöhten S1P Serumwerten ein vermehrtes Risiko für Auftreten und Schwere von stenosierenden koronaren Herzerkrankungen nachweisen konnten (Deutschman *et al.*, 2003).

1. Einleitung

Für den Abbau von S1P stehen zwei Wege zur Verfügung: zum einen die Degradation durch die im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisierte S1P Lyase zu Hexadecenal und Phosphoethanolamin, die weiter zu Glycerol und Phospholipiden abgebaut werden können (Zhou & Saba, 1998; Van Veldhoven *et al.*, 2000; Van Veldhoven & Mannaerts, 1994). Das Fehlen der S1P Lyase, z.B. in Thrombozyten, hat dementsprechend deutlich höhere S1P Spiegel zur Folge (Yatomi *et al.*, 1997). Physiologisch spielt die S1P Lyase eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung eines S1P Gradienten zwischen lymphatischen Organen und der Blutbahn. Interessanterweise ermöglicht dieser Gradient ein Auswandern der Lymphozyten aus den lymphatischen Organen in die Blutbahn und wirkt somit immunmodulatorisch (Schwab *et al.*, 2005).

Zum anderen stehen die Lipidphosphatphosphohydrolasen (LPPs) und die zu dieser Familie gehörenden spezifischen S1P Phosphohydrolasen (SPP) für die Dephosphorylierung von S1P zu Sphingosin zur Verfügung (Le Stunff *et al.*, 2002c; Brindley *et al.*, 2002; Mao *et al.*, 1997; De Ceuster *et al.*, 1995). Auf der Basis der zunächst in Hefen identifizierten Phosphohydrolasen konnten zwei Säugetier SPPs geklont werden: SPP1 und SPP2 (Mandala *et al.*, 2000; Ogawa *et al.*, 2003). Die SPPs gehören zur Familie der magnesiumabhängigen N-ethylmaleimide-insensitiven Typ 2 Lipidphosphatphosphohydrolasen (LPPs). Trotz dreier ähnlicher, konservierter phosphatsetypischer Motive in LPPs und SPPs finden sich im Bereich der Basensequenz, der biochemischen Eigenschaften, und der subzellulären Verteilung nur wenige Gemeinsamkeiten. Die SPPs besitzen 8-10 transmembrane Domänen mit hydrophoben Profil und sind im Gegensatz zu LPPs hochspezifisch für S1P und dihydro-S1P (Mandala *et al.*, 2000). SPP1 Aktivität findet sich vor allem in den Membranen des ER sowie in geringerer Größenordnung auch in der

1. Einleitung

Plasmamembran (Le Stunff *et al.*, 2002c; Le Stunff *et al.*, 2002a). Eine Ektophosphataseaktivität, wie sie für LPPs gezeigt werden konnte (Jasinska *et al.*, 1999), lässt sich anhand der Daten von Le Stunff *et al.* für die SPP1 bisher nur vermuten (Le Stunff *et al.*, 2002a; Le Stunff *et al.*, 2002c; Le Stunff *et al.*, 2002b). Die SPP2 wurde bisher ausschließlich in intrazellulären Membranen nachgewiesen (Ogawa *et al.*, 2003). Trotz der weit verbreiteten Expression von SPP1 mit Schwerpunkt in stark vaskularisierten Geweben (Mandala *et al.*, 2000) ist über die physiologischen Aufgaben der SPP1 bisher wenig bekannt. An Hefen zeigte sich, dass die Ausschaltung der SPPs eine deutlich erhöhte Hitzeresistenz zur Folge hatte (Mandala *et al.*, 1998; Mao *et al.*, 1997). In MCF-7 Zellkulturen (humane Mammakarzinom Zelllinie) konnte von Johnson *et al.* gezeigt werden, dass eine Ausschaltung der SPP1 durch siRNA zu einer Anhäufung von intrazellulärem S1P sowie zu einer vermehrten Freisetzung von S1P in das Medium führt. Weiterhin wurde bei diesen Zellen eine erhöhte Resistenz gegen zytotoxische Substanzen wie TNF α und Daunorubicin festgestellt (Johnson *et al.*, 2003). Eine Überexpression der SPP1 und Inkubation mit exogenem S1P führt zu einer vermehrten Bildung von Ceramid und verstärkter Apoptosetendenz. Die vermehrte Anhäufung von Ceramid entsteht hierbei durch eine schnelle Umwandlung von Sphingosin in Ceramid durch die Ceramidsynthetase (Le Stunff *et al.*, 2002a).

1.6 Hypothesen der vorliegenden Arbeit

Bisherige Arbeiten aus unserem Labor konnten zeigen, dass Veränderungen der endogenen S1P Synthese als Folge unterschiedlicher Expressionslevel der Sphingosinkinase 1 zu deutlichen funktionellen Effekten in Bezug auf die Regulierung des vaskulären Tonus und der Calciumsensitivität führen (Bolz *et al.*, 2003a). Folglich untersuchten wir in der vorliegenden Arbeit die Hypothese, dass Manipulationen der Expression der SPP1 als vermutlich maßgeblichem Enzym des S1P-Abbaus in den Widerstandsarterien ähnliche Effekte auf den Tonus haben müssten wie Änderungen der Expression der Sphingosinkinase 1.

Weiterhin prüften wir die Hypothese, dass die hochspezifische SPP1 als ein funktioneller Antagonist der Sphingosinkinase 1 in RA fungiert. Falls die SPP1, wie von Le Stunff vermutet, auch Ektophosphataseaktivität besitzt, müsste sich darüber hinaus nachweisen lassen, dass sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre S1P Effekte moduliert werden (Le Stunff *et al.*, 2002c; Le Stunff *et al.*, 2002b; Le Stunff *et al.*, 2002a).

Die für die Produktion von S1P zuständige Sphingosinkinase 1 verfügt über eine Basalaktivität, kann aber durch Phosphorylierung am Serin 225 weiter aktiviert und an die Zellmembran transloziert werden. Eine weitere Hypothese der vorliegenden Arbeit war daher, dass durch die Translokation der Sphingosinkinase 1 wesentliche funktionelle Effekte in isolierten Widerstandsarterien beeinflusst werden.

Die gestellten Hypothesen wurden in der vorliegenden Arbeit durch die Beantwortung folgender Fragen experimentell überprüft.

1. Lässt sich die SPP1 in isolierten Widerstandsarterien auf mRNA Ebene bzw. immunhistochemisch nachweisen?

1. Einleitung

2. Hat die Transfektion von SPP1 bzw. ihre Ausschaltung durch Antisenseoligonukleotide funktionelle Effekte auf die Tonusregulation bzw. den Calciumspiegel?
3. Löst die Expression von SPP1-Mutanten ohne Phosphataseaktivität keine funktionellen Effekte aus?
4. Hat die intrazelluläre Lokalisation, insbesondere die Translokation an die Zellmembran, eine Bedeutung für die biologischen Wirkungen der Sphingosinkinase 1 in Widerstandsarterien?
6. Spielt eine Phosphorylierung an Serin 225 der Sphingosinkinase 1 durch ERK 1/2 eine funktionelle Rolle bei der Regulierung des mikrovaskulären Tonus?

2. Materialien

2.1 Versuchstiere

Verwendet wurden Syrische Goldhamster (Gattung *Mesocricetus*), die aus dem Charles River Laboratory (Sulzfeld) sowie der eigenen Zucht bezogen wurden. Die Goldhamster waren 4-8 Monate alt und hatten ein Gewicht zwischen 90 und 125g.

2.2 Präparat

Alle Versuche wurden an isolierten arteriellen Widerstandsgefäßen syrischer Goldhamster beiderlei Geschlechts durchgeführt, die aus dem M. gracilis des Hamsters entnommen wurden. Die untersuchten Arterien hatten einen Basal-Durchmesser von 180-240 μm .

2.3 Versuchsaufbau

- 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, $L = 100 \text{ mm}$, $D_a = 1.0 \text{ mm}$, $D_i = 0.58 \text{ mm}$, $d_a = 0.16 \text{ mm}$: Science Products GmbH, Hofheim

2. Materialien

- Vertikal-Mikropipettenpuller, Modell P 2000, Sutter Instruments, USA
- Silikonschläuche, $D_i = 1.0 \text{ mm}$, $d_a = 1.0 \text{ mm}$: Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- Dreiwegehahn Discofix: B. Braun Melsungen AG, Melsungen
- 11/0 Faden Ethilon Polyamid monofil: Ethicon, Nordersted
- Mikrochirurgische Pinzetten, no. 4 und 5 Original „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

2. Materialien

- 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], nach

- **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. In diesen Gefäßen wurde der Effekt verschiedener extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen (0-3 mmol/L) – welche gleichzeitige Änderungen der intrazellulären Calciumspiegel auslösen mussten – auf die Kontraktion untersucht. 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). Folgende Lösungen mit unterschiedlichem Calciumgehalt wurden verwendet:

2. Materialien

- **Calciumfreier MOPS-Puffer:** NaCl 147, KCl 4.7, MgSO₄ 1.17, NaH₂PO₄ 1.2, Pyruvat 2.0, Glucose 5.0, MOPS 3.0, EDTA 1.00
- **K⁺ 125 mmol/L MOPS-Puffer, Ca²⁺ 0 mmol/L:** NaCl 26.5, KCl 125, MgSO₄ 1.17, NaH₂PO₄ 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 wurde der pH-Wert mit 1N NaOH auf pH 7.4 titriert, die

2. Materialien

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

2.6 Sonstige verwendete Substanzen

- Sphingosin-1-Phosphat (S1P), Biomol, Hamburg
- SPP1 Plasmid: freundlicherweise von S. Spiegel zur Verfügung gestellt.
- asSPP1 Plasmid: freundlicherweise von S. Spiegel zur Verfügung gestellt.
- SPP1^{H208A} Plasmid: freundlicherweise von S. Spiegel zur Verfügung gestellt.
- c-myc-SPP1 Plasmid: freundlicherweise von S. Spiegel zur Verfügung gestellt.

Details zur Herstellung bzw. biochemische Charakteristika der Plasmide sind in folgenden Referenzen beschrieben: (Le Stunff *et al.*, 2002c; Le Stunff *et al.*, 2002a; Johnson *et al.*, 2003)

- Sk1^{S225A} Plasmid: freundlicherweise von S. Pitson zur Verfügung gestellt.
- GFP-Sk1^{S225A} Plasmid: freundlicherweise von S. Pitson zur Verfügung gestellt.
- mp-Sk1^{S225A} Plasmid: freundlicherweise von S. Pitson zur Verfügung gestellt.
- mp-Sk1^{wt} Plasmid: freundlicherweise von S. Pitson zur Verfügung gestellt.

Details zur Herstellung bzw. biochemische Charakteristika der Plasmide sind in folgenden Referenzen beschrieben: (Pitson *et al.*, 2000; Pitson *et al.*, 2003; Pitson *et al.*, 2005)

2. Materialien

- MEK Inhibitor PD98059, Sigma Chemicals, Deisenhofen.
- SPP1 (Mensch) Primer,
P1: 5': CTACTGCCTGTTCTGCTTCG-3'
P2: 5': TGTGTCTCCTCGGGATGTG-3'
- GAPDH (Hamster) Primer, MWG-Biotech AG, Ebersberg
GAP-C: 5`-TCT ACC CAT GGC AAG TTC AAA GGC-3`
GAP-C: 5`-CAG GAG ACA ACC TGG TCC TCG G-3`
- Acetylcholin (ACh): Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Stammlösung 10 mmol/L in Standard-MOPS-Puffer gelöst, Lagerung bei –30°C)
- Furaacetoxymethylester (Fura 2-AM): Molecular Probes Inc., Junction City, Oregon, USA (Stammlösung: 1 mmol/L in wasserfreiem DMSO in N₂-Atmosphäre gelöst; Lagerung bei –70°C in 20 µl Aliquots in N₂-Atmosphäre)
- Indometacin: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Stammlösung 10 mmol/L in Standard-MOPS-Puffer gelöst, Lagerung bei –30°C)
- L-Nitroarginin (L-NA): Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Stammlösung 20 mmol/L durch Erhitzen auf 50°C im Wasserbad in Standard-MOPS-Puffer gelöst; jeweils zu Versuchsbeginn neu angesetzt)
- Natronlauge (NaOH) 1N: Merck, Darmstadt
- Salzsäure (HCl) 1N: Merck, Darmstadt
- Noradrenalin (NA): Hoechst AG, Frankfurt (Stammlösung 100 µmol/L in Standard-MOPS-Puffer gelöst, täglich frisch in angesetzt)
- Pentobarbital: Sanofi Winthrop GmbH, München (Stammlösung Pentobarbital mit 0.9% NaCl im Volumenverhältnis 5:3 verdünnt; Lagerung bei 4°C)
- Chloroform, H₂O gesättigt, Merck Darmstadt

2. Materialien

- RNase-freies H₂O (DEPC-H₂O), 1ml Diethylpyrocarbonat (DEPC) auf 1l Aqua bidest., 12 h Rühren, Autoklavieren
- Isopropylalkohol, Merck Darmstadt
- Ethanol 75% (in DEPC-H₂O), Merck Darmstadt
- Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR), modifiziert nach Herstellerangaben Roche Diagnostics GmbH, Mannheim:

RNase freies H₂O (DEPC-H₂O), Desoxyribonukleotide: dATP, dCTP, dGTP und dTTP je 10 mM in DEPC-H₂O (steril), RT-PCR Reaktionspuffer: 5-fach konzentriert, 7,5 mM MgCl₂ und DMSO (steril), Enzym-Mix Expand High Fidelity: AMV (für TR) in 20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1,0 mM Dithiothreitol (DTT), 0,5% Tween 20 (v/v), 0,5% Nonidet P40 (v/v), 50% Glycerin (v/v), pH 7,5 (25°C, steril), Dithiothreitol-Lösung (100 mM), Ribonukleotidase-(RNase)-Inhibitor: 40 U/µl RNase-Inhibitor

- RNeasy[®] Protect Mini Kit (50), Cat. No. 74124, Qiagen)
- Agarose Standard, #A2114, AppliChem
- Auftragspuffer, 6 x Loading dye Solution, #R0611, Fermentas
- Ethidiumbromid
- Tris-Acetat EDTA Puffer
- QIAshredder[™] (50), Cat. No. 79654, Qiagen
- Effectene[™] Transfektion Reagent, Cat. No. 30127, Qiagen

3. Methoden

3.1 Präparation von arteriellen Widerstandsgefäßen

Syrische Goldhamster (4-8 Monate) wurden durch intraperitoneale Injektion des Hypnotikums Pentobarbital (letale Dosis: 50mg/kg Körpergewicht) getötet. Direkt im Anschluss wurden beide Hinterläufe sowie ein Teil des ventralen Unterleibs rasiert. Ein eigens in der Werkstatt des Physiologischen Instituts angefertigter Präpariertisch mit Klemmen zur Befestigung der Hinterläufe diente als Unterlage und Fixierung während der Präparation. An beiden Seiten des Präpariertisches ließen sich Halterungen für die notwendige Superfusion mit MOPS-Puffer anbringen. Der auf dem Rücken liegende Hamster wurde mit gespreizten Hinterläufen an den Klemmen befestigt und vor Beginn der Präparation zur oberflächlichen Desinfektion mit Isopropylalkohol eingesprüht. Unter ständiger Superfusion mit gekühltem MOPS-Puffer (12 ml/h) wurden die Haut und das subkutane Fettgewebe vom medialen Oberschenkel des Hamsters entfernt. Die nun folgenden Schritte der Präparation erfolgten unter verschiedenen lichtmikroskopischen Vergrößerungen und wurden mit Hilfe einer sterilen Irisschere sowie sterilen mikrochirurgischen Pinzetten unter ständiger Superfusion mit MOPS-Puffer durchgeführt. Der frei präparierte *M. gracilis* wurde an seiner Ursprungssehne schichtweise nach lateral abgetragen bis eine übersichtliche Darstellung des aus den tiefen Femoralgefäßen abgehenden Gefäßbaumes möglich war. Vorsichtig wurde nun die begleitende Vene von den Abzweigungen der *Arteria femoralis profunda* getrennt, um anschließend die arteriellen Gefäßabschnitte von Fett- und Bindegewebe zu befreien, ohne dabei lokale Gefäßspasmen oder andere Beschädigungen hervorzurufen. Die entnommenen Gefäße der 1. und 2. Generation distal der *Arteria femoralis profunda* mit einem Außendurchmesser von 180-240 µm sowie einer Länge von 1.0-2.0 mm

3. Methoden

wurden sofort in ein mit MOPS-Puffer gefülltes Organbad transferiert, um dort kanüliert zu werden.

3.2 Kanülierung von isolierten Widerstandsgefäßen

Die für die Kanülierung notwendigen Borosilikatglaskapillaren wurden unter Benutzung eines Laserpipettenpullers fein ausgezogen. Das Organbad, bestehend aus zwei ineinander geschraubten Edelstahlringen und einer 50µm dicken Quarzglasscheibe als Boden, wurde samt isoliertem Gefäß in einen dafür hergestellten Versuchsaufbau eingelassen. Dank zweier fest montierter Mikromanipulatoren war es möglich, die für die Fixierung der Pipetten zuständigen gegenüberliegenden Ausleger fein zu justieren. Auf der einen Seite ließen sich diese in der Höhe und auf der anderen Seite in allen drei Ebenen des Raumes stufenlos bewegen.

Für die Kanülierung wurde nun ein auf einem Dreivegehahn befestigter Silikonschlauch blasenfrei mit MOPS-Puffer gespült. Das freie Ende des Silikonschlauches wurde über das stumpfe Ende der ausgezogenen Pipette gestülpt, so dass hier ein gasdichter Abschluss entstehen konnte. Anschließend wurde die Pipette im Ausleger des Versuchsaufbaus fixiert und in einem Winkel von etwa 45° in das Organbad eingetaucht. Die im Organbad befindliche Spitze der Pipette wurde unter Berücksichtigung der Größe des Gefäßes gekappt (ca. 30 µm), so dass in der Folge das Gefäß unter Beobachtung durch das Operationsmikroskop und vorsichtiger Benutzung zweier mikrochirurgischer Pinzetten über die Pipette gestülpt werden konnte. Durch Anbringen eines festsitzenden doppelten Knotens mit einem 11/0 Faden wurde eine dichte Fixierung des Gefäßes an der Pipette erreicht. Eine zuvor am Dreivegehahn montierte Heidelberger Verlängerung wurde in 50 cm Höhe

3. Methoden

befestigt und mit MOPS-Puffer blasenfrei gefüllt. Nach fixierter Kanülierung der ersten Seite wurde nun der Dreiweghahn so geöffnet, dass MOPS-Puffer aus der Wassersäule durch das Lumen fließen konnte.

Um die andere Seite des Gefäßes ebenfalls zu kanülieren, wurde der Versuchsaufbau gedreht, eine zweite Pipette analog mit Silikonschlauch und Dreiweghahn versehen, am Ausleger fixiert und anschließend mit Hilfe des Mikromanipulators so positioniert, dass sie am freien Gefäßende zum Liegen kam. Die Befestigung erfolgte danach wie oben beschrieben. Zum Schluss wurde das Gefäß mit den Mikromanipulatoren bis auf 1 mm über den Boden des Organbades abgesenkt und auf seine *in vivo* Länge gespannt.

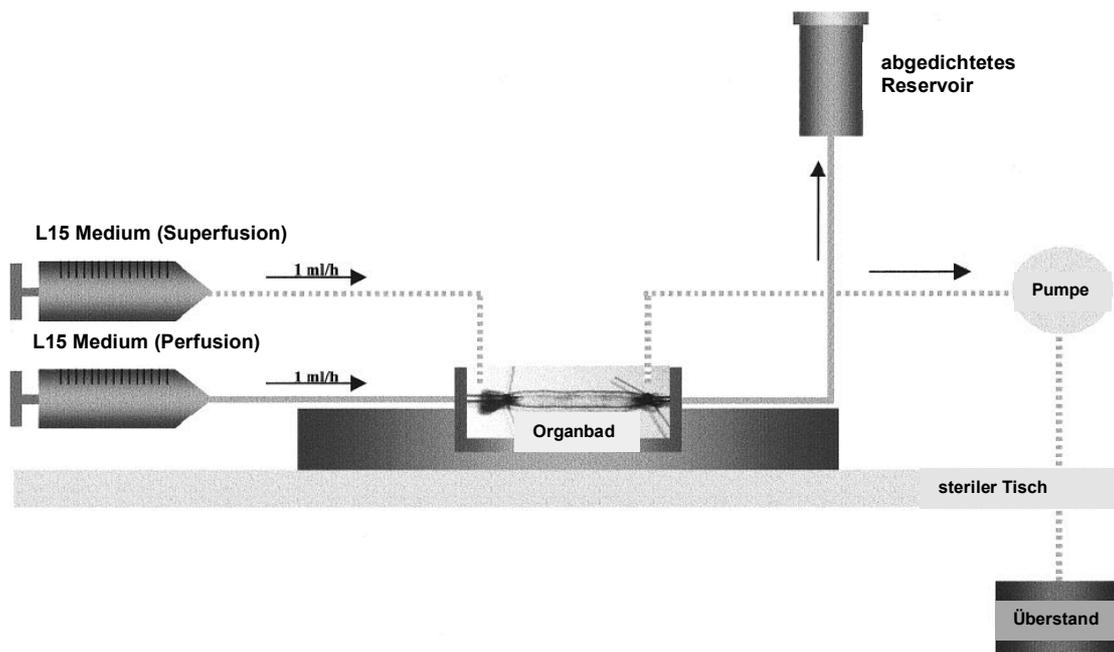


Abb. 01 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.
Abbildung modifiziert nach (Bolz et al., 2000b)

3.3 Kultivierung und Transfektion von isolierten Widerstandsgefäßen

Für die Kultivierung der Gefäße wurde der MOPS-Puffer im Organbad durch das Kulturmedium Leibovitz 15 (L 15) ersetzt. Zusätzlich zu der im Organbad befindlichen Superfusion wurde das Gefäß mittels eines Dreivegehahns über eine Heidelberger Verlängerung an einen Perfusor angeschlossen und mit 1 ml/h mit L 15 perfundiert. Am ableitenden Dreivegehahn wurde eine Heidelberger Verlängerung in Funktion einer Wassersäule in 61 cm Höhe (entsprechend 45 mmHg) befestigt und am Ende in ein Überlaufgefäß gehängt. Mit Hilfe dieser Wassersäule wurde ein physiologischer intramuraler Druck von etwa 45mmHg gewährleistet, und die Perfusion von 1 ml/h erzeugte am Gefäßendothel eine Schubspannung im physiologischen Bereich. Durch diese Anordnung konnten während der Kultur annähernd physiologische Bedingungen hergestellt werden. Für diese Kulturmethode konnte schon zuvor gezeigt werden, dass sie die Erhaltung der funktionellen Eigenschaften des Endothels und der glatten Muskelzellen gewährleistet (Bolz *et al.*, 2000b). Diese Kulturmethode war zugleich eine der Voraussetzungen für eine erfolgreiche, selektive Transfektion der glatten Muskelzellen mit ausgewählten Plasmiden.

Gemäß der Anleitung des Effectene™ Transfektionskits wurde zunächst eine Transfektionslösung hergestellt. Hierfür wurden 6 µg des Plasmids in 150 µl einer im Transfektionskit enthaltenen Pufferlösung gelöst und anschließend mit 40 µl Enhancer gemischt. Nach einer kurzen Pause von 3 Minuten wurden 60 µl Effectene zugefügt und die Lösung wieder gemischt. Nach weiteren 15 Minuten wurde der Lösung 1 ml L 15 zugefügt und mit Hilfe einer Pipette gut vermischt. Diese frisch hergestellte Transfektionslösung wurde nun im Austausch gegen 1 ml MOPS-Puffer in das für die Kultur vorbereitete Organbad pipettiert und gleichmäßig verteilt. Als

3. Methoden

optimale Transfektionszeit hatten sich in der Vergangenheit 19-21 Stunden bei Raumtemperatur bewährt. Nach dieser Zeit wurde das L 15 wieder gegen MOPS-Puffer ausgetauscht und die Widerstandsgefäße mit FURA 2-AM für die anschließenden Calciummessungen inkubiert. Mit dieser Transfektionsmethode konnte eine erstaunlich hohe und selektive Transfektionsrate in den glatten Muskelzellen erreicht werden, ohne die Funktionalität und Integrität der Widerstandsgefäße zu beeinträchtigen (Bolz & Pohl, 2003).

3.4 Inkubation der glatten Muskelzellen mit FURA 2-Acetoxy-methylester (AM)

Um während der funktionellen Messungen die Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentrationen zu registrieren, mussten die glatten Muskelzellen zunächst mit einer frisch angesetzten Lösung, bestehend aus 5% Rinderserumalbumin (BSA), 2 $\mu\text{mol/l}$ Fura 2-AM und 200 μl Indometacin in 5 ml MOPS-Puffer gelöst, inkubiert werden. Das Kulturmedium L 15 wurde durch 3 ml der FURA 2-AM Lösung ersetzt, wobei nach 1 Stunde wieder 1 ml abpipettiert wurde, um gleich darauf die restlichen 2 ml der Lösung zuzufügen. Insgesamt wurden die Widerstandsgefäße 2 Stunden im dunklen Raum bei 37°C mit FURA 2-AM beladen. Vor Beginn der funktionellen Experimente wurde die FURA 2-AM Lösung im Organbad durch zweimaligen Komplettaustausch des MOPS-Puffers entfernt.

3.5 Mikroskop und Versuchsaufbau

Für die Beladung mit FURA 2-AM wurde der Versuchsaufbau auf einem inversen Mikroskop positioniert. Als Auflagefläche diente eine Aluminiumwärmeplatte, die mit einem beheizbaren Wasserbad in Verbindung stand und so das Organbad auf eine Temperatur von 37°C erwärmen konnte. Mit einem elektrischen Thermometer wurde

3. Methoden

die Temperatur im Organbad regelmäßig kontrolliert und auf konstant 37°C gehalten. Um den transmuralen Druck auf möglichst physiologische Werte einstellen zu können, wurde an beiden Pipetten über Dreiwegehähne eine mit MOPS-Puffer gefüllte Heidelberger Verlängerung angeschlossen. Eine Verlängerung wurde mit einem mit MOPS-Puffer gefüllten Reservoir in 61 cm Höhe verbunden, so dass in dem Widerstandsgefäß ein für diese Gefäße physiologischer Druck von etwa 45 mmHg eingestellt werden konnte. Um die myogene Antwort des Widerstandsgefäßes zu untersuchen, musste der Druck innerhalb des Gefäßes auf 110 mmHg erhöht werden. Dies gelang, indem ein vorgeschalteter Dreiwegehahn auf ein Reservoir in 149 cm Höhe umgeschaltet wurde.

3.6 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie beruht auf der Verwendung von fluoreszierenden Farbstoffen, die nach Anregung mit Licht eines bestimmten Wellenlängenbereiches Licht von niedrigerer Energie emittieren. Mit der Fluoreszenzmikroskopie können nicht nur intrazelluläre Strukturen oder Proteine fixierter Zellen dargestellt werden, es lassen sich mit Hilfe membrangängiger Fluoreszenzfarbstoffe auch lebendige Zellen darstellen. Besonders interessant sind Fluoreszenzfarbstoffe, die ihre Fluoreszenzeigenschaften in Abhängigkeit intrazellulärer Parameter wie pH oder Calciumkonzentration verändern. Durch Messung von dynamischen Änderungen in den Fluoreszenzeigenschaften können Aussagen über diese Parameter in lebenden Zellen gemacht werden. Ein solcher Farbstoff ist u. a. Fura-2 AM.

3.7 FURA 2-Acetoxy-methylester (AM) Methode

Aus der Gruppe der fluoreszierenden Indikatoren wurde FURA 2-AM verwendet. Dieses Fluorophor liegt zunächst in einer hydrophoben Methylesterform vor, die es dem Farbstoff erlaubt, ohne größere Schwierigkeiten die Plasmamembran seinem Konzentrationsgradienten folgend zu passieren. Im Zytoplasma wird diese Esterbindung durch zelleigene Esterasen hydrolytisch gespalten, wodurch der aktive Farbstoff, die Säure FURA 2, freigesetzt wird und nun als membranimpermeables Fluorophor im Zytosol vorliegt. FURA 2 ist in der Lage, Calciumionen zu binden und durch Dislokation der Elektronen in den Ringsystemen hat der calciumbeladene Farbstoff andere Fluoreszenzeigenschaften als der calciumfreie. Durch die Bindung von Calcium kommt es zu einer Verschiebung aus einem Bereich höherer zu einem Bereich geringerer Anregungswellenlänge. Das Anregungsmaximum für den freien Farbstoff liegt bei 380 nm und bei 340 nm nach Bindung von Calcium. Die Intensität der Emission ist also von der Calciumkonzentration abhängig. Die Emissionsmaxima des freien und des calciumgebundenen Farbstoffes liegen mit 512 bzw. 505 nm so nah beieinander, dass eine gemeinsame Emissionsmessung bei 510 nm erfolgt (siehe Abb. 02) (Kargacin *et al.*, 1988). Setzt man die Emissionsintensitäten nach dualer Anregung als Quotienten in Beziehung zueinander - sog. *Ratio* (engl.) -, lässt sich daraus die Calciumkonzentration bestimmen (Grynkiewicz *et al.*, 1985) (Siehe 3.8). Durch die Möglichkeit der ratiometrischen Messung kann unabhängig von Störquellen wie Ausbleichen, Farbstoffverlust und Konzentrationsänderungen des Indikators (z.B. infolge einer Zellschwellung) das intrazelluläre Calcium bestimmt werden.

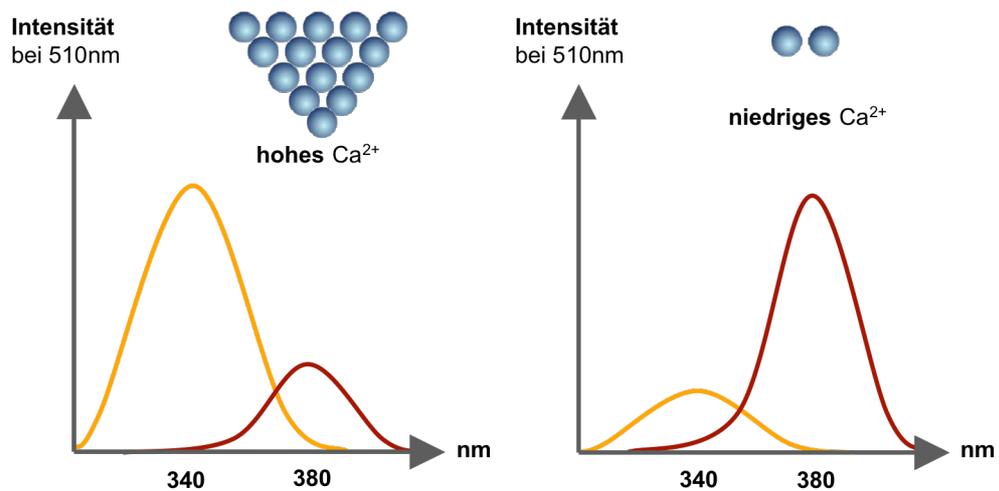


Abb. 02: Fluoreszenzspektrum von FURA 2-AM. Das gezeigte Fluoreszenzspektrum verdeutlicht den Effekt der Calciumbindung auf das Fluoreszenzverhalten von FURA 2. Im calciumgesättigten Zustand liegt das Maximum der Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von ca. 340 nm im calciumfreien Zustand bei 380 nm (gemessen bei 510 nm). Der Schnittpunkt beider Spektren veranschaulicht den so genannten isobestischen Punkt, bei dem die Emission des Farbstoffes unabhängig von seiner Calciumsättigung erfolgt und als ein Maß für die Farbstoffkonzentration genutzt werden kann.

3.8 Messung des Calciumsignals

Als Lichtquelle wurde eine 70W Xenonlampe verwendet, die den Vorteil hat, dass sie über einen großen Wellenbereich Licht emittiert und so die Wellenlänge zur Anregung variiert werden kann. Die gewünschte Anregungswellenlänge wurde mit Hilfe eines nachgeschalteten Monochromators herausgefiltert. Die Anregung des Fluorophors FURA 2 erfolgte mit zwei Wellenlängen von 340 nm und 380 nm. Um dies zu gewährleisten, wurde das Licht zunächst durch einen „Chopper“ (engl. „zerhacken“) getaktet und durch darauf befindliche Spiegel auf zwei Monochromatoren gelenkt. Außerdem diente der „Chopper“ zur Verbesserung der Messgenauigkeit, da sich mit ihm Fehler aus dem Messsignal rechnerisch herausfiltern lassen, indem die Strahlung von der Lichtquelle in Hell- Dunkelphasen (Wechsellicht) einer bestimmten Frequenz unterteilt wird. Die beiden

3. Methoden

Anregungswellenlängen alternierten während der Messung computergesteuert mit einer Frequenz von 6 Hz. Über ein Glasfaserkabel erreichte das Licht den Strahlengang des Mikroskops und regte über das Objektiv den im Gefäß befindlichen FURA 2 Farbstoff an. Das emittierte Licht gelangte über das Objektiv auf einen dichroitischen Teilerspiegel, der es weiter auf einen für Wellenlängen von 510 ± 5 nm durchlässigen Kantenfilter projizierte. Dieses Emissionslicht der Wellenlänge 510 nm wurde von einem Photomultiplier registriert und digitalisiert, um anschließend mit der Software „Felix“ weiterverarbeitet zu werden.

Wie in Abschnitt 3.7 schon kurz erwähnt, ist davon auszugehen, dass die intrazelluläre FURA 2 Konzentration, z.B. bedingt durch Ausbleichen oder Auswaschen, über den gesamten Messzeitraum nicht konstant bleibt. Um diesem Problem auszuweichen, wurde die Ratio R ($F_{340\text{nm}}/F_{380\text{nm}}$) betrachtet, die für eine gegebene Calciumkonzentration unabhängig von der Farbstoffkonzentration konstant bleibt. Unter Kenntnis der Dissoziationskonstante für Calcium lässt sich dann mit Hilfe der Formel von Grynkiewicz die freie Calciumkonzentration berechnen:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \times ((R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)) \times (S_{f2} / S_{b2})$$

R_{\min} stellt dabei die minimale Ratio bzw. das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei z.B. 340 und 380 nm Anregungswellenlängen in einer calciumfreien Lösung dar.

R_{\max} stellt entsprechend die maximale Ratio dar, bei der der gesamte Farbstoff mit Calcium gesättigt vorliegt. Die K_d ist die Dissoziationskonstante des Calcium-Farbstoff-Komplexes und (S_{f2}/S_{b2}) ist das durch Eichung an Calciumlösungen ermittelte Intensitätsverhältnis von freiem und gebundenem FURA 2 bei $\lambda = 380$ nm.

Auf die Bestimmung der absoluten Calciumkonzentration haben wir aus Gründen der mangelnden Messgenauigkeit (Unsicherheit über die in der Zelle tatsächlich vorliegenden K_d -Werte) und geringen zusätzlichen Aussagekraft verzichtet

(Meininger *et al.*, 1991) und dafür die Ratio angegeben. Angaben über Änderungen der Ratio in % des Ausgangswertes sind zulässig, da die Kalibrationskurve für unser Calciummesssystem in einem Calciumkonzentrationsbereich, 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.

Mit den niedrigen FURA 2 Konzentrationen, die in diesen Versuchen benutzt wurden, waren keine funktionell relevanten Calciumpufferungseffekte nachweisbar, d.h. beladene und unbeladene Arterien zeigten dieselbe Kontraktionsamplitude gegenüber Noradrenalin, Angiotensin und Erhöhungen des transmuralen Drucks (myogene Vasokonstriktion).

3.9 Durchmesserregistrierung

Für die Durchmesserregistrierung wurde das Okular durch eine Restlichtkamera ausgetauscht, um so die Gefäßkontur im Durchlichtverfahren zu erfassen. Hierbei diente Rotlicht mit einer Wellenlänge von 650 – 700 nm als Lichtquelle. Dies hatte keinen Einfluss auf die Calciummessung, da es den Kantenfilter von 510 ± 5 nm nicht passieren konnte. Der Außendurchmesser der Gefäße wurde mit einem Messwert pro Sekunde über die gesamte Versuchsdauer kontinuierlich mit Hilfe eines computergesteuerten Messprogramms bestimmt.

3.10 mRNA Isolierung aus Widerstandsgefäßen

Die mRNA wurde nach Anleitung des Qiagen RNeasy Mini Kits isoliert. Für die Isolierung von mRNA wurden zwei bis drei Gefäßabschnitte gesammelt, mit flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend mit einem gekühlten Metallmörser zerkleinert. Diese Vorgehensweise wurde einige Male wiederholt, bis keine größeren Stücke mehr sichtbar waren. Das zerstoßene Gewebe wurde nun in ein vorgekühltes Eppendorfgefäß überführt, mit 500µl „RLT Puffer“ (mit β-Mercaptoethanol, RNeasy Protect Kit) versetzt und auf den „Qias shredder spin column™“ gegeben. Nach zwei Minuten bei 10000 U/min in der Zentrifuge wurde der Durchfluss inklusive Bodensatz des Homogenisats in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit Hilfe einer Pipette mit 300 – 600 µl Ethanol 70% vermischt. Direkt im Anschluss wurde die Probe in eine „RNeasy mini column“ überführt und 15 Sekunden bei 10000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Proben mit zunächst mit 700 µl RW1-Puffer, dann mit 500µl RPE- Puffer gewaschen und jeweils 15 Sekunden bei 10000U/min zentrifugiert. Ein zweites Waschen mit 500µl RPE- Puffer und das anschließende zweiminütige Zentrifugieren bei 10000U/min diente der Membrantrocknung in der „RNeasy mini column“. Anschließend wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und 30 – 50 µl RNase- freies Wasser direkt auf die getrocknete Membran gegeben. Nach einer Minute Zentrifugation wurde die isolierte RNA entweder sofort weiterverarbeitet oder bei –80°C gelagert.

3.11 Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Methode der „reversen PCR“ basiert auf der Umschreibung von mRNA in cDNA (copy oder komplementäre DNA) durch das Enzym reverse Transkriptase und der anschließenden Amplifizierung der cDNA, so dass sie im Agarosegel als Bande

3. Methoden

sichtbar gemacht werden kann. Mit Hilfe der RT-PCR können kleinste Transkriptionsmengen in Geweben detektiert werden. Für die reverse Transkription mit anschließender PCR wurde das „Titan™ One Tube RT-PCR-System“ (Boehringer Mannheim) verwendet, das Dank der Optimierung des Puffers beide Schritte in einem einzigen Ansatz ermöglicht (Protokoll siehe Tabelle 02). Für die Amplifikation wurden Primer gegen SPP1 sowie gegen GAPDH als Kontrolle verwendet (siehe Tabelle 01).

Gene	Primersequenz	Anlagerungs Temperatur (engl. Annealing Temp.)	Länge
SPP1 (Mensch)	P1: 5'-CTACTGCCTGTTCTGCTTCG-3' P2: 5'-TGTGTCTCCTCGGGATGTG-3'	62 °C	574 bp
GAPDH (Hamster)	P1: 5'-TCTACCCATGGCAAGTTCAAAGGC-3' P2: 5'-CAGGAGACAACCTGGTCCTCGG-3'	60 °C	700 bp

Tab. 01: Verwendete Primer für die RT-PCR.

10s Denaturierung bei 94°C	Jeweils 10 Zyklen
30s Anlagerung (engl. Annealing)	
45s Primer Extension bei 68°C	
Primer Extensionszeit wird pro Zyklus um 5s erhöht.	Jeweils 25 Zyklen

Tab. 02: Durchgeführtes RT-PCR Protokoll

Die RT-PCR Produkte wurden anschließend mit Hilfe der Gelelektrophorese nachgewiesen.

3.12 Nachweis der RT-PCR Produkte durch Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Standardmethode, um DNA verschiedener Größe aufzutrennen. Dabei wandern die DNA-Fragmente aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Die zurückgelegte Strecke ist abhängig von der Größe der Fragmente, der angelegten Stromstärke und der Agarosekonzentration des Gels. Die Lage der DNA im Agarosegel kann durch Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Durch den Vergleich mit einem gleichzeitig mitlaufenden Längenstandard ist es möglich, die Anzahl der Basenpaare der Fragmente abzuschätzen.

Für die Herstellung des Agarosegels wurden 0,4 g Agarose eingewogen und in 40 ml Tris-EDTA Puffer kurz aufgeköcht. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 40°C wurde ein Tropfen Ethidiumbromid (entspricht einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml) zugegeben. Anschließend wurde die einprozentige Agaroselösung in eine abgedichtete Gelkammer gegossen und unmittelbar mit 2 Kämme an der Oberseite versehen, um Taschen für die zu untersuchenden Proben zu schaffen. Nach Erstarren des Agarosegels wurden die Kämme entfernt, das Gel mit Tris-EDTA Puffer überschichtet und die zuvor mit Auftragspuffer im Verhältnis 1:4 versetzten Proben in die Kammtaschen gefüllt. Zusätzlich wurde der Längenstandard aufgetragen. Das Auftrennen erfolgte bei einer Spannung von konstant 100 V. Mittels eines Kamerasystems (BioRad Gel Doc 1000 imaging system) wurde ein Bild von dem Agarosegel angefertigt und anschließend auf dem PC gespeichert.

3.13 Immunfluoreszenz und konfokale Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie zeichnet sich gegenüber der herkömmlichen Mikroskopie durch eine wesentlich engere fokale Ebene aus. Dadurch können Schnittbilder aus lebenden Zellen gewonnen werden, die eine Darstellung subzellulärer Strukturen erlauben. Durch sequentielle Verlagerung der Schnittebene in der z-Achse können außerdem dreidimensionale Bilder errechnet werden.

Bei der konfokalen Mikroskopie wird immer nur ein möglichst kleiner Ausschnitt des Präparates beleuchtet. Das Bild dieses Punktes wird in einer Zwischenbildebene durch eine sehr kleine Blende geführt. Dies hat zur Folge, dass nur Licht aus der Fokusebene den Detektor erreichen kann. Alle anderen (unscharfen) Ebenen werden ausgeblendet. Das Präparat wird Punkt für Punkt abgerastert (gescannt) und das Schnittbild im Rechner erstellt.

In einem konfokalen „Laser Scanning Mikroskop (cLSM)“ dient ein Laser als Lichtquelle, durch die Fluoreszenzfarbstoffe in der Zelle zur Fluoreszenz angeregt werden können. Das emittierte Licht gelangt über austauschbare Farb- und Graufilter zum Photomultiplier. In unserem Labor wurde ein Zeiss LSM 410 mit einem Kr/Ar Laser und einem 63x/1.2W Wasser-Immersionsobjektiv verwendet.

Für die Immunfluoreszenz wurden die isolierten Widerstandsarterien, welche mit einem c-myc markierten SPP1 Fusionsprotein transfiziert (siehe 3.3) worden waren, mit 3,7% Formaldehyd fixiert. Die Zellmembran wurde durch Zugabe von 0,3% Triton X-100 permeabilisiert, um eine anschließende Antikörperbindung zu ermöglichen. Über Nacht wurde das Präparat mit einem monoklonalen Maus-anti-human c-myc Antikörper bei 4°C inkubiert (1:200 Verdünnung), um dann mit einem zweiten Alexa 488 markierten Kaninchen anti-Maus IgG Antikörper (1:200 Verdünnung, 90min bei

Raumtemperatur) und mit Hilfe des konfokalen Mikroskops die subzelluläre Verteilung der SPP1 sichtbar zu machen.

3.14 Überprüfung der Funktionalität und Transfektionsrate von isolierten Widerstandsgefäßen

Vor jedem eigentlichen Versuchsprotokoll wurden die transfizierten und kultivierten Widerstandsgefäße auf ihre Funktionalität getestet. Nach zweistündiger Inkubation mit FURA 2-AM bei 37°C (siehe Kapitel 3.4) wurde der Vasokonstriktor Noradrenalin (NE, 0,3 µmol/L) in das Organbad gegeben. Eine Abnahme des Durchmessers sowie der hervorgerufene Calciumanstieg ließen auf eine gut erhaltene glattmuskuläre Funktion schließen. Die Dilatationsfähigkeit wurde durch Zugabe von Acetylcholin (ACh 1,0 Mmol/L) überprüft. Durch diesen Test wurde die Intaktheit des Endothels untersucht, da Acetylcholin über das Endothel zu einer Senkung der glattmuskulären Calciumspiegel und damit zu einer Vasodilatation führt (Emerson & Segal, 2000). Gefäße, die nach Stimulation mit 0,3 µmol/L NE nicht mindestens eine Konstriktion von 30% des dia_{max} zeigten und nach anschließender Gabe von 1 µmol/L Acetylcholin nicht um mindestens 80% der durch NE induzierten Vorkontraktion dilatierten, wurden verworfen. Überprüft wurde außerdem, ob die verschiedenen Transfektionskonstrukte per se die Vasokonstriktion und die Vasodilatation der Widerstandsgefäße beeinflussten. Weder im Vergleich von Arterien mit verschiedenen Transfektionskonstrukten untereinander noch mit genetisch nicht manipulierten Widerstandsgefäßen konnte ein signifikanter Unterschied bei der Vasokonstriktion bzw. Vasodilatation festgestellt werden. Im Anschluss an diese Funktionalitätstests wurde das eigentliche Versuchsprotokoll gestartet (siehe Ergebnisteil).

Zur Überprüfung der beschriebenen Transfektionsrate in VSMC von RA wurden regelmäßig für GFP kodierende Plasmide eingebracht und anschließend mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie dargestellt. Bei unveränderter Funktionalität im Vergleich zu den Nativgefäßen dienten diese GFP-transfizierten Widerstandsgefäße weiterhin als optimale Kontrollgefäße.

3.15 Experimentelle Ansätze und Methoden zur Bearbeitung der gestellten Hypothesen

Die unter 1.6 gestellten Hypothesen der vorliegenden Arbeit wurden anhand der nachfolgenden experimentellen Ansätze überprüft.

1. Nachweis einer Expression von SPP1 auf mRNA Ebene in isolierten Widerstandsarterien mit Hilfe von RT-PCR.

2. Untersuchung von funktionellen Effekten der SPP1 mit Hilfe einer hocheffektiven Transfektionsmethode für glatte Muskelzellen (Bolz & Pohl, 2003). Hierbei wurden Effekte einer Überexpression der SPP1 bzw. Reduktion ihrer Expression mit Antisenseoligonukleotiden gegen die codierende Sequenz der SPP1 untersucht. In diesem Rahmen wurden folgende Parameter der Regulierung von Widerstandsarterien gemessen:

- Ruhetonus und entsprechende Calciumkonzentrationen.
- Calciumsensitivität des kontraktilen Apparates.
- Myogene Vasokonstriktion.
- Durch exogen appliziertes S1P induzierte Vasokonstriktionen.

3. Um unspezifische proteomische Effekte der Transfektionsmethode bzw. des eingebrachten SPP1 Konstruktes auszuschließen, wurden Kontrollexperimente mit GFP und SPP1^{H208A} transfizierten Widerstandsarterien durchgeführt. Bei dem

3. Methoden

SPP1^{H208A} Konstrukt handelt es sich um eine Mutante der SPP1, die keine Phosphataseaktivität besitzt.

4. Immunhistochemische Lokalisation eines zuvor transfizierten c-myc-markierten SPP1 Konstrukts mit einem Antikörper gegen c-myc in den glatten Muskelzellen von Widerstandsarterien.

5. Durch Expression der GFP-Sk^{S225A} in RA wurden mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie die Auswirkungen auf das Translokationsverhalten bei veränderter Phosphorylierbarkeit untersucht.

6. Widerstandsgefäße, die eine mit dem fluoreszierenden Protein GFP versehene GFP Sphingosinkinase 1 (GFP-Sk) exprimierten, dienten als Kontrolle.

7. Funktionelle Effekte einer veränderten Phosphorylierbarkeit der Sphingosinkinase 1 und damit Auswirkungen einer fehlenden Translokation und Aktivierung wurden durch Expression der Sk^{S225A} Mutante in RA untersucht.

8. In einem nächsten Schritt wurde untersucht, inwieweit sich die zuvor beobachteten funktionellen Defizite einer veränderten Phosphorylierung und Translokation durch eine forcierte Membranlokalisierung mittels eines Myristoylation/Palmitoylation (mp) Motivs wiederherstellen lassen. Hierfür wurden die isolierten Widerstandsarterien mit mp-Sk^{S225A} Mutanten transfiziert und anschließend funktionell untersucht.

9. Inwieweit bei forcierter Membranlokalisierung eine erhaltene Aktivierbarkeit durch Phosphorylierung am Serin 225 zum Erhalt der funktionellen Effekte in RA beiträgt, wurde durch Expression einer membranverankerten *wild-type* mp-Sk^{wt} überprüft. Durch Vergleich mit den zuvor erhobenen Daten der Sk^{S225A} und mp-Sk^{S225A} Mutanten sollten zudem Hinweise auf die funktionelle Bedeutung einer forcierter Membranlokalisierung durch das mp-Motiv gewonnen werden.

3. Methoden

10. Das Serin 225 der Sphingosinkinase 1 ist eine potentielle Phosphorylierungsstelle der ERK 1/2. Die deutlichen funktionellen Effekte der mit Sk^{S225A} Mutanten behandelten Gefäße legen daher eine Beteiligung der ERK 1/2 an der Regulierung des mikrovaskulären Tonus nahe. In einer weiteren Versuchsreihe wurden kultivierte, nicht transfizierte Widerstandsarterien mit dem *mitogen-activated protein kinase 1/2* (MEK1/2) Inhibitor PD98059 behandelt. Auf diese Weise sollten Hinweise für eine mögliche Beteiligung der ERK 1/2 an der Phosphorylierung der Sphingosinkinase 1 gewonnen werden.

3.16 Statistik

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 $\mu\text{mol/L}$ Acetylcholin in Ca^{2+} -freier Organbadlösung bei einem transmuralen Druck von 45mmHg bestimmt. Der Tonus des jeweiligen Gefäßes wurde nach der folgenden Formel (1) berechnet:

$$[\text{Gefäßtonus (Konstriktion in \% von } \text{dia}_{\text{max}}) = ((\text{dia}_{\text{max}} - \text{dia}_{\text{akt}})/\text{dia}_{\text{max}}) \times 100] \quad (1)$$

(dia_{max} = max. Durchmesser bei 45 mmHg, 0 mmol/L Ca^{2+} nach Stimulation mit 1 $\mu\text{mol/L}$ ACh, dia_{akt} = aktueller Durchmesser des Gefäßes zu einem gegebenen Zeitpunkt des Versuches.)

Die myogene Antwort wurde als Prozent der Aufhebung der initialen Aufdehnung („reversal of initial distension“ = RID) nach Formel (2) quantifiziert.

$$[\text{RID} = (\text{dia}_{\text{distended}} - \text{dia}_{\text{akt}}) / (\text{dia}_{\text{distended}} - \text{dia}_{\text{rest}}) \times 100] \quad (2)$$

3. Methoden

($\text{dia}_{\text{distended}}$ = max. Durchmesser nach Aufdehnung durch Erhöhung des transmuralen Drucks von 45 mmHg auf 110 mmHg, dia_{akt} = aktueller Durchmesser des Gefäßes zu einem gegebenen Zeitpunkt des Versuches, dia_{rest} = Ausgangsdurchmesser bei 45 mmHg)

Die druckinduzierten Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Ratio wurden nach Formel (3) bestimmt.

$$[\Delta R(\% \text{ of } R_{\text{rest}}) = ((R_{\text{pressure}} - R_{\text{rest}}) / R_{\text{rest}}) \times 100 - 100] \quad (3)$$

(R_{pressure} = aktuelle Ca^{2+} -Konzentration zu einem gegebenen Zeitpunkt des Versuches, R_{rest} = Ca^{2+} -Konzentration bei 45 mmHg)

Steady state–Werte aus Dosis-Wirkungskurven (die Zeitpunkte, zu denen der steady state in den unterschiedlichen Versuchsreihen bestimmt wurde, sind im Ergebnisteil jeweils angegeben) wurden nach Testung auf Normalverteilung mit dem ungepaarten Student's *t*-Test und Korrektur nach Bonferroni verglichen.

Steady state-Werte verschiedener Gruppen wurden mit ANOVA und nach folgender post hoc Analyse der Mittelwerte (nach Tukey) verglichen. Unterschiede wurden als signifikant angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5% betrug ($p < 0.05$). Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm „Stata™“, College Station, Texas durchgeführt.

Um Änderungen der glattmuskulären Calciumkonzentration und/oder des Gefäßdurchmessers über die Zeit zu vergleichen, wurde zusätzlich ein Verfahren benutzt, das 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

3. Methoden

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 folgenden funktionellen Experimente wurden an isolierten Widerstandsarterien des Hamsters durchgeführt. Wie bereits im Methodenteil beschrieben, wurden DNA Plasmide durch 19-21 stündige Inkubation mit Kulturmedium selektiv in die glatten Muskelzellen der intakten Widerstandsgefäße eingebracht. Das Kulturmedium enthielt Antibiotika (Penicillin/Streptomycin), das nicht-liposomale Transfektionsreagenz Effectene[®] (16 µl/ml, Qiagen) und das jeweilige Plasmid.

Mögliche unspezifische Effekte der Transfektionsmethode konnten in Vorversuchen ausgeschlossen werden, da sich nicht-transfizierte Arterien und solche, welche ein grün fluoreszierendes Protein der Meeresqualle, GFP (engl. green fluorescent protein), exprimierten, in den untersuchten Parametern nicht signifikant von frisch isolierten oder kultivierten Widerstandsgefäßen unterschieden (Bolz *et al.*, 2000b).

Die Erfolgsquote der beschriebenen Methoden liegt in unserem Labor bei etwa 95%, d.h. mehr als 95% der Zellen eines mikroskopischen Feldes exprimierten nach Anwendung des beschriebenen Transfektionsprotokolls GFP bzw. das Proteinprodukt des jeweils verwendeten Plasmids. Widerstandsgefäße bei denen nach Kultivierung eines der folgenden Probleme auftrat, wurden nicht bei der Auswertung berücksichtigt:

1. Leerlaufen des Organbades über Nacht (im kompletten Organbad nicht sichtbare Brüche des Quarzglases unter der Gummidichtung).
2. Bruch einer der Glaspipetten bei Aufsetzen des experimentellen Aufbaus auf die Wärmeplatte des Mikroskops.
3. Okklusion der zuführenden Glaspipette über Nacht.
4. Konstriktionen <30% nach Gabe von 1 µmol/L Noradrenalin.

4. Ergebnisse

5. Vasodilatationen <80% in vorkontrahierten Arterien nach Gabe von 1 $\mu\text{mol/L}$ Acetylcholin.

4.1 Bedeutung der SPP1 in der Tonusregulierung von Widerstandsarterien

4.1.1 Expression von SPP1 in Widerstandsgefäßen des Hamsters

Um eine mögliche Expression der SPP1 auf mRNA Ebene nachzuweisen, musste zunächst die entsprechende genetische Sequenz im Genom des Hamsters identifiziert werden. In der Annahme, dass diese Sequenz Ähnlichkeit mit den SPP1 Genen in Maus und Mensch besitzt, verwendeten wir in den isolierten Widerstandsarterien des Hamsters die erst kürzlich veröffentlichten Primer gegen Regionen, die beim Menschen und der Maus homolog sind (Johnson *et al.*, 2003) (Sequenzen siehe Tab. 01).

Mit Hilfe dieses Primers wurde durch eine RT-PCR aus den homogenisierten Widerstandsarterien eine Sequenz amplifiziert, die mit der vorhergesagten Größe von 574 bp übereinstimmte. Wie in der Abbildung 03 zu sehen, ist beim Hamster sowohl in den isolierten Widerstandsarterien als auch in den glatten Muskelzellen der Aorta eine deutliche Expression der SPP1 auf mRNA Ebene vorhanden. GAPDH diente hierbei als Kontrolle der PCR Bedingungen. Ein anschließender Vergleich der amplifizierten Sequenz des Hamsters ergab eine 92%ige Übereinstimmung mit dem entsprechenden SPP1 Gen der Ratte (freundlicherweise durchgeführt von Dr. med. H. Bolz, Institut f. Humangenetik der Universität Köln. Alignments siehe Anhang).

Eine Reduktion der Expression der SPP1 wurde durch Transfektion mit Antisenseoligonukleotiden erreicht. Die zentrale Anforderung an ein solches Oligonukleotid ist, dass es an die Ziel mRNA bindet und die anschließende Translation blockiert. Weiterhin muss ausgeschlossen sein, dass diese Sequenz

4. Ergebnisse

gleichzeitig auch noch andere unerwünschte Bindungen eingeht und somit nicht zu kontrollierende Effekte hervorrufen könnte.

In unserem Fall wurden diese Anforderungen erreicht, indem aus dem amplifizierten Hamster SPP1-Gen eine passende Sequenz 50bp unterhalb des vorhergesagten Translations-Initiationskomplexes hergestellt wurde. Für dieses Oligonukleotid konnte in Gendatenbanken lediglich eine Homologie mit Genen der SPP1 Familie gefunden werden.

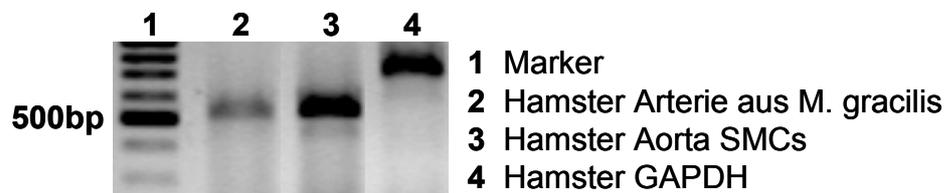


Abb. 03: **Darstellung der Expression von SPP1 durch RT-PCR.** Die RT-PCR aus homogenisierten, isolierten Widerstandsarterien des *M. gracilis* sowie kultivierten, vaskulären glatten Muskelzellen der Aorta des Hamster zeigt eine Expression der SPP1 auf mRNA Ebene. GAPDH diente hierbei als Kontrolle der PCR Bedingungen. Jede der dargestellten RT-PCRs wurde mindestens fünfmal durchgeführt und erbrachte jeweils vergleichbare Ergebnisse.

4.1.2 Effekte von SPP1 auf den Ruhetonus

Im Rahmen früherer Fragestellungen konnte unsere Arbeitsgruppe bereits feststellen, dass eine Inhibition bzw. eine Überexpression der Sphingosinkinase 1 die Tonusregulierung in Widerstandsarterien signifikant beeinflusst (Bolz *et al.*, 2003a). In der vorliegenden Arbeit wurde eine ähnliche Herangehensweise gewählt, um Auswirkungen der für den Abbau von S1P zuständigen SPP1 in Widerstandsgefäßen zu untersuchen.

Die in dieser Versuchsreihe registrierten Durchmesser wurden bei einem intramuralen Druck von 45 mmHg gemessen. Eine Überexpression der SPP1 in

4. Ergebnisse

VSMC von Widerstandsarterien verringerte den Ruhetonus auf 57% im Vergleich zu den als Kontrolle verwendeten GFP-transfizierten Arterien (GFP=18,48±2,73%, SPP1= 10,77±2,77%, $p < 0,05$; $n=6$; Abb. 04).

Eine Hemmung der SPP1 mit Antisenseoligonukleotiden bewirkte eine Erhöhung des Ruhetonus um 34% verglichen mit der GFP-Kontrollgruppe ($p < 0,05$; $n=6$; Abb. 04).

Die maximalen Durchmesser der Gefäße aller drei Untersuchungsgruppen waren nicht signifikant verschieden (dia_{max} GFP=191±15µm, dia_{max} SPP1=196±6µm, dia_{max} anti-SPP1=190±8µm; $p > 0,05$; Abb. 04).

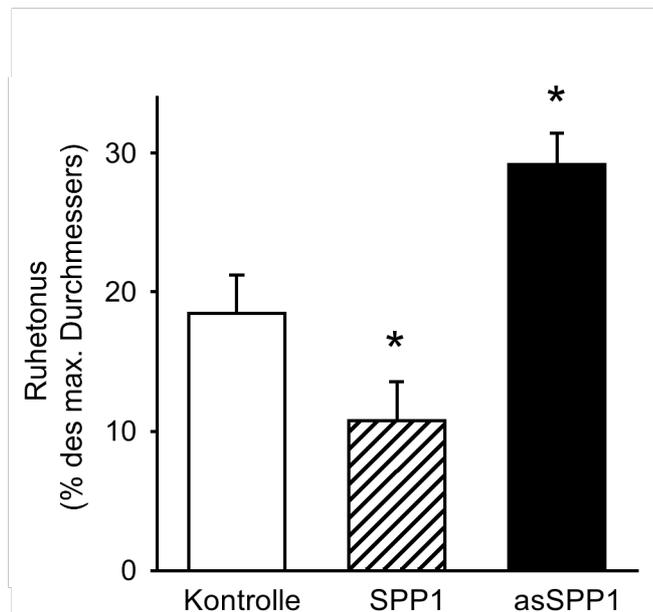


Abb. 04: **Grafische Darstellung des Ruhetonus.** Eine erhöhte Expression der SPP1 in glatten Muskelzellen von Widerstandsarterien des Hamsters (erreicht durch Transfektion von SPP1; $n=6$) reduzierte den Ruhetonus signifikant. Eine verringerte SPP1 Expression durch Transfektion von SPP1 Antisenseoligonukleotiden ($n=6$) führte zu einer Erhöhung des Ruhetonus. Die maximalen Gefäßdurchmesser der beiden Versuchsgruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede. (* entspricht $p < 0,05$ im Vergleich mit der GFP-transfizierten Kontrolle $n=6$)

4.1.3 Effekte von SPP1 auf die intrazellulären Ruhecalciumspiegel von VSMC in isolierten Widerstandsarterien.

Über bisher noch nicht genau geklärte Mechanismen ist intrazelluläres S1P in der Lage, Calcium freizusetzen (Mattie *et al.*, 1994). In Anbetracht der Effekte von SPP1 auf den Ruhetonus war es daher naheliegend, die intrazellulären Calciumspiegel in den glatten Muskelzellen der Widerstandsarterien genauer zu untersuchen.

Die Abnahme des Ruhetonus bei Überexpression der SPP1 war assoziiert mit einer Verminderung des intrazellulären Ruhecalciumspiegels um 25% im Vergleich zu der GFP-Kontrollgruppe. (GFP R340nm/380nm=0.91±0.06, SPP1 R340nm/380nm=0.68±0.06; p<0,05; n=6; Abb. 05).

Hingegen wurden bei einer Inhibition der SPP1 durch asSPP1 keine signifikanten Veränderungen des intrazellulären Ruhecalciumspiegels beobachtet (R340nm/380nm=0.96±0.02; p>0,05; n=6, verglichen mit GFP n=5; Abb. 05).

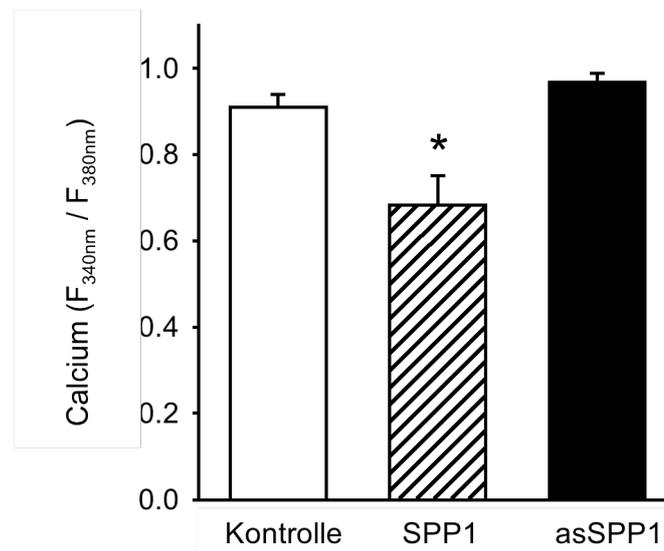


Abb. 05: Grafische Darstellung der Ruhecalciumspiegel. Transfektion der Widerstandsarterien mit SPP1 (n=6) reduzierte signifikant die basalen Calciumspiegel (gemessen mit FURA 2 Methode) in den glatten Muskelzellen der Widerstandsarterien. Die Versuchsgruppe, die mit SPP1 Antisenseoligonukleotiden transfiziert wurde (n=6), zeigte keine Veränderungen des basalen Calciumspiegels. (* entspricht p<0,05 im Vergleich mit der GFP-transfizierten Kontrolle, n=5)

4.1.4 SPP1 und Calciumsensitivität in VSMC

Extrazelluläres S1P kann über den G-Protein gekoppelten S1P₂ Rezeptor eine Aktivierung der RhoA/Rhokinase-Kaskade bewirken und so zu einer erhöhten Calciumsensitivität des kontraktiven Apparates führen. Die dieser Versuchsreihe zu Grunde liegende Hypothese war folglich, dass eine veränderte SPP1 Expression die S1P Spiegel modulieren und so über RhoA/Rhokinase Tonusänderungen auslösen könnte. Sowohl für endogen produziertes als auch für exogen zugeführtes S1P konnten calciumsensitivierende Effekte nachgewiesen werden. (Bolz *et al.*, 2003a; Bolz *et al.*, 2002) Aus diesem Grund war bei dieser Versuchsreihe von Interesse, ob die SPP1 ebenfalls die Calciumsensitivität in Widerstandsarterien beeinflusst. Um die Calciumsensitivität des kontraktiven Apparates zu bestimmen, wurden die mit 120mmol/L K⁺ depolarisierten Widerstandsgefäße steigenden extrazellulären Calciumkonzentrationen ausgesetzt (Ca²⁺ von 0 bis 3 mmol/L) und die entsprechenden Durchmesseränderungen gemessen. Infolge der Membrandepolarisation kommt es bei diesen Experimenten zu einer Angleichung von extrazellulären und intrazellulären Calciumkonzentrationen. Die Unterschiede der Gefäßdurchmesser zwischen den Versuchsgruppen beruhen somit auf einer Veränderung der Calciumsensitivität des kontraktiven Apparates.

Widerstandsarterien, die zuvor mit SPP1 transfiziert wurden, zeigten in dieser Versuchsreihe eine verminderte Calciumsensitivität (p<0,05; n=6, Abb. 06). Die intrazellulär gemessenen FURA 2 Ratios waren für die jeweils vorgelegte extrazelluläre Calciumkonzentration in allen drei Versuchsgruppen nicht signifikant unterschiedlich. Die Calciumsensitivität der mit asSPP1 transfizierten Widerstandsarterien war nicht verändert (n=6, Abb. 06).

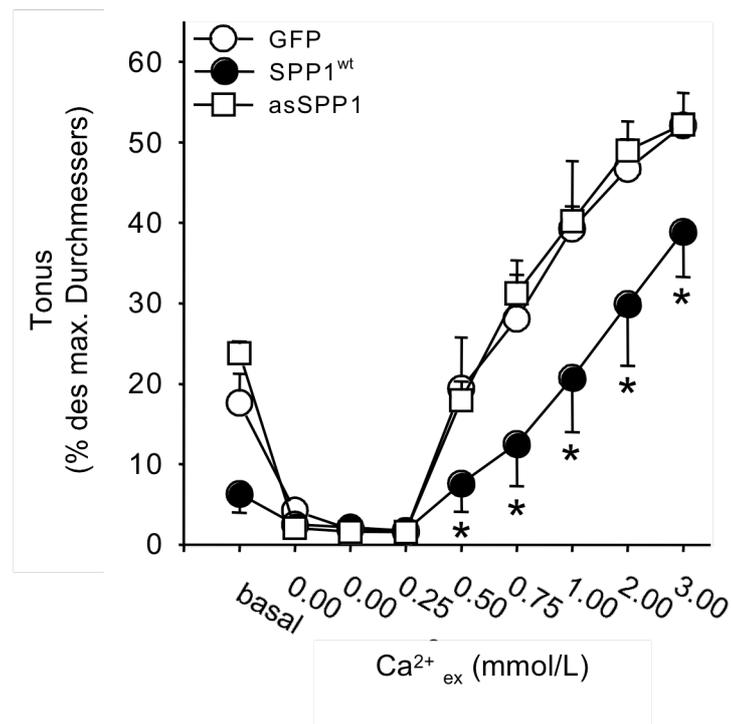


Abb. 06: Grafische Darstellung der Calciumsensitivität. Unter depolarisierten Versuchsbedingungen (120mmol/L K⁺) reduzierte die Transfektion der Widerstandsarterien mit SPP1 (n=6) signifikant die Konstriktion auf schrittweise Erhöhung des extrazellulären Ca²⁺ (Ca²⁺_{ex} von 0 bis 3 mmol/L). Die Transfektion mit SPP1 Antisenseoligonukleotiden (n=6) hatte keinen signifikanten Effekt auf das Durchmesser / Ca²⁺_{ex} Verhältnis. (* entspricht p<0,05 im Vergleich zu Widerstandsarterien, die mit GFP und asSPP1 transfiziert wurden.)

4.1.5 Effekte der SPP1 auf die myogene Vasokonstriktion

Ob die SPP1 eine Rolle in der Regulierung des systemischen Blutdrucks spielt und als ein physiologischer Gegenspieler der Sphingosinkinase 1 agieren kann, sollte anhand der Auswirkungen einer veränderten SPP1 Expression auf die myogene Vasokonstriktion untersucht werden.

Um die druckinduzierte myogene Vasokonstriktion zu untersuchen, wurde der transmurale Druck von 45 mmHg auf 110 mmHg erhöht. Die durch diese Druckerhöhung ausgelöste myogene Vasokonstriktion war in den SPP1 transfizierten Arterien signifikant reduziert (Aufhebung der initialen Aufdehnung (AIA) 69%) (p<0,05; n=6, Abb. 07).

4. Ergebnisse

Eine Hemmung der SPP1 mit Antisenseoligonukleotiden resultierte in einer signifikant erhöhten myogenen Vasokonstriktion (AIA 46%; $p < 0,05$; $n=6$, Abb. 07).

Der bei der myogenen Antwort beobachtete druckinduzierte Calciumanstieg unterschied sich in den beiden Versuchsreihen weder in der Höhe noch in der Geschwindigkeit.

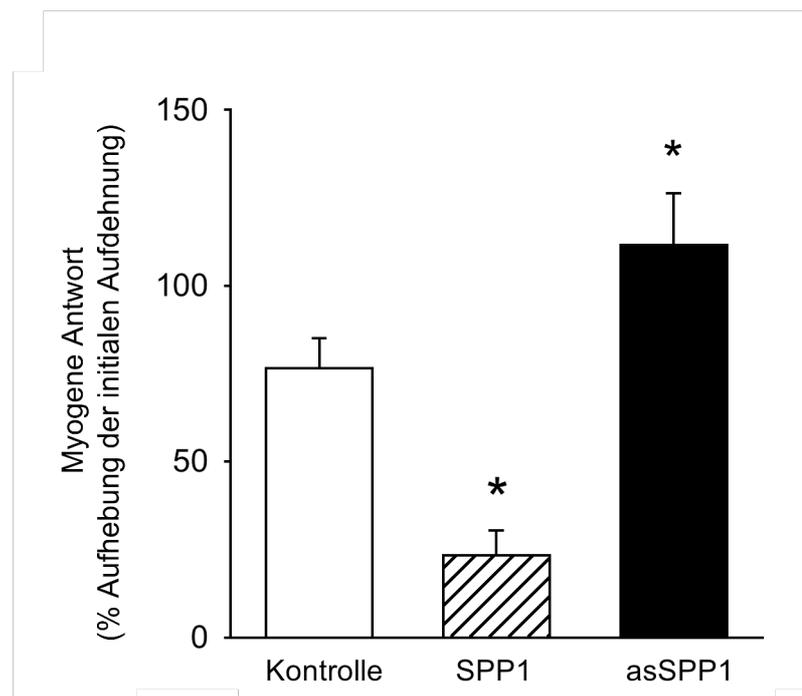


Abb. 07: Grafische Darstellung der myogenen Vasokonstriktion. Die druckinduzierte myogene Vasokonstriktion wurde durch Transfektion von SPP1 ($n=6$) deutlich reduziert (gemessen als prozentuale Aufhebung der initialen Aufdehnung infolge der Druckerhöhung von 45mmHg auf 110mmHg). In der Versuchsgruppe, die mit SPP1 Antisenseoligonukleotiden ($n=6$) behandelt wurde, zeigte sich eine signifikant erhöhte myogene Vasokonstriktion. (* entspricht $p < 0,05$ im Vergleich mit der GFP-transfizierten Kontrolle.)

4.1.6 SPP1 moduliert Effekte von exogen appliziertem S1P

Der bei Inhibition der SPP1 beobachtete erhöhte Ruhetonus ohne gleichzeitige Erhöhung der basalen intrazellulären Calciumspiegel sowie die in diesen Arterien verstärkte myogene Antwort warf die Frage auf ob diese Befunde durch eine vermehrte Freisetzung von akkumuliertem intrazellulären S1P (Johnson *et al.*, 2003) durch einen bisher ungeklärten Mechanismus oder einen verminderten Abbau von extrazellulärem S1P durch eine reduzierte Ektophosphataseaktivität der SPP1 hervorgerufen werden (Le Stunff *et al.*, 2002a; Le Stunff *et al.*, 2004).

Ähnlich den LPPs, für die bereits eine Ektophosphataseaktivität beschrieben wurde, konnten Le Stunff *et al.* für die SPP1 eine geringe Aktivität in der Zellmembran nachweisen (Le Stunff *et al.*, 2002a). Um zu klären, ob die SPP1 in den untersuchten VSMC der RA Zugang zu extrazellulären S1P Kompartimenten besitzt und somit in der Lage ist, rezeptorabhängige Effekte von S1P zu beeinflussen, wurden die mit SPP1 bzw. asSPP1 transfizierten Widerstandsarterien exogen verabreichtem S1P ausgesetzt.

Die mit SPP1 transfizierten Arterien zeigten eine deutlich verringerte Vasokonstriktion auf exogenes S1P im Vergleich zu den GFP Kontrollgefäßen. Hervorzuheben ist zudem die Tatsache, dass bei Zugabe von niedrigen Konzentrationen S1P ($<0,1\mu\text{mol/L}$) eine vollständige Aufhebung der Vasokonstriktion zu beobachten war ($p<0,05$; $n=6$; Abb. 08).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte bei den mit asSPP1 transfizierten Widerstandsgefäßen eine signifikant erhöhte Konstriktion auf exogenes S1P beobachtet werden ($p<0,05$; $n=6$; Abb. 08).

4. Ergebnisse

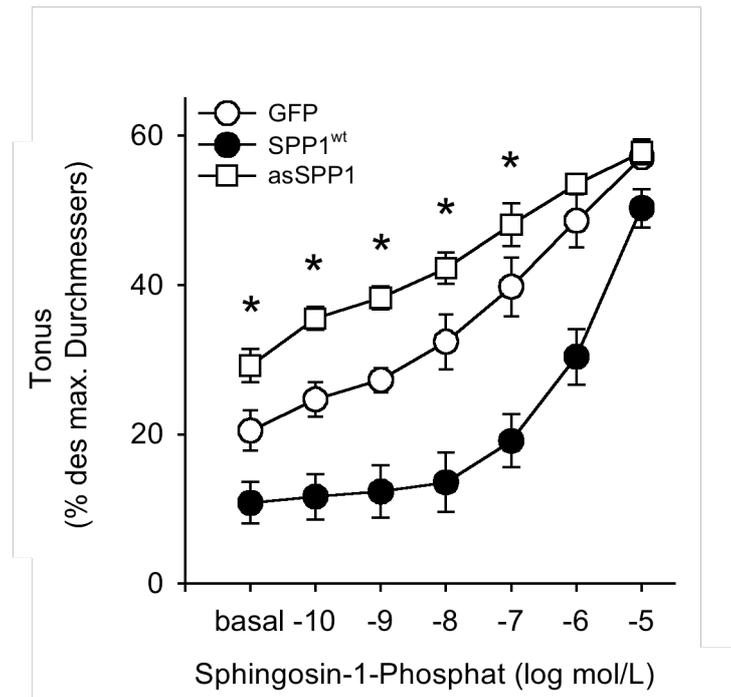


Abb. 08: Grafische Darstellung der Vasokonstriktion auf exogenes S1P. Die Vasokonstriktion auf exogenes Sphingosin-1-Phosphat war in SPP1 transfizierten Widerstandsarterien deutlich reduziert (n=6). Vereinbar mit diesen Ergebnissen zeigten Widerstandsarterien, die mit Antisenseoligonukleotiden gegen SPP1 behandelt wurden (n=6), eine verstärkte Konstriktion auf exogen appliziertes Sphingosin-1-Phosphat (*entspricht $p < 0,05$ im Vergleich mit der GFP-transfizierten Kontrolle).

4.1.7 Kontrollexperimente mit der phosphataseinaktiven Mutante SPP1^{H208A}

Um proteomische Effekte einer SPP1 Überexpression auszuschließen, wurde eine zusätzliche Versuchsreihe mit Kontrollexperimenten durchgeführt. Hierfür wurde eine phosphataseinaktive Mutante (SPP1^{H208A}) transfiziert und anschließend das gleiche funktionelle Versuchsprotokoll durchgeführt. Hierbei ergaben sich weder bei Calciumsensitivität und myogener Vasokonstriktion noch bei der Vasokonstriktion auf exogenes S1P Unterschiede zu den GFP-Kontrollgefäßen (Kontrolle n=5, SPP1^{H208A} Gruppe n=8) (Abb. 09 a-d).

4. Ergebnisse

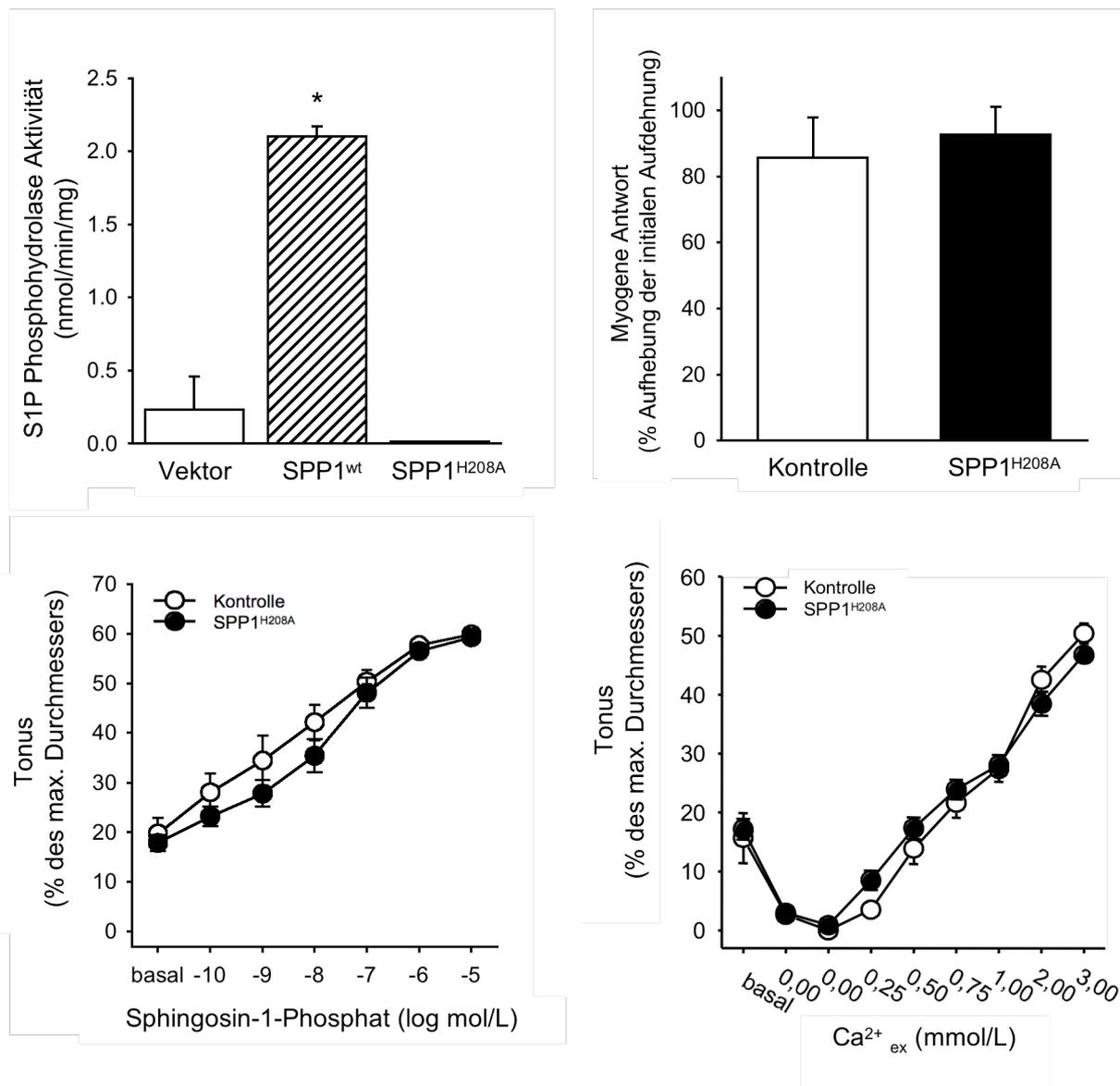


Abb. 09: Grafische Darstellung der Kontrolleexperimente mit SPP1^{H208A}. (a) Für die Expression der SPP1^{H208A} Mutante in HEK293 Zellen konnte keine Phosphatase Aktivität in verschiedenen Membranfraktionen nachgewiesen werden. Hierbei dienten Zellen, die mit wild-type SPP1 oder einem leeren pcDNA3 Vektor transfiziert wurden, als positive bzw. negative Kontrollen (jeweils n=3). (* entspricht p<0,05 im Vergleich mit der negativen Kontrolle.) In Widerstandsarterien hatte die Expression von SPP1^{H208A} keinerlei Effekte auf die (b) myogene Vasokonstriktion, (c) Durchmesser/Ca²⁺ Verhältnis oder (d) die Dosis-Wirkungskurve von exogenem S1P (Kontrolle n=5, SPP1^{H208A} Gruppe n=8).

4.1.8 Immunhistochemische Lokalisation der SPP1

Die beschriebenen Effekte der SPP1 bei Zugabe von exogenem S1P unterstützten die Hypothese einer Ektophosphataseaktivität der SPP1. Für eine immunhistochemische Lokalisation wurden acht Widerstandsarterien mit einem SPP1-Konstrukt transfiziert, welches durch ein „c-myc tag“ markiert war. Hierdurch war es möglich, die transfizierten SPP1-c-myc-Konstrukte mit spezifischen Antikörpern gegen c-myc zu färben und zu lokalisieren. Die anschließende immunhistochemische Färbung zeigte in allen acht Arterien eine zytosolische Verteilung. Weiterhin ließ sich anhand der Fluoreszenzsignale eine Membran - assoziierte Lokalisation der SPP1 in den glatten Muskelzellen vermuten (Abb. 10).

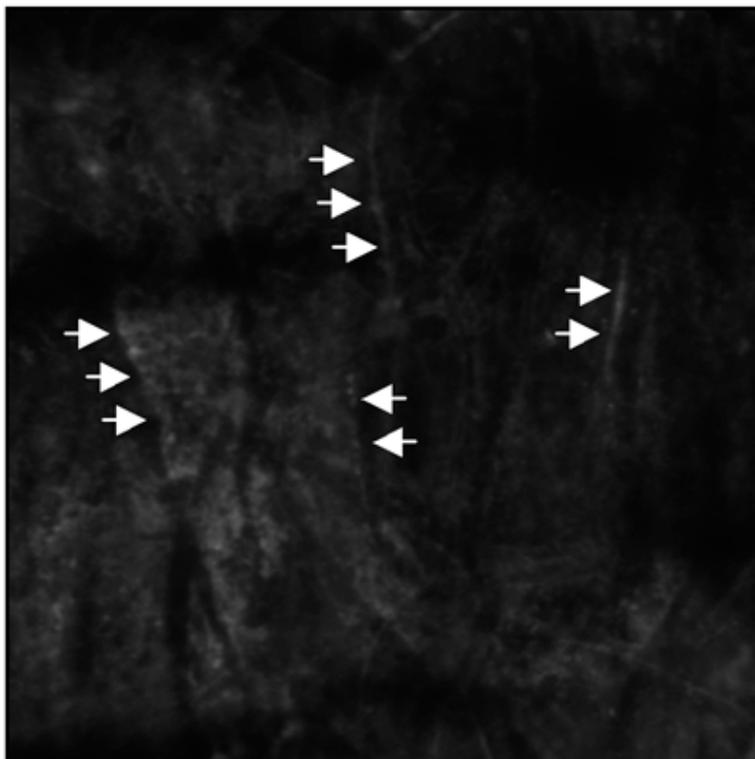


Abb. 10: **Repräsentative Immunlokalisierung der SPP1 in VSMC.** Nach Transfektion der Widerstandsarterien mit einem c-myc tag/SPP1 Konstrukt wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen dieses Konstrukt eine Immunlokalisierung von SPP1 vorgenommen. Die Abbildung 10 zeigt ein repräsentatives konfokales Schnittbild von Widerstandsarterien und die Verteilung von SPP1 innerhalb der zirkulär angeordneten glatten Muskelzellen. Die dargestellten Fluoreszenzsignale lassen eine Lokalisation sowohl im Zytosol als auch in Zellmembranen vermuten.

4.2 Bedeutung der Serin 225 Phosphorylierung der Sphingosinkinase 1 in glatten Muskelzellen für ihre biologische Wirkung in Widerstandsarterien

Die Sphingosinkinase 1 ist wesentlich an der Tonusregulierung in Widerstandsarterien beteiligt (Bolz *et al.*, 2003a). Die Aktivierung der Sphingosinkinase 1 durch Phosphorylierung am Serin 225 bewirkt auch ihre Translokation an die Zellmembran (Pitson *et al.*, 2003; Pitson *et al.*, 2005). Da die Sphingosinkinase 1 unabhängig vom Phosphorylierungszustand eine gewisse Basalaktivität zeigt (Pitson *et al.*, 2000), war unsere Vermutung, dass nicht nur die absolute Menge des gebildeten S1P sondern auch die räumliche Verteilung von S1P und damit die Translokation der Sphingosinkinase 1 entscheidend für die vaskulären Effekte sein könnte. Diese Hypothese sollte mit Hilfe von verschiedenen Sphingosinkinase 1 Mutanten überprüft werden.

4.2.1 Auswirkungen einer Ausschaltung der Serin 225 Phosphorylierbarkeit auf die Translokation der Sphingosinkinase an die Zellmembran

Bei Hinweisen für eine Beteiligung der Sphingosinkinase 1 an der Entstehung der myogenen Vasokonstriktion wurde in einer ersten Versuchsreihe untersucht, ob die schnelle transmurale Druckerhöhung von 45 mmHg auf 110 mmHg im Rahmen der myogenen Antwort eine Translokation der mit GFP markierten Sphingosinkinase 1 (GFP-Sk) an die Zellmembran auslöst. Um eine mögliche Bedeutung der Phosphorylierung am Serin 225 im Translokationsprozeß der Sphingosinkinase zu überprüfen, wurden in einer weiteren Versuchsreihe Widerstandsarterien mit einer nicht phosphorylierbaren Sphingosinkinase 1 Mutante GFP-SK^{S225A} transfiziert und anschließend ebenfalls einer transmuralen Druckerhöhung ausgesetzt. Unter physiologischen Druckbedingungen von 45 mmHg war bei beiden Versuchsreihen jeweils eine homogene Fluoreszenzverteilung im Zytosol der glatten Muskelzellen zu

4. Ergebnisse

erkennen. In Widerstandsarterien, die zuvor mit der GFP-Sk transfiziert wurden, bewirkte die Druckerhöhung eine Umverteilung der Fluoreszenzsignale vom Zytosol an die Zellmembran, vereinbar mit einer Translokation der GFP markierten Sphingosinkinase 1. In glatten Muskelzellen von Widerstandsarterien, die zuvor mit der nicht phosphorylierbaren GFP-Sk Mutante (GFP-Sk^{S225A}) transfiziert wurden, konnten nach Erhöhung des Drucks keine membranbetonten Fluoreszenzmuster sondern weiterhin eine diffuse, zytosolische Verteilung des Fluoreszenzsignals beobachtet werden (Abb. 11 a-c).

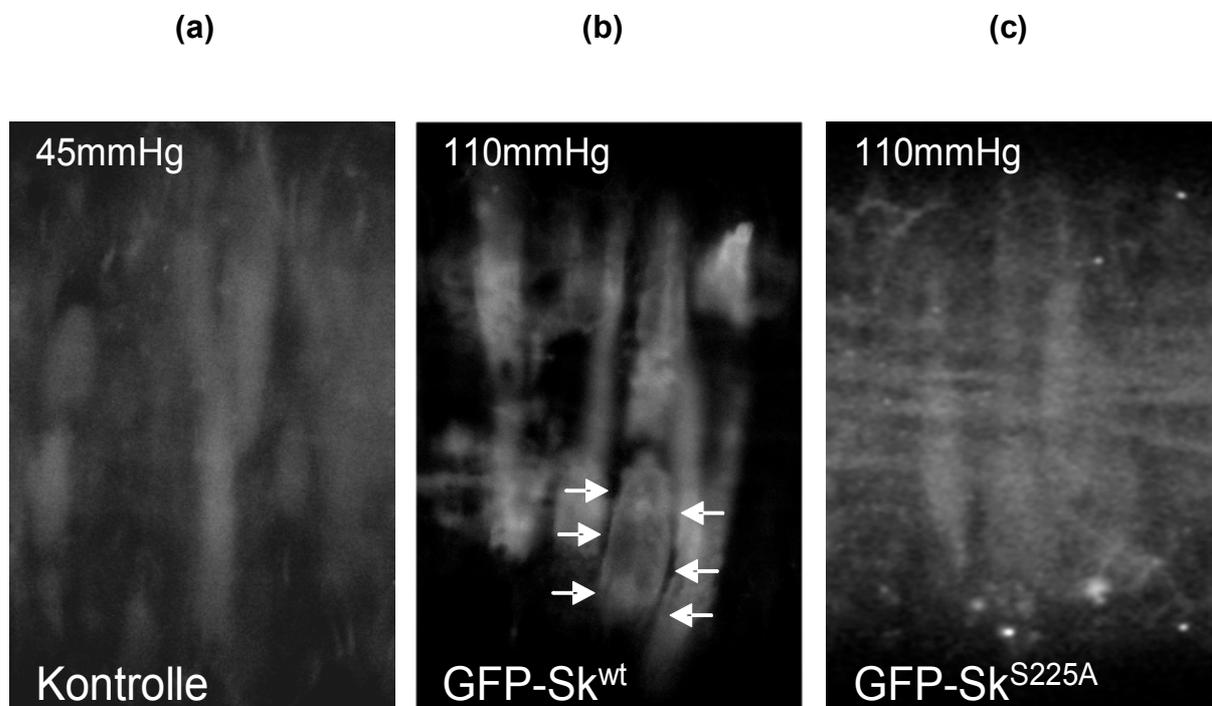


Abb. 11: Repräsentative konfokale Schnittbilder von Widerstandsarterien vor und zwei Minuten nach Druckerhöhung von 45mmHg auf 110mmHg. Bei intramuralischen 45mmHg zeigt sich eine homogene zytosolische Verteilung der GFP-Sk^{wt} (a). Nach Druckerhöhung auf 110mmHg ist in Widerstandsarterien, die mit GFP-Sk^{wt} transfiziert wurden, eine verstärkte Fluoreszenz an der Plasmamembran zu beobachten (b), nicht jedoch in den GFP-Sk^{S225A}-transfizierten Gefäßen (c).

4.2.2 Funktionelle Effekte der Sk^{S225A} auf den Ruhetonus und die basale Calciumkonzentration in Widerstandsarterien

In der folgenden Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob sich eine verhinderte Translokation und damit eine veränderte räumliche Verteilung der Sphingosinkinase 1 auf den Ruhetonus und die basalen Calciumspiegel auswirkt.

Nach Transfektion der Widerstandsarterien mit der nicht phosphorylierbaren Mutante Sk^{S225A} wurde ein im Vergleich zu den GFP Kontrollgefäßen (n=11) signifikant verringerter Ruhetonus in den Widerstandsarterien beobachtet (% des maximalen Durchmessers (dia_{max}) GFP: 17±2%, n=11 vs. Sk^{S225A}: 4±1%, p<0,05; n=7; Abb. 12 (a)). Neben diesem verringerten Ruhetonus konnten deutlich reduzierte Ruhecalciumspiegel in den Sk^{S225A} Arterien gemessen werden (Ratios F_{350nm}/F_{380nm}: GFP: 0,8±0,02; n=11 vs. Sk^{S225A}: 0,6±0,07; p<0,05; n=7; Abb. 12 (b)). Die maximalen Durchmesser der beiden verglichenen Versuchsgruppen zeigten keine Unterschiede (dia_{max} GFP: 208±13µm, n=11 vs. dia_{max} Sk^{S225A}: 212±3µm, p>0,05; n=7).

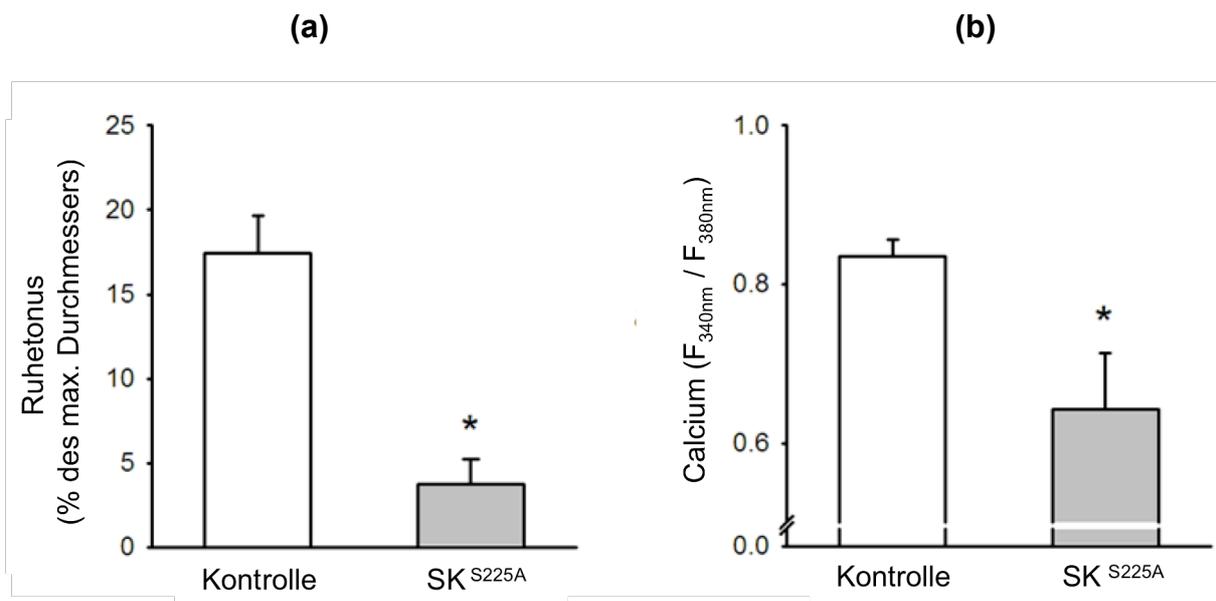


Abb. 12: Grafische Darstellung des Ruhetonus und der basalen Calciumspiegel. Im Vergleich zu den GFP Kontrollgefäßen (n=11) zeigten Widerstandsarterien, die das Sk^{S225A} Konstrukt exprimierten (n=7), einen signifikant reduzierten (a) Ruhetonus (gemessen als % des maximalen Durchmessers) und (b) basalen intrazellulären, glattmuskulären Calciumspiegel. (* entspricht p<0,05 im Vergleich mit der GFP-transfizierten Kontrolle.)

4.2.3 Einfluss der Sk^{S225A} auf die Calciumsensitivität

Die calciumsensitivierende Wirkung von S1P in den untersuchten isolierten Widerstandsarterien ist überwiegend S1P₂ rezeptorvermittelt (Peter *et al.*, 2008), so dass Alterationen der extrazellulären S1P Bioverfügbarkeit auch einen Einfluss auf die Calciumsensitivität haben müssten. Über welchen Mechanismus S1P in den Extrazellulärraum gelangt, ist bisher nicht hinreichend geklärt. Eine unserer Überlegungen war, dass die Translokation der Sphingosinkinase 1 ein entscheidender Schritt für die Freisetzung von S1P in den Extrazellulärraum sein könnte, um so die rezeptorvermittelten auto- und parakrinen Wirkungen zu steuern. Weiterhin könnte die Translokation der Sphingosinkinase 1 auch erforderlich sein, um an das für die Generierung von S1P benötigte Substrat Sphingosin zu gelangen.

4. Ergebnisse

Die Hypothese war demnach, dass die verhinderte Translokation eine verringerte S1P Produktion und Freisetzung in den Extrazellulärraum zur Folge haben könnte und somit die Calciumsensitivität des kontraktile Apparates beeinflusst wird. Um dies zu überprüfen, wurden die depolarisierten Widerstandsgefäße (120mmol/L K^+) steigenden extrazellulären Calciumkonzentrationen ausgesetzt (Ca^{2+} von 0 bis 3 mmol/L) und die entsprechenden Durchmesseränderungen gemessen.

Hierbei zeigte sich, dass die mit der Sk^{S225A} Mutante transfizierten Widerstandsarterien ($n=7$) eine signifikante Rechtsverschiebung in ihrer Calciumsensitivität aufwiesen verglichen mit den GFP-Kontrollgefäßen ($n=11$) (Abb. 13).

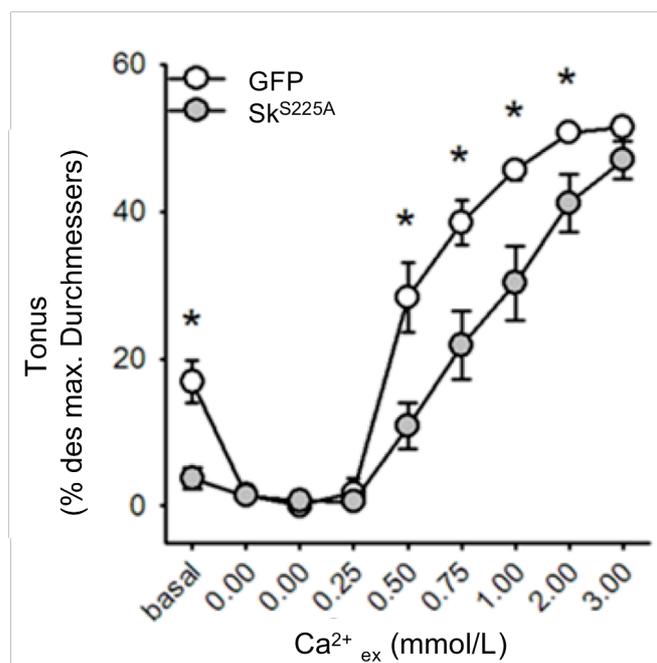


Abb. 13: Graphische Darstellung der Calciumsensitivität. Im Vergleich zu den GFP Kontrollgefäßen ($n=11$) weisen die mit dem Sk^{S225A} Konstrukt transfizierten Widerstandsarterien ($n=7$) unter depolarisierten Bedingungen (120mmol/L K^+) eine deutlich abgeschwächte Vasokonstriktion in Folge steigender extrazellulärer Calciumkonzentrationen ($\text{Ca}^{2+}_{\text{ex}}$ von 0 bis 3 mmol/L) auf. (* entspricht $p < 0,05$ im Vergleich mit der GFP-transfizierten Kontrolle.)

4.2.4 Bedeutung der Serin 225 Phosphorylierung und der Translokation der Sphingosinkinase 1 für die myogene Vasokonstriktion

In der folgenden Versuchsreihe wurde der Einfluss der Translokation der Sphingosinkinase 1 auf die myogene Vasokonstriktion untersucht. Hierfür wurde der transmurale Druck von 45 mmHg auf 110 mmHg erhöht. Die mit der SK^{S225A} Mutante transfizierten Widerstandsarterien zeigten hierbei eine deutlich geringere myogene Vasokonstriktion und eine Abschwächung des damit verbundenen druckinduzierten Calciumanstiegs im Vergleich zu den GFP-transfizierten Kontrollgefäßen (prozentuale Aufhebung der initialen Aufdehnung (AIA) in Sk^{S225A}: 25±7%, n=7 vs. 118±14%, n=11 in GFP-Arterien, n=11; p<0,05: Abb. 14 (a) und (b)).

4.2.5 Funktionelle Effekte einer membranfixierten, nicht phosphorylierbaren Sphingosinkinase Mutante (mp-Sk^{S225A}) in Widerstandsarterien

Um zu überprüfen, ob die unter 4.2.2 bis 4.2.4 beschriebenen funktionellen Defizite der nicht-phosphorylierbaren Sphingosinkinase Mutante (Sk^{S225A}) durch eine strukturelle Fixierung an der Membran wiederhergestellt werden könnten, wurden die isolierten Widerstandsarterien mit der Sphingosinkinase Mutante mp-Sk^{S225A} transfiziert. Mit Hilfe dieses 10-Aminosäure Lck-Tyrosin-Kinase mp Motivs wird eine artifizielle Fixierung der Sphingosinkinase Mutante an der Plasmamembran erreicht und somit der Mechanismus der Translokation potentiell umgangen (Pitson *et al.*, 2005).

Die Transfektion der Widerstandsarterien mit mp-Sk^{S225A} Mutanten bewirkte eine Erhöhung des Ruhetonus im Vergleich zu den Sk^{S225A} Arterien, erreichte jedoch nicht den ursprünglichen Ruhetonus der GFP-transfizierten Gefäße (mp-Sk^{S225A}: 10±3%, n=7 vs. GFP: 17±2%, n=11; p<0,05) (Abb. 15 (a)). Der beobachtete

4. Ergebnisse

Ruhtonus in den mp-Sk^{S225A} Gefäßen war allerdings mit einem vollständig wiederhergestellten Ruhecalciumspiegel assoziiert (Abb. 15 (b)).

In depolarisiertem Zustand und bei schrittweiser Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration zeigten die mp-Sk^{S225A} Arterien außerdem eine noch geringere Calciumsensitivität als die mit Sk^{S225A} transfizierten Widerstandsarterien (Abb. 15 (c)).

Die myogene Vasokonstriktion in diesen Gefäßen (Aufhebung der initialen Aufdehnung (AIA) $39 \pm 16\%$, $n=7$) war signifikant schwächer als in den Kontrollgefäßen (AIA_{GFP}: $118 \pm 14\%$, $n=11$), unterschied sich jedoch nicht signifikant von den Sk^{S225A} Arterien (Abb. 14 (a)). Allerdings konnte im Hinblick auf den Calciumspiegel ein druckinduzierter Anstieg auf Kontrollniveau beobachtet werden (Abb. 14 (b)).

4.2.6 Funktionelle Effekte einer membranfixierten, *wild-type* Sphingosinkinase (mp-Sk^{wt}) in Widerstandsarterien

Durch Transfektion der Widerstandsarterien mit einer membranfixierten, wild-type Sphingosinkinase Mutante mp-Sk^{wt} wurde untersucht, inwieweit bei struktureller Membranlokalisation die Aktivierbarkeit der Sphingosinkinase 1 eine funktionelle Bedeutung besitzt. Von Interesse war hierbei ebenfalls ob die zuvor beobachteten funktionellen Defizite der verschiedenen Sphingosinkinase Mutanten (mp-Sk^{S225A} und Sk^{S225A}) vollständig wiederhergestellt werden können. Als Membrananker wurde hierbei ebenso ein mp-Motiv verwendet. Durch Transfektion dieser phosphorylierbaren und damit aktivierbaren Sphingosinkinase 1 wurde die Funktion der Phosphorylierungsstelle im Rahmen der Translokation durch den Membrananker umgangen. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe wurden verglichen mit den

4. Ergebnisse

Widerstandsarterien, die zuvor mit den SK1^{S225A} und der membranfixierten mp-Sk^{S225A} Mutanten transfiziert wurden.

Der Ruhetonus in den mp-Sk^{wt} exprimierenden Arterien (11±3%, n=6) war deutlich verringert verglichen mit den Kontrollgefäßen (GFP: 17±2%, n=11) (Abb. 15 (a)). Im Vergleich zu den mp-Sk^{S225A} Arterien bestand allerdings kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Ruhetonus. Vergleichbar mit den Gefäßen, die mit der mp-Sk^{S225A} Mutante behandelt wurden, konnte in den mp-Sk^{wt} Arterien ein vollständig wiederhergestellter intrazellulärer Ruhecalciumspiegel beobachtet werden (Ratios F_{350nm}/F_{380nm} : 0,78±0,04; n=6) (Abb. 15 (b)).

Ähnlich den Ergebnissen der mp-Sk^{S225A} Gefäße besaßen die mit mp-Sk^{wt} transfizierten Widerstandsarterien eine signifikant reduzierte Calciumsensitivität im Vergleich zu den GFP-Kontrollgefäßen (Abb. 15 (c)). Die myogene Vasokonstriktion konnte auch durch Transfektion der mp-Sk^{wt} Mutante nicht zu den GFP-Kontrollwerten aufschließen, sie erreichte allerdings höhere Werte als die mp-Sk^{S225A} Gefäße. (AIA: mp-Sk^{wt}: 80±8%, n=6 vs. GFP: 118±14%, n=11, p<0,05; Abb. 14(a)). Die myogene Vasokonstriktion dieser Widerstandsarterien war jedoch begleitet von einem signifikant höheren druckinduzierten Calciumanstieg im Vergleich zu der GFP-Kontrollgruppe (Abb. 14 (b)).

4.2.7 Grafische Zusammenfassung der Effekte auf die druckinduzierte myogene Vasokonstriktion von Widerstandsarterien nach Behandlung mit unterschiedlichen Sphingosinkinase Mutanten.

Die unter 4.2.4 bis 4.2.6 dargelegten Befunde zur Beeinflussung der myogenen Antwort nach Behandlung der Widerstandsgefäße mit unterschiedlichen Mutanten der Sphingosinkinase 1 sind in den folgenden Abbildungen (Abb. 14 (a) und (b)) grafisch zusammengefasst.

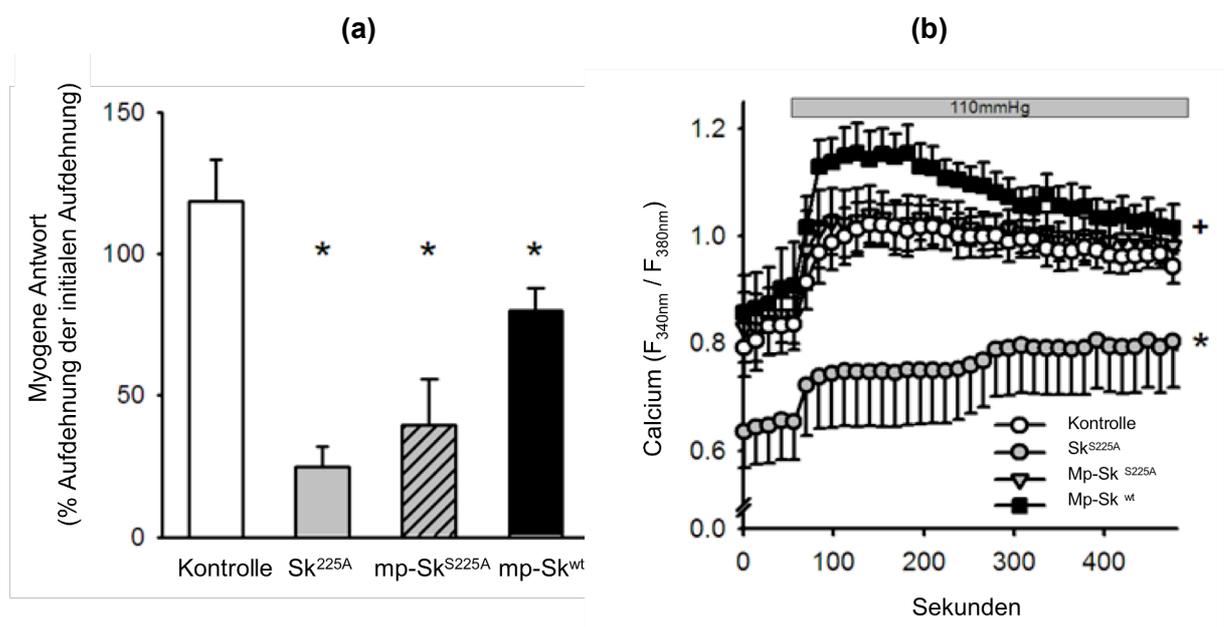


Abb. 14: (a) **Grafische Darstellung der myogenen Vasokonstriktion.** Die myogene Vasokonstriktion (gemessen als prozentuale Aufhebung der initialen Aufdehnung infolge der Druckerhöhung von 45mmHg auf 110mmHg) wurde durch Expression aller Sk1 Mutanten (n=7 für Sk^{S225A}, n=6 für mp-Sk^{wt} und n=7 für mp-Sk^{S225A}) signifikant reduziert. (* entspricht p<0,05 im Vergleich mit der GFP-transfizierten Kontrolle (n=11))

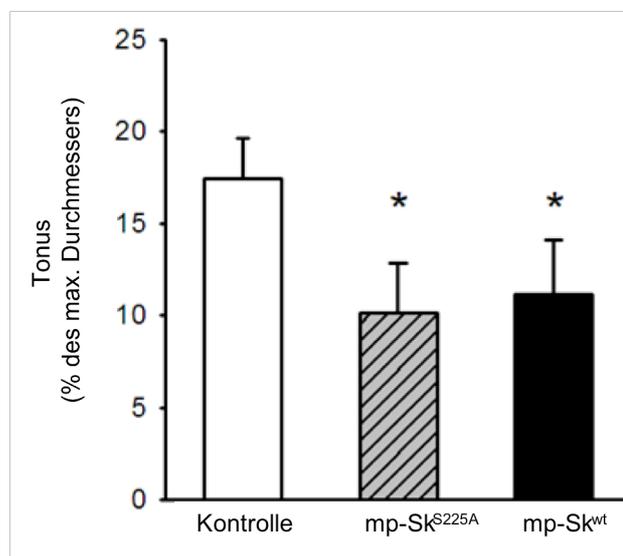
(b) **Grafische Darstellung des druckinduzierten Calciumanstiegs während der myogenen Vasokonstriktion.** Die Expression der Sk^{S225A} Mutante hatte eine signifikant reduzierte druckinduzierte Erhöhung des Calciums zur Folge. Die Expression der mp-Sk^{S225A} Mutante hatte keinen Effekt auf die druckinduzierte Calciumerhöhung, während in Gefäßen, die das mp-Sk^{wt} Konstrukt exprimierten, ein signifikant erhöhter initialer, druckinduzierter Calciumanstieg zu verzeichnen war. (* entspricht signifikant reduziertem Calcium (p<0,05) im Vergleich zu allen anderen Gruppen; + entspricht signifikant erhöhtem initialen Calciumanstieg in der mp-Sk^{wt} Gruppe im Vergleich zur GFP-Kontrollgruppe) (n=11 für GFP; n=7 für Sk^{S225A}, n=6 für mp-Sk^{wt}; n=7 für mp-Sk^{S225A})

4. Ergebnisse

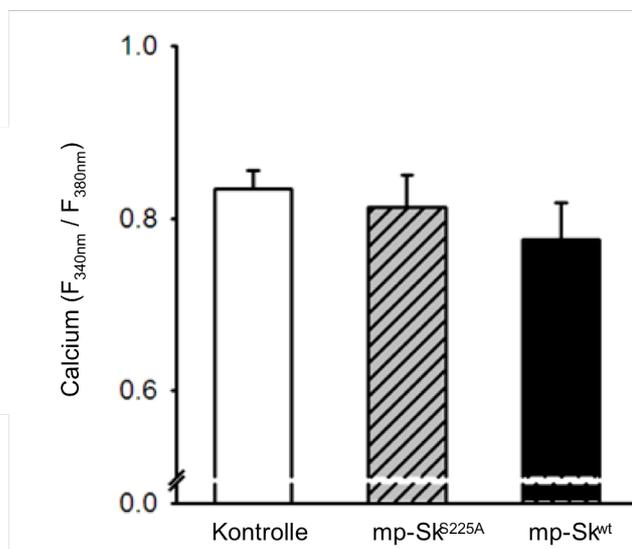
4.2.8 Grafische Zusammenfassung der funktionellen Effekte der mp-Sk^{S225A} und der mp-Sk^{wt} Mutanten in Widerstandsarterien

Die unter 4.2.5 und 4.2.6 dargelegten Befunde zur Beeinflussung funktioneller Effekte durch die Expression der membranfixierten, nicht phosphorylierbaren Sphingosinkinase (mp-Sk^{S225A}) sowie der membranfixierten *wild-type* Sphingosinkinase (mp-Sk^{wt}) sind in den folgenden Abbildungen (Abb. 15 (a), (b), (c)) zusammengefasst.

(a)



(b)



(c)

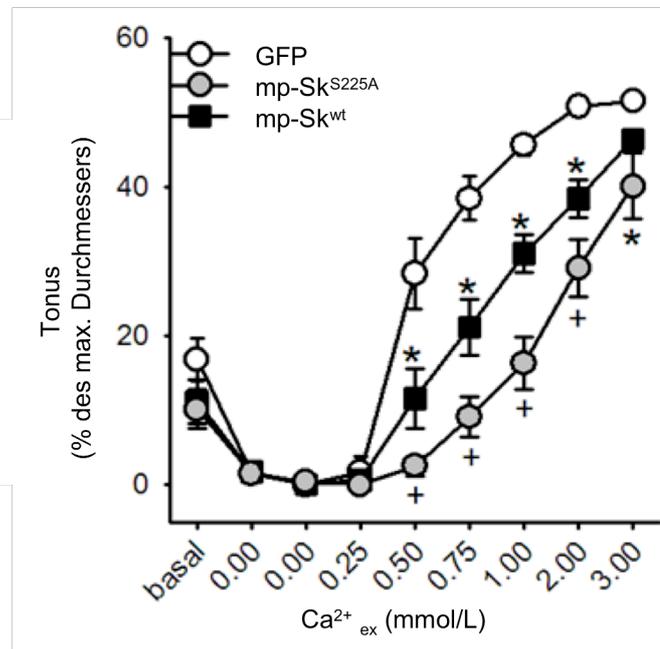


Abb. 15: Grafische Darstellung der funktionellen Effekte von membranverankerten Sphingosinkinase 1 Konstrukten. (a) In Gefäßen, die eines der beiden membranverankerten Sphingosinkinase 1 Konstrukte (mp-Sk^{S225A}, n=7; mp-Sk^{wt}, n=6) exprimierten, konnte ein signifikant reduzierter Ruhetonus beobachtet werden. (b) Nach Transfektion der Widerstandsarterien mit einer der beiden membranverankerten Mutanten (mp-Sk^{S225A} und mp-Sk^{wt}) unterschied sich der basale intrazelluläre Calciumspiegel der glatten Muskelzellen nicht signifikant von den Kontrollgefäßen (c) Die Vasokonstriktion auf schrittweise Erhöhung des extrazellulären Calciums unter depolarisierten Bedingungen wurde durch die Expression von mp-Sk^{S225A} und mp-Sk^{wt} signifikant reduziert, wobei die mp-Sk^{S225A} Mutante eine signifikant stärkere Reduktion hervorrief als die mp-Sk^{wt} Mutante. (* entspricht p<0,05 im Vergleich mit der GFP-transfizierten Kontrolle; + entspricht p<0,05 verglichen mit allen anderen Gruppen. n=11 für GFP; n=6 für mp-Sk^{wt}; und n=7 für mp-Sk^{S225A})

4.2.9 Funktionelle Effekte des MEK Inhibitors PD98059

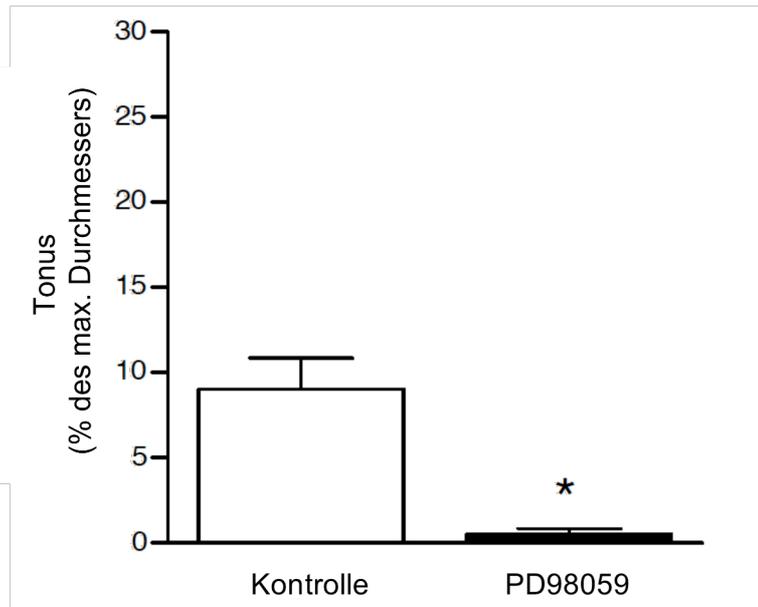
Die Arbeitsgruppe von Pitson et al. konnte nachweisen, dass ERK 1/2 verantwortlich für eine Phosphorylierung der Sphingosinkinase am Serin 225 ist (Pitson *et al.*, 2003). Die deutlichen funktionellen Effekte der mit Sk^{S225A} behandelten Gefäße in den vorherigen Experimenten legen eine Mitbeteiligung von ERK 1/2 nahe. Um dies zu untersuchen, wurden kultivierte, nicht transfizierte Widerstandsarterien mit verschiedenen Konzentrationen des selektiven MEK Inhibitors PD98059 inkubiert. Dudley et al. konnten für PD98059 (IC₅₀ ~ 10µM) sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine selektive Hemmung von MEK 1/2 nachweisen (Alessi *et al.*, 1995; Dudley *et al.*, 1995). Die Vermutung war demnach, dass eine Hemmung von ERK 1/2 mittels PD98059 zu ähnlichen funktionellen Effekten führen müsste wie sie zuvor in den Sk^{S225A} Gefäßen beobachtet wurden.

Der chemische MEK Inhibitor PD98059 (10µmol/L für 30 Minuten inkubiert) reduzierte dosisabhängig signifikant sowohl Ruhetonus und Ruhecalciumspiegel als auch die myogene Vasokonstriktion und den druckinduzierten Calciumanstieg (AIA: pre-PD98059: 105±6%; 10µmol/L PD98059: 41±8%, 100µmol/L PD98059: 15±9%, n=6, Abb. 16). Die Vasokonstriktion nach Zugabe von 0,3µmol/L Noradrenalin (gemessen in vier von sechs Gefäßen) war nach Behandlung durch den MEK Inhibitor variabel, jedoch insgesamt nicht signifikant verändert. Nach Inkubation mit 10µmol/L PD98059 (für 30 Minuten) kam es bei zwei von vier Gefäßen nach Zugabe von 0,3µmol/L Noradrenalin zu einer starken Vasokonstriktion, wohingegen die zwei anderen Gefäße eher schwach reagierten (prä-PD: 48±2%, n=4; PD10µmol/L: 34±7% (14%,32%,43%,48%), n=4, p>0.05). Bei höheren Konzentrationen von PD98059 (100µmol/L, 30 Minuten) fand sich eine deutliche Inhibition der Noradrenalin-induzierten Vasokonstriktion in allen Gefäßen (PD100µmol/L: 5±3%;

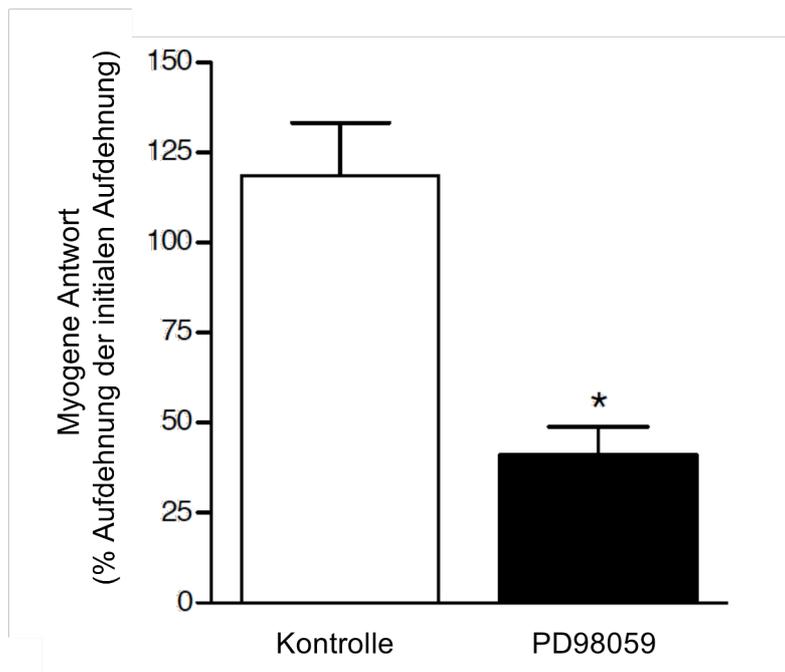
4. Ergebnisse

n=4, p<0.05). Die Vasodilatation nach Zugabe von 3 μ mol/L Acetylcholin war bei keiner der beiden MEK Inhibitor Konzentrationen beeinträchtigt.

(a)



(b)



(c)

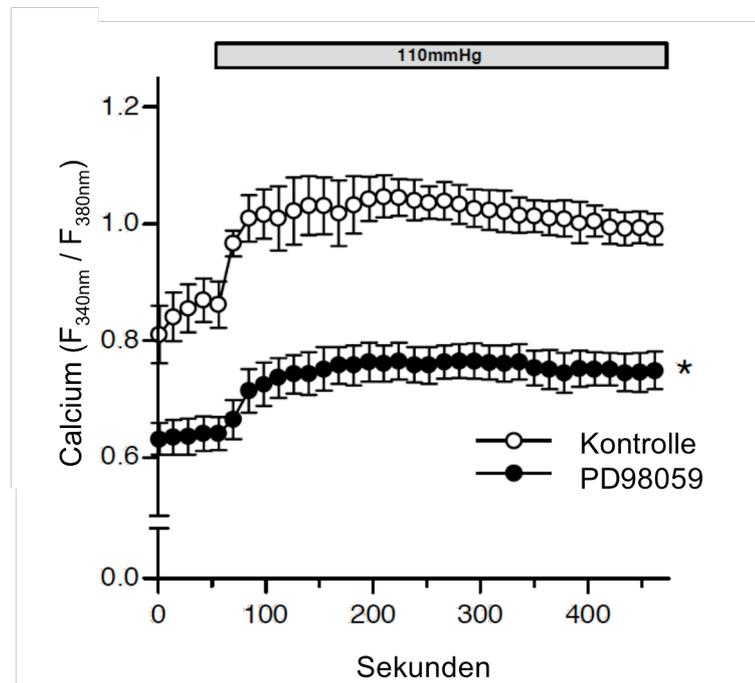


Abb. 16: Grafische Darstellung der funktionellen Effekte des MEK Inhibitors PD98059. Nach Inkubation mit dem MEK Inhibitor PD98059 (10 μ mol/L für 30 Min. inkubiert) dokumentierte sich ein (a) reduzierter Ruhetonus und (b) eine verringerte myogene Vasokonstriktion. (c) Die Behandlung mit PD98059 reduzierte zudem signifikant die Ruhe- und druckinduzierten Calciumspiegel, (* entspricht $p < 0,05$ für den Vergleich der Kontrolle (prä-PD98059) und der PD98059 behandelten Gefäße, $n=6$.)

5. Diskussion

Bereits in der Vergangenheit wurden durch unsere Arbeitsgruppe tonusmodulierende Wirkungen von S1P an VSMC von isolierten Widerstandsarterien nachgewiesen. Neben einer Erhöhung des Ruhetonus und der myogenen Vasokonstriktion (Bolz *et al.*, 2003a) zeigte sich, dass S1P an VSMC durch Inhibition der MLCP die Sensitivität für endogene vasodilatative Substanzen wie NO reduziert (Bolz *et al.*, 2003b). S1P wird von der Sphingosinkinase 1 gebildet und vorwiegend von der SPP1 abgebaut, so dass Aktivitätsänderungen beider Enzyme die Höhe des verfügbaren S1P Spiegels und damit die relative Rolle von S1P als Modulator des Gefäßtonus entscheidend bestimmen dürften.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten wir erste Hinweise liefern, dass Alterationen in den S1P Abbaumechanismen durch Expressionsänderungen der SPP1 zu wesentlichen funktionellen Effekten führen, welche antagonistisch zu den Wirkungen der Sphingosinkinase 1 sind und durch Änderungen der S1P Spiegel erklärt werden können. Am Modell von isolierten Widerstandsgefäßen konnten wir nachweisen, dass die SPP1 in VSMC an der Regulierung des vaskulären Tonus und der Calciumsensitivität beteiligt ist und vermutlich als funktioneller Antagonist der Sphingosinkinase 1 agiert. Weiterhin konnten wir zeigen, dass die zu beobachtenden Effekte der Sphingosinkinase 1 in VSMC eindeutig von ihrer subzellulären Lokalisation und Modulierbarkeit durch Phosphorylierung am Serin 225 abhängen.

Die Untersuchungen in Widerstandsarterien des Hamsters durchzuführen, folgte der Erkenntnis, dass diese kleinen Gefäße einen weitaus größeren Anteil am peripheren Widerstand besitzen als die oftmals untersuchten großen Leitungsgefäße. Das Modell des isolierten Widerstandsgefäßes stellt darüber hinaus ein Bindeglied zwischen Untersuchungen an Zellkulturen und intakten Tieren dar. Dabei gehen auf

der einen Seite die Aussagemöglichkeiten aufgrund der erhaltenen Funktionalität der isolierten Widerstandsgefäße weit über die einer Zellkultur hinaus, spiegeln jedoch nicht die Komplexität des Gesamtorganismus wider, aus dem sie entnommen worden sind. Die Reduktion von unbekanntem Einflüssen des Gesamtorganismus durch Entnahme des Gefäßes erleichtert die Untersuchung eines bestimmten Sachverhaltes, bringt aber auch gleichzeitig Einschränkungen in Hinblick auf die Interpretation der erhobenen Befunde mit sich. Folglich sind Extrapolationen der in diesem Modell erhobenen Befunde auf den Gesamtkreislauf notwendigerweise spekulativ. Sie müssen in einem nächsten Schritt in geeigneten transgenen oder gendefizienten Tiermodellen und danach am Menschen überprüft werden.

Während eine vermehrte Verfügbarkeit von S1P an VSMC zu einer Calciumsensitivierung des kontraktiven Apparates führt, vermittelt S1P an Endothel vasodilatative Wirkungen. Diese Vasodilatation wird über einen endothelial lokalisierten S1P₁ Rezeptor via Protein Kinase B/Akt mit anschließender Aktivierung der eNOS mediert (Morales-Ruiz *et al.*, 2001; Dantas *et al.*, 2003; Igarashi & Michel, 2000; Roviezzo *et al.*, 2006). Durch die von uns durchgeführten Funktionalitätstests (siehe Kapitel 3.14) ist an den untersuchten isolierten Widerstandsgefäßen prinzipiell von einem intakten Endothel und funktionsfähigen VSMCs auszugehen. Dennoch sind die hier vorgestellten Befunde eindeutig auf den Gefäßmuskel zu beziehen.

In früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe erwies sich nämlich die zwischen dem Endothel und den glatten Muskelzellen befindliche Basalmembran als dichte Barriere für das verwendete Transfektionsmittel Effectene®, so dass selektiv entweder die Endothelzellen (nach luminaler Applikation) oder die glatten Muskelzellen (nach

adventitieller Applikation) genetisch modifiziert werden konnten (Bolz *et al.*, 2000a). Die von uns in dieser Arbeit durchweg durchgeführte Transfektion über das Organbad (adventitielle Applikation) führt zu einer selektiven Transfektion der VSMC. Diese Selektivität wurde in den vorliegenden Versuchen lediglich stichprobenartig überprüft. Sie kann jedoch als gegeben angenommen werden, weil zahlreiche frühere Beobachtungen von Widerstandsarterien des gleichen Typs nach Transfektion eines für GFP kodierenden Plasmids mit der gleichen Technik diesen Sachverhalt konstant bestätigten. Mit Hilfe der Schnittbilder des konfokalen Mikroskops konnte hierbei die selektive Expression von GFP in den glatten Muskelzellen überzeugend dargestellt werden (Bolz & Pohl, 2003).

Unspezifische Effekte des verwendeten Transfektionsmittels Effectene[®] wurden ebenfalls in einer früheren Arbeit unserer Gruppe ausgeschlossen, indem wir zeigen konnten, dass die Transfektion eines nicht replizierenden Plasmids mit Effectene[®] und die kontinuierliche Präsenz dieses Substanzgemisches im Kulturmedium die vaskuläre Reaktivität über 27 Stunden nicht beeinträchtigte (Bolz & Pohl, 2003).

Der Expressionsnachweis von SPP1 in isolierten Widerstandsarterien des Hamsters gelang mittels RT-PCR. Auf mRNA Ebene konnten wir somit als erste zeigen, dass die SPP1 in Widerstandsarterien des Hamsters exprimiert ist. Dieser Befund steht im Einklang mit schon veröffentlichten Expressionsanalysen der SPP1, in denen nachgewiesen wurde, dass die SPP1 in gut vaskularisierten Geweben (Niere und Plazenta) hoch exprimiert ist (Johnson *et al.*, 2003; Ogawa *et al.*, 2003). Der direkte Nachweis von SPP1 auf Proteinebene mittels Western Blot gelang dagegen nicht. Die kommerziell erhältlichen und zusätzlich eigens hergestellten Antikörper gegen

SPP1 waren nicht in der Lage, an die entsprechenden Epitope von Proteinlysaten der verschiedenen Hamstergewebe (Arterien, Lunge, Leber, Herz) zu binden.

Die hohe Expression der SPP1 auf mRNA Ebene in den von uns untersuchten Widerstandsarterien legte den Schluss nahe, dass sie eine entscheidende Rolle in der Regulierung der mikrovaskulären S1P Bioverfügbarkeit spielen könnte. Um dies zu überprüfen, wurden die VSMC der Widerstandsgefäße mit SPP1 Plasmiden bzw. SPP1 Antisenseoligonukleotiden behandelt und anschließend funktionell untersucht. Voraussetzung hierfür war die von unserer Arbeitsgruppe entwickelte Kulturmethode für Widerstandsarterien (Bolz *et al.*, 2000b). Diese ermöglichte es, die Gefäße außerhalb des Körpers für mehr als zwei Tage funktionell und strukturell intakt zu halten und während der Kultur ihre Zellen mit sehr hoher Effizienz selektiv genetisch zu verändern (Bolz & Pohl, 2003). Stichprobenartig wurden transfizierte c-myc oder FLAG-markierte Proteine mit Hilfe der konfokalen Immunfluoreszenz selektiv im glatten Muskel nachgewiesen. Aufgrund der geringen Gewebemassen der isolierten Widerstandsarterien und des mangelnden Bindungsverhaltens der bereits erwähnten Antikörper war keine direkte Beurteilung der endogenen Proteinexpression nach Transfektion mit SPP1 Plasmiden bzw. Einbringen von SPP1 Antisenseoligonukleotiden möglich. Allerdings waren die Unterschiede in der vaskulären Reaktivität der mit SPP1/asSPP1 bzw. Mutanten der Sphingosinkinase 1 transfizierten Widerstandsgefäße im Vergleich zur Kontrollgruppe hochsignifikant und die statistische Streuung in den jeweiligen Gruppen sehr gering. Diese hohe Stabilität der Effekte kann wiederum als Folge einer konstant hohen Transfektionseffizienz interpretiert werden.

Nach Transfektion der Widerstandsarterien mit SPP1 bzw. asSPP1, wurden die gleichen Parameter gemessen wie in vorangegangenen Experimenten mit der Sphingosinkinase 1 (Bolz *et al.*, 2003a). Die beobachteten Effekte einer Überexpression von SPP1 in transfizierten Widerstandsarterien waren vergleichbar mit den zuvor berichteten nach Inhibition der Sphingosinkinase 1 (Bolz *et al.*, 2003a). Neben einer signifikanten Reduktion des Ruhetonus und der basalen Calciumkonzentration konnte ebenso eine Reduktion der myogenen Vasokonstriktion und der Calciumsensitivität beobachtet werden. In Übereinstimmung mit der aufgestellten Hypothese übernimmt die SPP1, unter Berücksichtigung der untersuchten Parameter, somit die Rolle eines funktionellen Antagonisten der Sphingosinkinase 1 in isolierten Widerstandsarterien.

Um zu überprüfen, ob diese Effekte tatsächlich auf eine veränderte Expression von SPP1 zurückgeführt werden können, wurde in einer anschließenden Versuchsreihe die Expression der SPP1 durch Transfektion von Antisenseoligonukleotiden auf mRNA Ebene verringert. Diese Methode ist in unserem Labor bereits erfolgreich zur Analyse der endothelialen Cytochrom P₄₅₀-Isoform angewendet worden, welche den endothelabhängigen hyperpolarisierenden Faktor synthetisiert (Bolz *et al.*, 2000a). Antisenseoligonukleotide sind unmodifizierte oder chemisch modifizierte Einzelstrang-DNA-Moleküle mit einer Länge von 13-25 Nukleotiden. Sie verhindern die Translation der mRNA, indem sie sich an diese binden und über eine Aktivierung der RNase H die mRNA zerstören (Baertschi, 1994). Antisenseoligonukleotide können so modifiziert werden, dass eine ausreichende Stabilität gegenüber abbauenden Enzymen gewährleistet ist. Der beschriebene Prozess wiederholt sich innerhalb eines bestimmten Zeitraums und führt so zu einer Reduktion des mRNA Expressionslevels. Aus den bereits angeführten Gründen konnten wir wiederum nicht

5. Diskussion

direkt nachweisen, dass die Antisense-Behandlung tatsächlich zu einer Reduktion der SPP1 Expressionslevel und einer Zunahme der S1P Spiegel führte. Jedoch hatte die Behandlung mit Antisenseoligonukleotiden genau gegenteilige Effekte zur Überexpression der SPP1: der Ruhetonus zeigte sich in diesen Arterien erhöht, ebenso die myogene Antwort und die vasokonstriktorisches Effekte auf exogen appliziertes S1P. So plausibel diese Erklärungen sind, so muss doch darauf hingewiesen werden, dass mit einer Überexpression oder dem funktionellen Knockout der SPP1 auch Änderungen des Substrats Sphingosin bzw. der Vorstufe Ceramid einhergehen könnten. Somit lassen sich insbesondere eventuelle Effekte von Ceramid bei den beobachteten Befunden derzeit nicht ausschließen.

Interessanterweise beeinträchtigte die Inhibition der SPP1 mit Antisenseoligonukleotiden die basalen Calciumspiegel nicht signifikant. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass andere, intrazelluläre S1P-degradierende Enzyme den Verlust der SPP1 kompensieren und so die Auswirkungen auf die basalen Calciumspiegel minimieren. In diesem Zusammenhang könnten beispielsweise die intrazellulär lokalisierte SPP2 beziehungsweise die S1P Lyase in Frage kommen. Diese S1P abbauenden Enzyme könnten neben verschiedenen subzellulären Lokalisationen auch unterschiedliche konzentrationsabhängige Wirkungsbereiche besitzen und somit erst bei höheren S1P Konzentrationen aktiviert werden. Weiterhin wäre auch denkbar, dass die SPP1 durch Einbringen der Antisenseoligonukleotide nicht vollständig gehemmt wird.

Dagegen wurden, ähnlich den Effekten einer Inhibition der Sphingosinkinase 1 durch Expression eines dominant negativen Konstrukts (Sk1^{G82D}) (unveröffentlichte Daten), nach erhöhter SPP1 Expression reduzierte basale Calciumspiegel beobachtet. Da

die calciummobilisierenden Effekte vor allem intrazellulärem S1P zugeschrieben werden, könnte die beobachtete Reduktion des basalen Calciumspiegels durch einen vermehrten intrazellulären Abbau von S1P erklärt werden. Bisher ist allerdings der genaue Mechanismus, über den intrazelluläres S1P in IP₃ unabhängiger Weise eine Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern hervorruft, nicht vollständig geklärt. Möglicherweise spielt hierbei das von Kindman et al. in SO- und Herzmuskelzellen beschriebene „*sphingolipid Ca²⁺ release-mediating protein of endoplasmic reticulum*“ (SCaMPER), ein durch Sphingosylphosphocholin aktivierter Calciumkanal, eine Rolle. (Kindman et al., 1994; Kim et al., 1995; Mao et al., 1996; Cavalli et al., 2003).

Um zu überprüfen, ob die SPP1 in der Lage ist, rezeptorabhängige Effekte von S1P zu regulieren, wurde die Vasokonstriktion auf exogenes S1P in Kontrollarterien und solchen, die mit SPP1 codierenden Plasmiden und asSPP1 behandelt wurden, gemessen und verglichen. Wie in Abbildung 08 zu sehen, zeigten sich in den behandelten (SPP1, asSPP1) Widerstandsgefäßen unterschiedliche Vasokonstriktionen auf exogen zugeführtes S1P. Die verminderte Vasokonstriktion nach Transfektion von SPP1 und die verstärkte Vasokonstriktion bei Inhibition der SPP1 mit Hilfe von Antisenseoligonukleotiden sind vereinbar mit der Hypothese, dass die SPP1 Zugang zu extrazellulärem S1P besitzt und somit über den extrazellulären Spiegel rezeptorvermittelte S1P Effekte moduliert. Die Befunde lassen folglich eine Ektophosphatase – Eigenschaft der SPP1 in VSMC vermuten.

Diese Überlegungen haben allerdings nur dann Bestand, wenn man davon ausgeht, dass S1P seine vasokonstriktorisches Effekte an vaskulären glatten Muskelzellen rezeptorabhängig ausführt und S1P nicht die Zellmembran permeiert und intrazelluläre Mechanismen in Gang setzt, die möglicherweise ebenfalls eine

Vasokonstriktion zur Folge haben. In vorangegangenen Experimenten konnte unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass die Vasokonstriktionen auf exogenes S1P in Konzentrationsbereichen von 10^{-9} – 10^{-7} mol/L vollständig S1P₂ rezeptorabhängig ist. Bei höheren exogen applizierten S1P Konzentrationen zeigte sich, dass die ausgelösten Vasokonstriktionen nicht mehr ausschließlich S1P₂ rezeptorabhängig waren, da nach Inhibition des S1P₂ Rezeptors auf mRNA Ebene und bei gleichzeitig hohen S1P Konzentrationen nahezu identische Vasokonstriktionen ausgelöst werden konnten (Bolz *et al.*, 2003a; Peter *et al.*, 2008)

Vereinbar mit diesen Vorbefunden wurde hier in SPP1 behandelten Widerstandsarterien eine vollständige Aufhebung der Vasokonstriktionen auf die S1P Konzentrationen 10^{-9} und 10^{-8} mol/L und eine signifikante Abschwächung auf 10^{-7} mol/L beobachtet. In Bereichen, in denen die Vasokonstriktion also vermutlich ausschließlich durch den S1P₂ Rezeptor vermittelt ist, reduziert eine vermehrte Expression der SPP1 die physiologische Reaktion des Blutgefäßes, was ebenfalls ein Argument für eine Ektophosphatasewirkung der SPP1 darstellt. Bei Applikation von noch höheren exogenen S1P Konzentrationen wurde in SPP1 transfizierten Widerstandsarterien, nur noch eine geringe Abschwächung der Vasokonstriktion im Vergleich zu den Kontrollgefäßen gemessen. Diese Effekte von hohen extrazellulären S1P Konzentrationen könnten verschiedene Ursachen haben. Zum einen wäre es denkbar, dass bei hohen extrazellulären Konzentrationen die maximale Abbaukapazität der SPP1 überstiegen wird. Zum anderen könnten infolge der hohen S1P Konzentrationen auch weitere S1P Rezeptor-Subtypen aktiviert werden und zu einer Vasokonstriktion führen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass S1P bei hohen Konzentrationen über eine mechanistisch bisher nicht erklärte Passage die Zellmembran durchdringt und intrazelluläre Mechanismen in Gang setzt,

die ebenfalls vasokonstriktorische Effekte zur Folge haben. Hierbei wäre zum einen denkbar, dass S1P konzentrationsabhängig die Zellmembran durch einen Kanal durchdringen kann: ein ähnlicher Mechanismus wurde bereits für den „cystic fibrosis transmembrane“ (CFT) Rezeptor in C127 Epithelzellen beschrieben (Boujaoude *et al.*, 2001). Aufgrund des polaren Aufbaus von S1P ist ein Durchtritt durch den Membranlipidbilayer mit seiner hydrophoben Innenschicht nicht ohne weiteres möglich. Neben der Passage durch einen Membrankanal wäre ebenfalls ein transmembranärer Transport mittels hochspezifischer ATP-abhängiger Transporterproteine denkbar. In einer Arbeit von Mitra *et al.* konnte dem *ATP binding cassette transporter* (ABC) ABCC1 eine von der Degranulierung unabhängige Rolle bei der Ausschleusung von S1P aus Mastzellen nachgewiesen werden. (Mitra *et al.*, 2006). In Mastzellen spielt intrazelluläres S1P zudem eine wichtige Rolle bei der für die Degranulierung erforderlichen Calciummobilisierung. Denkbar wäre folglich auch eine konzentrationsabhängige Einschleusung von S1P in die Zelle über derartige membranintegrierte ABC Transporterproteine, sowohl in Mastzellen als auch in den von uns untersuchten VSMC.

Die direkte Messung von extra- und interzellulären S1P Konzentrationen hätte hier mehr Klarheit schaffen können. Eine solche Konzentrationsbestimmung lässt sich bisher allerdings nur in Zellkulturen durchführen und war aufgrund der geringen Zellzahl in unserem Modell und der noch mangelnden Sensitivität der bestehenden Assays (Edsall & Spiegel, 1999) nicht möglich.

Zur weiteren Überprüfung einer Ektophosphataseaktivität der SPP1 wurde ein c-myc-SPP1 Konstrukt in den Widerstandsarterien exprimiert und anschließend mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie die Immunfluoreszenz lokalisiert. Diese auf den ersten Blick etwas umständlich erscheinende immunhistologische Nachweismethode

war notwendig, da, wie schon zuvor erwähnt, die nativen SPP1 Antikörper aufgrund mangelnder Bindungsaffinität nicht eingesetzt werden konnten. Bei Betrachtung einer solchen Arterie mit Hilfe des konfokalen Mikroskops (Abb. 10) waren vor allem Fluoreszenzsignale im Zytoplasma zu erkennen, die am ehesten einer Lokalisation der SPP1 in den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums entsprechen. Vereinbar mit einer Lokalisation an der Plasmamembran zeigten sich hierbei aber auch einzelne punktförmige Fluoreszenzanreicherungen an der Zellmembran der glatten Muskelzellen, die durch ihre zirkuläre Anordnung um das Gefäß leicht zu identifizieren sind. Es gelang mit der vorhandenen Auflösung jedoch nicht zu entscheiden, ob das Immunlabel für SPP1 direkt an der Membranoberfläche lokalisiert war.

Wenn die Tonuserhöhung in Ruhe ohne eine Erhöhung des basalen Calciums zu Stande kommt und damit durch eine erhöhte Calciumsensitivität bedingt ist, dann sollte es möglich sein, diese auch direkt durch Analyse der Calciumspiegel und des gleichzeitig herrschenden Gefäßtonus (vgl. Abb 06) nachzuweisen. In asSPP1 Widerstandsarterien, die bei Dauerdepolarisation mit Kalium steigenden extrazellulären Calciumkonzentrationen ausgesetzt wurden, konnte allerdings keine Zunahme der Calciumsensitivität beobachtet werden (Abb. 06). Es handelt sich hierbei jedoch höchstwahrscheinlich um ein methodisches Problem der vorliegenden Versuchsreihe, die in diesem Fall den Nachweis einer erhöhten Calciumsensitivität verhindert. Die notwendige Membrandepolarisation durch Kalium, die es ermöglicht, über Änderung der extrazellulären Calciumkonzentrationen auch die intrazellulären Calciumspiegel entsprechend zu verändern, steigert nämlich durch die Calciumerhöhung eventuell auch die Aktivität der Sphingosinkinase 1. Als eine Folge

einer Calciumerhöhung infolge der Membrandepolarisation ist in PC12 Phäochromozytom und RINm5F Insulinom-Zellen in der Tat eine Aktivierung der Sphingosinkinase 1 mit anschließender S1P Produktion beschrieben worden (Alemany *et al.*, 2001). Das dann vermehrt produzierte S1P könnte somit dazu führen, dass bereits unter „Kontrollbedingungen“ eine Calciumsensitivierung vorliegt und keine weitere Steigerung erfolgen kann. Hiermit vereinbar hat unsere Arbeitsgruppe bereits in früheren Arbeiten gezeigt, dass exogen zugeführtes S1P bei depolarisierter Membran ebenfalls zu keiner Verstärkung der Calciumsensitivität führt (Bolz *et al.*, 2003b). In der betreffenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass in den untersuchten Widerstandsarterien die S1P abhängige, basale Aktivierung des RhoA/Rhokinase Signalweges vermutlich sehr hoch war, da die Inkubation mit dem Rho-Inhibitor C3-Transferase die Dosiswirkungskurve für Ca^{2+} -induzierte Vasokonstriktionen in dauerdepolarisierten Arterien signifikant nach rechts verschob.

Eine weitere Versuchsreihe der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit der Frage ob die SPP1 auch an der myogenen Vasokonstriktion beteiligt ist und somit einen mittelbaren Einfluss auf die Kontrolle des peripheren Widerstands hat. Die myogene Vasokonstriktion stellt einen relevanten physiologischen Mechanismus der Blutdruckerhöhung bzw. für die Autoregulation der Organperfusion dar (Izzard & Heagerty, 1995).

In Vorarbeiten unseres Labors konnten wir nachweisen, dass die Sphingosinkinase 1 vermutlich durch calciumsensitivierende Mechanismen von S1P über die RhoA/Rhokinase Signalkaskade entscheidend an der myogenen Antwort beteiligt ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der Sphingosinkinase 1 zu einer Verstärkung und die Inhibition der Sphingosinkinase 1 zu einer Abschwächung der

myogenen Vasokonstriktion führt (Bolz *et al.*, 2003a). Vereinbar mit diesen zuvor erhobenen Daten und konsistent mit der Hypothese, dass die SPP1 als funktioneller Antagonist der Sphingosinkinase 1 wirkt, zeigte sich in den Gefäßen nach Behandlung mit Antisenseoligonukleotiden eine deutliche Zunahme der myogenen Antwort, bzw. in den SPP1 transfizierten Widerstandarterien eine signifikante Reduktion. Die zuvor beschriebenen Unterschiede des Ruhetonus in den verschiedenen Behandlungsgruppen können diese die Änderungen der Größe der myogenen Antwort nicht erklären, da frühere Versuche gezeigt hatten, dass unter unseren Versuchsbedingungen der Ausgangstonus die myogene Antwort nicht signifikant beeinflusst (Bolz *et al.*, 2003a).

Gerade im Rahmen einer vermehrten Expression der SPP1 wäre es denkbar, dass unspezifische, nicht kontrollierbare Effekte von Proteininteraktionen auftreten, die nicht mit der S1P degradierenden Funktion in Verbindung stehen. Die Überexpression einer phosphataseinaktiven SPP1^{H208A} Mutante hatte jedoch keinerlei funktionelle Auswirkungen auf die untersuchten Parameter im Vergleich zu den Kontrollgefäßen, so dass proteomische Effekte einer SPP1 Überexpression weitgehend ausgeschlossen werden konnten (Abb. 09). Es gilt aber die Einschränkung, dass ein direkter Vergleich der Expressionslevel der beiden Plasmide nicht vorgenommen wurde.

In Anbetracht der bisher diskutierten Daten lässt sich festhalten, dass die SPP1 an der Regulation des vaskulären Tonus von Widerstandsarterien beteiligt ist und in Bezug auf die untersuchten funktionellen Parameter als funktioneller Antagonist der Sphingosinkinase 1 fungiert. Weiterhin deuten die Daten auf eine Beteiligung der SPP1 an der Regulation der extrazellulären Bioverfügbarkeit von S1P hin. Vermutlich

durch eine von Le Stunff bereits vermutete Ektophosphatasewirkung ist die SPP1 in der Lage, S1P rezeptorvermittelte Wirkungen, z. B. die RhoA/Rhokinase medierte calciumsensitivierenden Effekte, zu modulieren (Le Stunff *et al.*, 2002a). Unter physiologischen Bedingungen könnte die SPP1 so über die Beeinflussung der myogenen Vasokonstriktion auch Einfluss auf die Höhe des peripheren Widerstands nehmen. Um die pathophysiologische Bedeutung dieser Befunde und damit eine mögliche Rolle der SPP1 in verschiedenen Krankheitsprozessen genauer zu charakterisieren, wird weitere Forschung notwendig sein. Insbesondere gilt es in Zukunft endogene Aktivierungs- und Inhibitionsstimuli der SPP1 zu identifizieren sowie deren mögliche Auswirkungen auf die subzelluläre Verteilung der SPP1.

Der zweite Teil dieser Arbeit widmete sich der Bedeutung und den Mechanismen der Translokation der Sphingosinkinase 1 und den damit verbundenen funktionellen Effekten in isolierten Widerstandsarterien. Im Ruhezustand ist die Sphingosinkinase 1 vorwiegend im Zytosol lokalisiert und verfügt bereits über eine basale Aktivität (Pitson *et al.*, 2000). Durch Translokation der Sphingosinkinase 1 an die Membran wird zum einen eine große Nähe zum Substrat Sphingosin erreicht, zum anderen könnte durch die Lokalisation an bzw. in der Plasmamembran die gleichzeitige Regulierung von intra- und extrazellulären S1P Kompartimenten (z.B. Ektonukleotidase-Aktivität) ermöglicht werden.

Bisher wurden zwei Mechanismen beschrieben, die für eine Translokation der Sphingosinkinase 1 an die Membran eine Rolle spielen: Eine Phosphorylierung am Serin 225 sowie ein Calcium-Calmodulin-abhängiger Mechanismus. Während die Serin-Phosphorylierung neben der Translokation auch eine Steigerung der katalytischen Aktivität bewirkt, geht die durch Calcium und Calmodulin beschriebene

Membrantranslokation ohne gleichzeitige Aktivierung einher (Pitson *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2002; Young *et al.*, 2003). Eine Arbeit an Zellkulturen von Sutherland *et al.* weist zusätzlich daraufhin, dass für die Translokation der Sphingosinkinase 1 möglicherweise beide Mechanismen gleichzeitig erforderlich sind. Durch Mutation der Calmodulin-Bindungsstelle der Sphingosinkinase 1 konnte nämlich gezeigt werden, dass trotz erfolgreicher Phosphorylierung des Serin 225 durch ERK1/2 die Translokation an die Plasmamembran verhindert wurde (Sutherland *et al.*, 2006).

Es gibt bisher wenige Erkenntnisse über physiologische Stimuli, die zur Phosphorylierung der Sphingosinkinase 1 am Serin 225 sowie anschließenden Translokation an die Plasmamembran führen. Nachdem wir bereits in Vorarbeiten eine entscheidende Beteiligung der Sphingosinkinase 1 an der Entstehung der druckinduzierten myogenen Vasokonstriktion nachgewiesen haben, konnte in einem ersten Schritt der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Erhöhung des transmuralen Drucks einen endogenen Stimulus für die Translokation der Sphingosinkinase 1 an die Membran darstellt. Mit Hilfe einer GFP-markierten „wild-type“ Sk1 konnte fluoreszenzmikroskopisch eine druckinduzierte Translokation der Sphingosinkinase 1 an die Plasmamembran beobachtet werden (Abb. 11). Die Membrantranslokation der Sphingosinkinase 1 scheint abhängig von der Phosphorylierung am Serin 225 zu sein, da sich in Gefäßen, die eine nicht phosphorylierbare GFP Sk^{S225A} Mutante exprimierten, weiterhin nur ein diffuses zytoplasmatisches Fluoreszenzsignal und keine deutliche Redistribution an der Membran darstellte. Dieser optische Hinweis einer verhinderten Translokation der GFP Sk^{S225A} Mutante korreliert zudem mit den beobachteten funktionellen Effekten der Sk^{S225A} behandelten Gefäße. An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass in anderen Zelltypen, z. B. Makrophagen, das GFP-Sk^{S225A} Konstrukt durch einen

phosphorylierungsunabhängigen aber Calcium-Calmodulin-abhängigen Mechanismus an die Membran transloziert werden konnte (Thompson *et al.*, 2005; Young *et al.*, 2003). Man kann daher davon ausgehen, dass weder die Markierung mit GFP noch die Serin-Mutation in Position 225 prinzipiell eine Membran-Translokation ausschließen. Wie schon erwähnt, kommt es im Rahmen der myogenen Vasokonstriktion zu einem initialen, druckinduzierten Calciumanstieg. Die Voraussetzungen für eine calciumabhängige Translokation ohne Phosphorylierung am Serin 225 wären daher in den untersuchten vaskulären glatten Muskelzellen prinzipiell vorhanden gewesen. In der Zusammenschau kann man in den von uns untersuchten Widerstandsarterien tatsächlich überwiegend von einer durch Phosphorylierung an Position 225 verursachten Translokation der Sphingosinkinase 1 in VSMCs ausgehen.

Neben der fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesenen, weitgehenden Hemmung der Translokation der Sk^{S225A} konnte gleichzeitig eine im Vergleich zu den Kontrollgefäßen signifikante Reduktion von Ruhetonus, Ruhe- und druckinduzierten Calciumspiegeln, Calciumsensitivität sowie myogener Antwort beobachtet werden. Die Transfektion mit Sk^{S225A} hatte damit in Bezug auf die untersuchten funktionellen Parameter eine mit der katalytisch inaktiven Mutante Sk^{G82D} vergleichbare Wirkung. Als Erklärung für die beobachtete abgeschwächte myogene Vasokonstriktion in den Sk^{S225A} behandelten Widerstandsarterien kommt eine geringere Calciumsensitivierung des kontraktile Apparates in Frage. In der Entstehung der myogenen Antwort ist die Sphingosinkinase 1 durch ihre calciumsensitivierenden Effekte entscheidend an der tonischen Phase beteiligt. Hierfür scheint die Membrantranslokation der Sphingosinkinase 1 von zentraler Bedeutung sein. Neben einer räumlichen Integration mit dem Substrat Sphingosin könnte durch die

Translokation eine Freisetzung des produzierten S1P in den Extrazellulärraum für eine anschließende auto- und parakrine Wirkung ermöglicht werden (Mitra *et al.*, 2006).

Aufgrund der prominenten funktionellen Effekte nach Behandlung der Widerstandsgefäße mit der Sk^{S225A} Mutante wurde in weiteren Versuchsreihen untersucht, inwieweit sich die beobachteten vaskulären Funktionsverluste durch eine erzwungene Membranlokalisation der Sk^{S225A} wieder herstellen lassen. Zu diesem Zweck wurden die Widerstandsgefäße mit mp-Sk^{S225A} Mutanten behandelt und anschließend funktionell untersucht. In Übereinstimmung mit älteren Arbeiten von Zlatkine *et al.* konnten Pitson *et al.* für die von uns verwendeten mp-Mutanten (mp-Sk^{S225A} und mp-Sk^{wt}) mittels Western Blot eine vermehrte Membranlokalisation in Lysaten von transfizierten NIH3T3 Zellen nachweisen (Pitson *et al.*, 2005; Zlatkine *et al.*, 1997). Mikroskopische Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz zeigten zudem eine präferentielle Lokalisation der mp-Mutanten an der Plasmamembran, wohingegen die wild-type Sphingosinkinase 1 und die Sk^{S225A} Mutante in unstimulierten Zellen vorwiegend zytoplasmal verteilt waren (Pitson *et al.*, 2005). Unsere Vermutung war daher, dass durch das Einbringen eines mp-Motivs auch in VSMC eine strukturelle Membranfixierung der Mutanten erreicht wird. In der Tat konnte unsere Arbeitsgruppe mit Hilfe von FLAG-markierten Sphingosinkinase Mutanten (mp-Sk^{wt} und mp-Sk^{S225A}) immunhistochemisch eine Lokalisation dieser Mutanten an der Plasmamembran von vaskulären glatten Muskelzellen der isolierten Widerstandsgefäßen darstellen (bisher unveröffentlichte Daten).

Während sich in den mp-Sk^{S225A} behandelten Gefäßen die intrazellulären Calciumparameter (Ruhe- und druckinduzierte Calciumspiegel) im Vergleich zu den GFP-Kontrollarterien wieder vollständig hergestellt zeigten, wurden in Bezug auf die

vorwiegend rezeptorvermittelten Parameter Calciumsensitivität und myogene Antwort unverändert deutliche Funktionseinschränkungen beobachtet. Bei fehlendem Nachweis der Expressionslevel der verschiedenen Mutanten muss ein quantitativer Vergleich der Ergebnisse in den unterschiedlich behandelten Gefäßen hier und im Folgenden allerdings kritisch beleuchtet werden. Man könnte aber spekulieren, dass durch die erzwungene Membranlokalisierung intrazelluläre Effekte von S1P auf den Calciumspiegel wiederhergestellt werden können, während rezeptorvermittelte und damit extrazelluläre Effekte (Calciumsensitivierung und myogene Antwort) von S1P weiterhin abgeschwächt bleiben.

Um zu überprüfen, inwieweit die beobachteten funktionellen Defizite der mp-Sk^{S225A} Gefäße durch eine fehlende Aktivierbarkeit am Serin 225 bedingt waren, erfolgten weitere Versuchsreihen in denen Widerstandsarterien mit mp-Sk^{wt} Mutanten behandelt wurden. Nach Transfektion der Widerstandsarterien mit dieser membranverankerten „wild-type“ mp-Sk^{wt} Mutante zeigte sich im Vergleich zu den mp-Sk^{S225A} Gefäßen eine Verbesserung der Calciumsensitivierung und myogenen Antwort. Die myogene Vasokonstriktion und Calciumsensitivierung blieb jedoch auch nach Einbringen der mp-Sk^{wt} Mutante und damit Wiederherstellung der Phosphorylierbarkeit im Vergleich zu den GFP-Kontrollgefäßen weiterhin signifikant reduziert. Unter Berücksichtigung einer eingeschränkten Vergleichbarkeit der verschieden behandelten Gefäße könnten die Befunde der mp-Sk^{wt} Mutante dadurch erklärt werden, dass zwar wieder eine vermehrte S1P Produktion erfolgt, aber die Behandlung mit der mp-Sk^{wt} Mutante möglicherweise zu einer „falschen“ Membranlokalisierung führt, und somit S1P nicht in ausreichendem Maße ausgeschleust werden kann. Diese Mechanismen könnten die im Vergleich zu den mp-Sk^{S225A} Gefäßen beobachtete leichte Verbesserung der Calciumsensitivierung

und myogenen Antwort in den mp-hSk^{wt} Gefäßen erklären. Bei fehlendem Nachweis der extrazellulären S1P Konzentrationen muss eine solche Erklärung jedoch als spekulativ angesehen werden.

Interessanterweise zeigte sich in Gefäßen, in denen eine der beiden membranfixierten Sphingosinkinase Mutanten exprimiert wurden, ein zu den Kontrollgefäßen vergleichbarer Ruhecalciumspiegel. Für die Aufrechterhaltung der Ruhecalciumspiegel scheint also eine fehlende Aktivierungsmöglichkeit der Sphingosinkinase durch Phosphorylierung am Serin 225 nicht ins Gewicht zu fallen, da sowohl die mp-Sk^{wt} als auch die mp-Sk^{S225A} Gefäße ähnliche Ruhecalciumspiegel aufwiesen. Der Ruhetonus hängt sowohl von rezeptorabhängigen, extrazellulären Wirkungen des S1P ab, als auch von der Höhe des intrazellulären Calciumspiegels. Vereinbar hiermit zeigte sich in den Widerstandsarterien, die mit einer der beiden membranfixierten Sphingosinkinase Mutanten transfiziert wurden, ein nahezu vollständig wiederhergestellter Ruhecalciumspiegel und nur ein teilweise wiederhergestellter Ruhetonus. Eine mögliche Erklärung für diese Befunde könnte die schon erwähnte reduzierte Calciumsensitivierung infolge eines reduzierten extrazellulären S1P Angebots sein. Diese Überlegung wird zudem unterstützt durch die Tatsache, dass die membranfixierte mp-Sk^{S225A} noch zu einer weiteren Reduktion der Calciumsensitivierung unter depolarisierten Bedingungen im Vergleich zur Sk^{S225A} führte.

Die vorliegenden Befunde deuteten daraufhin, dass eine erzwungene Fixierung der Sphingosinkinase 1 an der Zellmembran mittels mp-Motiv nicht ausreicht, um die vorwiegend rezeptorvermittelten Effekte von S1P wiederherzustellen. Vielmehr scheint unter funktionellen Gesichtspunkten auch eine korrekte Membranintegration der Sphingosinkinase 1, ggf. in räumlicher Nähe zu weiteren Signalmolekülen

notwendig zu sein. Vermutlich ermöglicht nur eine adäquate und für eine Tyrosinkinase typische Membranlokalisation eine ausreichende Ausschleusung von S1P für die notwendige auto- und parakrine Aktivierung der S1P Rezeptoren.

Wie das S1P für seine rezeptorabhängigen Wirkungen in den Extrazellulärraum gelangt, ist bisher unvollständig geklärt. Zum einen wird in der Literatur die vollständige Ausschleusung der Sphingosinkinase 1 beschrieben, die dann extrazelluläres S1P generiert (Ancellin *et al.*, 2002; Venkataraman *et al.*, 2006). Weiterhin wurde in diesem Zusammenhang auch eine mögliche Rolle des CFTR sowie ABCC1 für die Ausschleusung von intrazellulärem S1P diskutiert (Boujaoude *et al.*, 2001; Mitra *et al.*, 2006).

Durch das Myristoylation/Palmitoylation (mp) – Motiv wird eine strukturelle Fixierung der Sphingosinkinase 1 an der inneren Seite der Membran erzwungen (Resh, 1999; Pike, 2003; Pike, 2004). Für eine suffiziente Ausschleusung von S1P und damit Erfüllung der rezeptorvermittelten Aufgaben von S1P könnte es aber notwendig sein, dass die Sphingosinkinase 1 anderweitig in die Membran integriert wird. Denkbar wäre hierbei z. B. eine Lokalisation der Sphingosinkinase 1 an der äußeren Seite des Membranbilayers in dicht gepackten Abschnitten mit vorwiegend Sphingolipiden, Cholesterol und Signalmolekülen, den so genannten „lipid rafts“. Nach einem Stimulus sind diese „lipid rafts“ in der Lage, sich zusammen zu schließen („raft clustering“), um so die notwendigen Moleküle der entsprechenden Signalkaskade räumlich zu integrieren. Interessanterweise scheinen diese Sphingolipid- und Cholesterol angereicherten „lipid rafts“ vorwiegend in der äußeren Schicht des membranösen Bilayers vorzukommen, während die entsprechende innere Schicht einen gewöhnlich phospholipidreichen Aufbau zeigt (Pike, 2003; Pike, 2004). Anhand dieser Überlegungen wird deutlich, dass eine an der Membraninnenseite fixierte

Sphingosinkinase 1 entscheidende Nachteile für die Aufrechterhaltung der extrazellulären S1P Bioverfügbarkeit zur Folge haben könnte. Dies könnte auch die beobachtete, fast vollständige Aufhebung der extrazellulären S1P Wirkungen (also über Rezeptoren) bei Erhaltung der intrazellulären Effekte von S1P erklären, die nach Transfektion mit einer der beiden membranfixierten Sphingosinkinase Mutanten beobachtet wurden.

Anders als in den Zellkulturarbeiten von Pitson et al., bei denen die gleichen membranfixierten Mutanten in der Lage waren pro-onkogene Wirkungen auszulösen (Pitson *et al.*, 2005), konnten wir keine vollständige vaskuläre Reaktivität in den mit mp-Mutanten behandelten Gefäßen beobachten. Die Zellzyklus regulierenden Eigenschaften werden weitgehend intrazellulärem S1P zugeschrieben, so dass diese Ergebnisse in keinem Widerspruch zu den hier erhobenen Daten stehen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Pitson et al. konnte die Arbeitsgruppe von Safadi-Chamberlain, ebenfalls in Zellkulturen, mit einer anderen membranfixierten Sphingosinkinase Mutante inhibitorische Wirkungen auf den Zellzyklus nachweisen (Safadi-Chamberlain *et al.*, 2005). Diese unterschiedlichen Ergebnisse verdeutlichen, dass es vermutlich einer korrekten Integration der Sphingosinkinase 1 in der Zellmembran bedarf, um alle intra- und extrazellulären Funktionen von S1P zu gewährleisten.

Mit der vorliegenden Arbeit konnten in Bezug auf die biologischen Auswirkungen der Phosphorylierung und Translokation der Sphingosinkinase 1 erstmals Befunde in der glatten Muskulatur intakter Gefäße erhoben werden. Aufgrund der schon angesprochenen methodischen Einschränkungen des Modells (kein direkter Nachweis der Expressionslevel, fehlende Messung der S1P Konzentrationen, kein

direkter subzellulärer Lokisationsnachweis der Sphingosinkinase Mutanten) müssen die Ergebnisse zurückhaltend gedeutet werden. Die diskutierten Befunde deuten daraufhin, dass die Translokation der Sphingosinkinase 1 in vaskulären glatten Muskelzellen der Widerstandsarterien von der Phosphorylierung am Serin 225 abhängig ist. Vermutlich wird durch diese Phosphorylierung neben einer katalytischen Aktivierung auch die korrekte Integration der Sphingosinkinase 1 in die Membran gesteuert, so dass sie die Voraussetzung für eine intakte myogene Antwort sowie andere funktionelle, insbesondere rezeptorvermittelte Effekte in Widerstandsarterien darstellt. Die prominenten funktionellen Effekte der Sk^{S225A} behandelten Widerstandsarterien legten eine Mitbeteiligung der ERK 1/2 an der Phosphorylierung der Sphingosinkinase nahe. Die mit dem MEK Inhibitor PD98059 behandelten Gefäße wiesen funktionell ähnliche Effekte wie die Sk^{S225A} Widerstandsarterien auf und unterstützen daher die gestellte Hypothese. Neben einer dosisabhängigen Reduzierung des Ruhetonus und Ruhecalciumspiegels konnte in den PD98059 behandelten Widerstandsarterien auch eine Abschwächung der myogenen Vasokonstriktion und des druckinduzierten Calciumanstiegs beobachtet werden. Die Frage nach der genauen Rolle von ERK 1/2 in der Regulierung des mikrovaskulären Tonus ist aufgrund der zahlreichen „downstream targets“ von ERK 1/2 nur schwer zu beantworten und geht weit über den Rahmen dieser Arbeit hinaus. Eine Synopsis aller hier diskutierten und erforschten Signalwege an denen S1P involviert ist findet sich in Abb. 17.

Unklar ist bisher, welche Aufgaben S1P als tonischer Faktor (sog. "housekeeping function") im Gefäßsystem insgesamt übernimmt und welche funktionellen und möglicherweise auch pathologischen Effekte durch eine vermehrte Produktion von

S1P nach Aktivierung und Translokation der Sphingosinkinase 1 oder Hemmung der SPP1 vermittelt werden (Saba & Hla, 2004). Hinweise für eine pathologische und prognostische Bedeutung von erhöhten S1P Serumspiegeln ergaben sich bereits im Rahmen einer klinischen Studie von Deutschman et al.. Hierbei fand sich eine positive Korrelation zwischen Schwere der KHK und Höhe der S1P Serumspiegel. (Deutschman *et al.*, 2003). In dieser Studie bleibt aber unklar, was die Quelle der erhöhten Plasmaspiegel ist. Die vorliegende Arbeit gibt aber indirekte Hinweise, dass Gefäßmuskelzellen via Sphingosinkinase 1 und SPP1 in der Lage sein könnten, die Plasma S1P Spiegel zumindest teilweise zu beeinflussen. Die hier vorgestellten Befunde bilden daher ein Basis für weitere Untersuchungen, in denen nicht nur die funktionelle Rolle dieser Enzyme und des Mediators S1P für die physiologische Regulation des peripheren Widerstands analysiert wird, sondern auch deren pathophysiologische Bedeutung etwa im Rahmen der Hypertonieentstehung und weiterer Kreislauferkrankungen analysiert werden sollte.

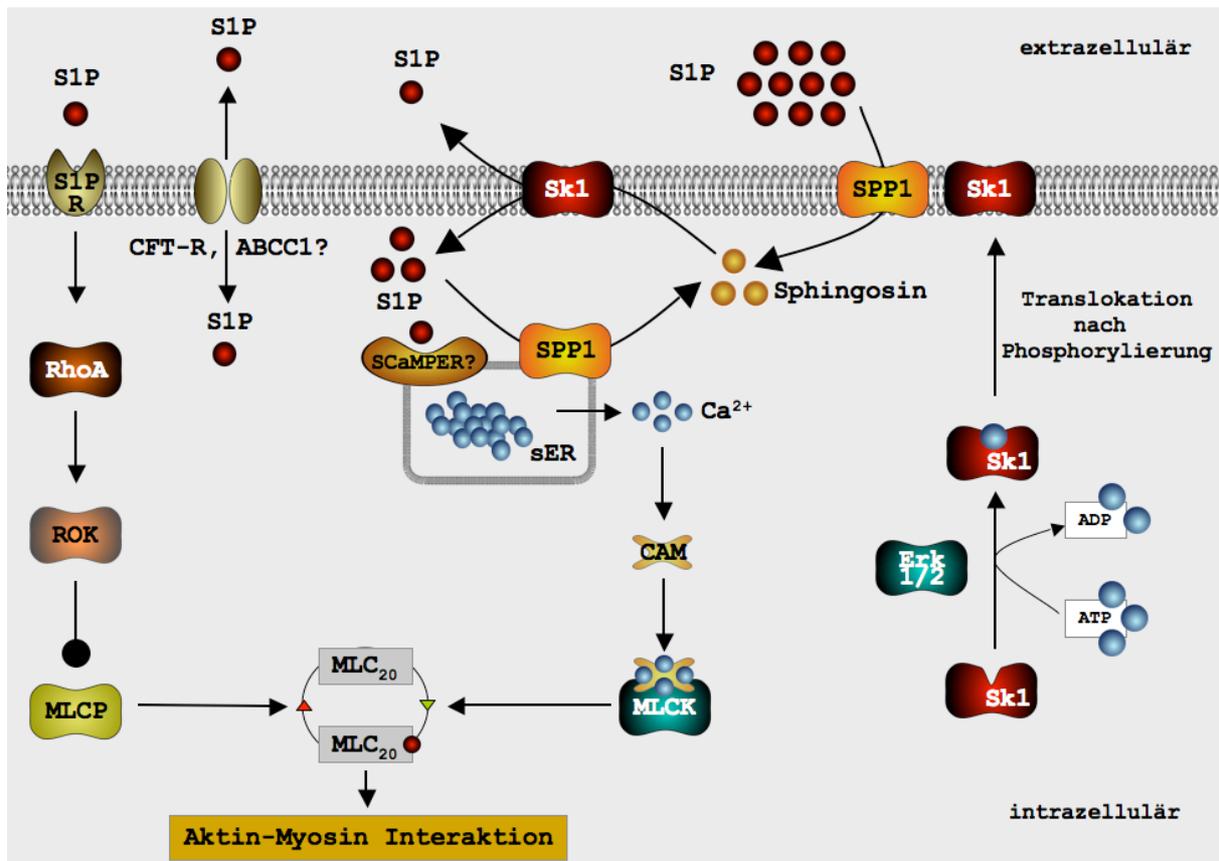


Abb. 17

Zusammenfassende Synopsis der diskutierten Signalwege

Extrazelluläres S1P ist über G-Protein gekoppelte S1P Rezeptoren (S1PR) in der Lage den RhoA/Rho Kinase Signalweg zu aktivieren. Hierdurch kommt es zu einer Inhibition der MLCP und anschließenden Calciumsensitivierung des kontraktiven Apparates.

Eine Phosphorylierung der im Zytoplasma lokalisierten Sphingosinkinase 1 am Serin 225 führt zu einer Aktivierung und Translokation der Sphingosinkinase 1 an die Plasmamembran. Das dann vermehrt produzierte S1P moduliert vermutlich sowohl intra- als auch extrazelluläre Signalwege. Unklar ist ob S1P, z.B. über CFTR oder ABCC1 Transporter, durch die Plasmamembran transportiert werden kann. Intrazelluläres S1P kann in IP3 – unabhängiger Weise auf bisher nicht vollends geklärte Weise (evtl. über SCaMPER) Calcium aus intrazellulären Speichern mobilisieren. Anhand der vorliegenden Daten lässt sich vermuten, dass die SPP1 sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre S1P Wirkungen moduliert. Abkürzungen siehe Kapitel 7.

6. Zusammenfassung

Der Lipidmediator S1P ist ein pleiotroper Botenstoff im vaskulären System und als solcher an der Regulierung des mikrovaskulären Tonus beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob die Sphingosin-1-Phosphat Phosphohydrolase 1 (SPP1) als hochspezifisches und vermutlich wichtigstes Enzym des S1P-Abbaus eine wesentliche Rolle bei der S1P vermittelten Tonusregulierung in isolierten Widerstandsarterien des Hamsters spielt und den basalen Tonus sowie die basalen Calciumspiegel in Widerstandsarterien des Hamsters beeinflussen kann. Die Untersuchungen wurden an isolierten Segmenten von Seitenästen der Arteria femoralis aus dem Musculus gracilis durchgeführt. Die isolierten Gefäßsegmente wurden kanüliert und anschließend unter Erhalt der funktionellen Eigenschaften in einem Organbad kultiviert. Diese Kulturmethode war zugleich eine der Voraussetzungen für eine erfolgreiche, selektive Transfektion (Transfektionsreagenz Effectene®) der glatten Muskelzellen mit verschiedenen Plasmiden. In einem Organbad wurden der Calciumspiegel in den Gefäßmuskelzellen sowie der Gefäßdurchmesser kontinuierlich gemessen und registriert.

In einem ersten Schritt konnte auf mRNA Ebene die Expression der SPP1 in den isolierten Widerstandsarterien nachgewiesen werden. Nach Behandlung der Gefäße mit Antisenseoligonukleotiden gegen SPP1 wiesen diese nicht nur einen erhöhten Ruhetonus sondern auch eine gesteigerte myogene Konstriktion bei transmuraler Druckerhöhung und eine verstärkte vasokonstriktorische Antwort auf exogen appliziertes S1P auf. Eine Überexpression von SPP1 führte dagegen zu den gegenteiligen Effekten welche mit den zuvor im Labor schon beobachteten Auswirkungen einer Hemmung der Sphingosinkinase 1 übereinstimmten. Der Effekt von exogen appliziertem S1P wurde in diesen Gefäßen signifikant reduziert.

6. Zusammenfassung

Frühere Befunde hatten gezeigt, dass die aktive Sphingosinkinase 1 ebenfalls an der Plasmamembran lokalisiert ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun nachgewiesen werden, dass die subzelluläre Lokalisation der Sphingosinkinase 1 an der Plasmamembran von Gefäßmuskelzellen eine entscheidende funktionelle Bedeutung in Bezug auf die Regulierung des mikrovaskulären Tonus von isolierten Widerstandsarterien besitzt. Bei Erhöhung des transmuralen Drucks scheint eine phosphorylierungsabhängige (am Serin 225) Translokation der Sphingosinkinase 1 an die Plasmamembran ausgelöst zu werden. In den mit Sk^{S225A} Mutanten transfizierten Widerstandsarterien wurde diese Translokation fluoreszenzmikroskopisch kaum noch beobachtet. Diese Gefäße zeigten zudem signifikante funktionelle Effekte mit Reduktion von Ruhetonus, Abnahme von Ruhe- und druckinduzierten Calciumspiegeln, sowie der Calciumsensitivität und der myogenen Antwort. Durch eine forcierte Membranlokalisation der Sphingosinkinase 1 mittels eines Myristoylation/Palmitoylation (mp) Motivs konnte jedoch keine vollständige Wiederherstellung der zuvor beobachteten funktionellen Defizite erreicht werden. Die Behandlung der Gefäße mit membranfixierten Sphingosinkinase 1 Mutanten (mp-Sk^{S225A} und mp-Sk^{wt} Mutanten) führte lediglich zu einer Wiederherstellung der vermutlich intrazellulären S1P Effekte (Ruhe- und druckinduzierte Calciumspiegel). In Bezug auf die vorwiegend rezeptorvermittelten Parameter Calciumsensitivität und myogene Antwort wurden in diesen Gefäßen weiterhin deutliche Funktionseinschränkungen beobachtet. Auch konnten mit Hilfe des MEK Inhibitors PD98059 Hinweise dafür gewonnen werden, dass die ERK 1/2 vermutlich an der Phosphorylierung der Sphingosinkinase am Serin 225 und damit deren Aktivierung beteiligt ist. Die Hemmung der ERK 1/2 mit dem chemischen

Inhibitor PD98059 hatte ähnliche funktionelle Effekte zur Folge wie eine Behandlung der Gefäße mit der nicht phosphorylierbaren SK^{S225A} Mutante.

Die durchgeführten Versuche zeigen, dass SPP1 in Widerstandsarterien funktionell antagonistische Wirkungen zur Sphingosinkinase 1 in Bezug auf die Regulation des Ruhe-Calciumspiegels, die Beeinflussung der Calciumsensitivität und der myogenen Antwort hat. Neben ihrer Beteiligung an der intrazellulären S1P Homöostase scheint die SPP1 zudem im Sinne einer Ektophosphatase Eigenschaft die Wirkung von extrazellulären S1P Kompartimenten zu kontrollieren. Diese Befunde lassen es möglich erscheinen, dass die SPP1 bzw. Faktoren die ihre Aktivität kontrollieren, eine eigenständige Bedeutung bei der Regulation des peripheren Widerstands einnimmt.

Neben der Aktivität der SPP1 ist auch die Sphingosinkinase 1 wesentlich an der Kontrolle des Lipidmediators S1P beteiligt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Membrantranslokation der Sphingosinkinase 1 hierbei eine wichtige Rolle spielt; dabei ist jedoch offensichtlich nicht die Bindung des Enzyms an die Membran per se von Bedeutung sondern vermutlich auch eine korrekte Integration innerhalb Plasmamembran notwendig. Die Translokation der Sphingosinkinase 1 scheint über eine ERK1/2 abhängige Serin Phosphorylierung des Enzyms zu erfolgen.

Insgesamt zeigt diese Arbeit neben der Etablierung einer grundsätzlichen Rolle von Sphingosinkinase 1 und SPP1 bei der Tonuskontrolle von Widerstandsarterien eine Reihe neuer Signalschritte auf, die potentielle Ziele einer gefäßerweiternden und widerstandssenkenden Medikation, etwa bei bestimmten Hypertonieformen werden könnten.

7. Im Text verwendete Abkürzungen

AB: Arterieller Blutdruck

ABCC1: ATP binding cassette transporter

CFT-R: Cystic fibrosis transmembrane regulator

ER: endoplasmatisches Retikulum

ERK 1/2: extracellular related kinase 1/2

FURA 2 AM: FURA 2 Acetoxymethylester

GFP: engl. Green fluorescent protein, grün fluoreszierendes Protein der Meeresqualle

HZV: Herzzeitvolumen

IP3: Inositoltrisphosphat

MEK1/2: mitogen-activated protein kinase 1/2

MLCK: engl. Myosin light chain kinase, Myosinleichtketten Kinase

MLC20: engl. Myosin light chain

MLCP: engl. Myosin light chain phosphatase, Myosin- Leichtketten Phosphatase

mp-Motiv: Myristoylation/Palmitoylation Motiv

MR: engl. Myogenic response, myogene Antwort / Vasokonstriktion

NO: Stickstoffmonoxid

PKC: Proteinkinase C

PD98059: chemischer MEK Inhibitor

RA: engl. resistance arteries, Widerstandsarterien

ROK: Rho Kinase

SER: sarkoplasmatisches Retikulum

Sk1: Sphingosinkinase 1

Sk^{S225A}: nicht phosphorylierbare Sphingosinkinase 1 Mutante

mp-Sk^{S225A}: membranverankerte, nicht phosphorylierbare Sphingosinkinase 1 Mutante

mp-Sk^{wt}: membranverankerte, phosphorylierbare „wild-type“ Sphingosinkinase 1 Mutante

asSPP1: antisense Sphingosin-1-Phosphat Phosphohydrolase 1

SPP1: Sphingosin-1-Phosphat Phosphohydrolase 1

S1P: Sphingosin-1-Phosphat

S1P₂R: extrazellulärer S1P₂ Rezeptor

7. Im Text verwendete Abkürzungen

S1P Lyase: Sphingosin-1-Phosphat Lyase

TPR: engl. Total peripheral resistance

VSMC: engl. Vascular smooth muscle cell, vaskuläre glatte Muskelzelle

8. Anhang

- <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/dialign/submission.html>
- http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html

Alignments:

```

Rat 1 ATGTCCCTGGGGCAGCGACTGGCTCTGCTAGCCATCCGTCTGCAGGAGCCGCAGCGGGTG
Mm 1 ATGTCCCTGGGGCAGCGGCTGGCTCTGCTGGCCAGCCGTCTGCAGGAGCCGCAGCGGGTG
Hs 1 ATGTGCTGAGGCAGCGCCTGGCCCAGCTGTTGGCCGTCTGCAGGACCCGCAGAAAAGTG

Rat 61 GCGAGCTTCCAGCGTCTGTGTGGGGGAGGT--CCGCTCGGCAGCC-GAAGGCGGGGCGAG
Mm 61 GCGAGCTTCCAGCGTCTGTGTGGGGTGGAGGTGCCGCTCAGCAGCCCGGCGGCGGACGAG
Hs 61 GCCCGTTTCCAGCGGCTGTGCGGGGTGGAAGCGCCGCCGCGCGCTCAGCAGACCGGAGG

Rat 118 GATGCAGAGACCGAGGTTGCGGGAGCCCCGGGAGACCCCCGGCGACGGCCACGGCAGTCG
Mm 121 GATGCAGAGACCGAGGTTGCGGGAGCCCCGGGAGAACCCCCGGCGACGGGGACGGCAGCCG
Hs 121 GAGGATGAGAAAGCGGAGGCGCCTCTCGCCGGAGACCCTCGACTGCGAGGGCGGCAGCCA

Rat 178 GGCGTGACGGCAGCCCG-----GCCAAGCCC
Mm 181 GGCGTGAGGACAGCCCC-----GCCAAGGCG
Hs 181 GGGGCGCCTGGAGGCCCCAGCCTCCCGGGAGCGACCGCAATCAGTGCCCGGCCAAGCCG

Rat 205 GACTGCTGCGGTGCACCGAACGGCGTGCGAAACGGGCTGGCGGCCGAGCCGGGCCGACC
Mm 208 GACTGCTGCGGTGCCCGAACGGCGTGCGAACGGGCTGGCGGCCGAGCCGGGCCGACC
Hs 241 GACGGCGGCGGCGCCCCAACGGCGTGCGAACGGGCTGGCGGCCGAGCTGGGCCCGGCC

Rat 265 GGGCCCCGCGCGCGGGGCTCGCTGCGGCGCAACTCGTTGACGGGCGAGGAGGGCGAGCTG
Mm 268 GGGCCCCGCGCGCGGGGCTCGCAGCGCCGCAACTCGTTGACGGGCGAGGAGGGCGAGCTG
Hs 301 TCGCCGCGGCGCGCGGGGCGCTCTGCGCCGCAACTCGCTGACGGGCGAGGAGGGCCAGCTG

Rat 325 GCCAAAGTGAGCAACTTGCCGCTCTACTACCTGTTCTGCTTCGGCACCGAACTGGGCAAC
Mm 328 GTCAAAGTGAGCAACTTGCCGCTCTACTACCTGTTCTGCCTAGGCACGGAACCTGGGCAAC
Hs 361 GCCCGCGTGAGCAACTGGCCGCTCTACTGCCTGTTCTGCTTCGGCACGGAGCTGGGCAAC

Rat 385 GAGCTCTTCTACATCATCTTCTTCCCCTTCTGGATCTGGAATCTGGACCCCTTTGTGGGC
Mm 388 GAGCTCTTCTACATCTTATTCTTCCCCTTCTGGATCTGGAATCTCGACCCCTTTGTGGGC
Hs 421 GAACTCTTCTACATCCTGTTCTTCCCCTTCTGGATCTGGAACCTGGACCCCTGTTGTGGGC

Rat 445 CGGAGGCTGGTGATCATCTGGGTGCTGGTCATGTACCTGGGCCAGTGCACCAAGGACATC
Mm 448 CGGAGGCTGGTGATCATCTGGGTGCTGGTCATGTACCTGGGCCAGTGCACCAAGGACATC
Hs 481 CGGAGGCTCGTGGTCATCTGGGTGCTGGTCATGTACCTGGGCCAGTGCACCAAGGACATC

Rat 505 ATCCGTTGGCCGCGGCCGCGCCTCGCCGCGGTCATCAAGCTGGAGATCTTCTACAATTCG
Mm 508 ATCCGCTGGCCACGGCCGCGCCTCGCCGCGTGCATCAAGCTGGAGGTCTTCTACAACCTCG
Hs 541 ATCCGCTGGCCGAGGCCGCGCCTCGCCGCGGTCGTTCAAGTTGGAGGTCTTCTACAACCTCT

Rat 565 GAATACAGCATGCCTTCCACGCATGCCATGTCCGGCACCGCCATCCCCATCGCCATGATC
Mm 568 GAATACAGCATGCCCTCCACGCATGCCATGTCCAGGCACCGCCATCCCCATCGCCATGTTG
Hs 601 GAGTACAGCATGCCCTCCACCCATGCCATGTCCGGCACCGCCATCCCCATTTCTATGGTC

Rat 625 CTGCTCACCTATGGCCGCTGGCAGTATCCTCTTATATATGGGCTGATTCTCATTCCCTGT
Mm 628 CTGCTCACCTATGGCCGCTGGCAGTATCCTCTTATCTACGGGCTGATTCTCATTCCCTGC
Hs 661 CTCCTCACCTATGGCCGCTGGCAGTACCCTCTTATATATGGAAGTATTCTTATTCCCTGC

Rat 685 TGGAGTTCTCTAGTTTGCCTAAGTAGAATCTACATGGGAATGCATTCCATCCTGGACGTC
Mm 688 TGGAGTTCACTAGTTTGCCTAAGTAGAATCTACATGGGAATGCATTCTATCCTGGATGTC
Hs 721 TGGTGTCTCTAGTTTGCCTAAGTAGAATTTACATGGGAATGCATTCTATTCTGGATATT

Rat 745 ATTGCTGGATTCTTGATACCATTTTTAATCCTTATTATCTTCTACCCATTGGTGGACCTG
Mm 748 ATTGCTGGATTCTTGATACCATTTTTAATCCTTAAATTATCTTCTACCCATTGGTGGACCTG
Hs 781 ATTGCTGGATTCTTATATACCATTTTTAATCCTTAGCTGTCTTCTATCCATTTGTGGACCTG

Rat 805 ATTGACAACCTCAACCAAACCTTACAAATATGCCCGCTCATCATCATCGGGCTTCACTTG

```

8. Anhang

Mm 808 ATGACAACCTTCAACCAAACCTTACAAATATGCGCCGCTCATCATCATCGGGCTTCACTTA
Hs 841 ATGACAACCTTCAACCAAACCTCACAAATATGCTCCATTCATCATCATCGGGCTTCATTTA

Rat 865 ATTTTGGGCATTTTTCTTTACCCTTGACACCTGGAGCACATCCCGAGGAGACACGGCT
Mm 868 ATTTTGGGCATCTTCTCTTTACCCTTGACACCTGGAGCACATCCCGAGGAGACACGGCT
Hs 901 GCTTTGGGGATCTTTCTTTCACTCTTGACACCTGGAGCACATCCCGAGGAGACACAGCC

Rat 925 GAGATTCTGGGGAGTGGTGCTGGGATTGCCTGTGGCTCGCACGCCGCTTATAACCTGGGT
Mm 928 GAGATTCTGGGAAGTGGTGCTGGGATTGCATGTGGCTCACACGCTGCTTATACCCTGGGC
Hs 961 GAGATACTAGGAAGTGGTGCTGGAATTGCATGTGGATCTCATGTTACTTATAACATGGGT

Rat 985 ATATCCTTAGACCCTTCTCTGCACACGTTACCCTTAGCTATCCCCCTCTTACGGTAACT
Mm 988 CTATCCTTAGAACCTTCTCTGCACATGTTACCCTTAGCTATCCCCCTCTTACTGTAACCT
Hs 1021 CTAGTATTAGATCCTTCTCTAGATACATTACCTTTAGCTGGGCCCCCATTACTGTGACT

Rat 1045 CTGTTTGGAAAAGCCATATTACGGGTCGTCATAGGGATGTTGCTTGTACTGTTTCGTAAGA
Mm 1048 CTGTTTGGAAAAGCCATATTACGGATCGTCCTAGGAATGCTGCTTGTACTGTTTCGTGAGG
Hs 1081 CTGTTTGGAAAAGCCATATTGCGGATCCTCATAGGGATGGTATTTGTACTAATAATCAGA

Rat 1105 GATATCATGAAGAAGGTCACCATTCTCTAGCCTGCAAACCTCTTCGGTATTCCGTGTCAT
Mm 1108 GATATCATGAAGAAGATCACCATTCTCTAGCCTGTAAACTCTCCAGTATTCCGTGTCAT
Hs 1141 GATGTAATGAAAAAGATCACCATTCTTTAGCCTGCAAATCTTCAATATACCGTGTGAT

Rat 1165 GACCTTCGCCAAGCAAGGCAGCACATGGAAGTGGAGCTGCCCTACCGGTATATTACCTAC
Mm 1168 GACATTCGCCAAGCAAGGCAGCACATGGAAGTGGAGCTGCCATACCGGTATATTACCTAC
Hs 1201 GATATTCGAAAAGCAAGACAGCACATGGAAGTTGAACTTCCTTATCGGTATATTACCTAT

Rat 1225 GGGACGGTTGGTTTCTCCATCACGTTTTTGTATCCCCTACATATTTTCTTTTATCGGTATC
Mm 1228 GGGATGGTTGGTTTCTCCATCACGTTTTTGGTCCCCTATGTATTTTCTTTTATTGGTATC
Hs 1261 GGAATGGTTGGTTTCTCCATCACATTTTTTGTTCCTTACATATTTTCTTTTATTGGTATC

Rat 1285 TCTTGA
Mm 1288 TCTTGA
Hs 1321 TCTTGA

9. Literaturverzeichnis

Alemaný, R., Kleuser, B., Ruwisch, L., Danneberg, K., Lass, H., Hashemi, R., Spiegel, S., Jakobs, K. H., & Meyer zu Heringdorf D. (2001). Depolarisation induces rapid and transient formation of intracellular sphingosine-1-phosphate. *FEBS Letters* 509, 239-244.

Alessi, D., MacDougall, L. K., Sola, M. M., Ikebe, M., & Cohen, P. (1992). The control of protein phosphatase-1 by targetting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1. *European Journal of Biochemistry* 210, 1023-1035.

Alessi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D. T., & Saltiel, A. R. (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol.Chem.* 270, 27489-27494.

Ancellin, N., Colmont, C., Su, J., Li, Q., Mittereder, N., Chae, S. S., Stefansson, S., Liao, G., & Hla, T. (2002). Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme. Sphingosine 1- phosphate generation and the induction of angiogenic vascular maturation. *Journal of Biological Chemistry* 277, 6667-6675.

Baertschi, A. J. (1994). Antisense oligonucleotide strategies in physiology. *Mol.Cell Endocrinol.* 101, R15-R24.

Bayliss, W. M. (1919). On the local reaction of the arterial wall to changes of internal pressure. *Journal of Physiology - London* 28, 220-231.

Blumenthal, D. K. & Stull, J. T. (1980). Activation of skeletal muscle myosin light chain kinase by calcium(2+) and calmodulin. *Biochemistry* 19, 5608-5614.

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

Bolz, S. S., Galle, J., Derwand, R., de Wit, C., & Pohl, U. (2000c). 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, 2402-2410.

Bolz, S. S., Kaas, J., Jacobi, J., de Wit, C., & Pohl, U. Calcium-independent control of myogenic activity by nitric oxide in isolated skeletal muscle arterioles. *Circulation Research* . 1998. Ref Type: In Press

Bolz, S. S., Pieperhoff, S., de Wit, C., & Pohl, U. (2000b). Intact endothelial and smooth muscle function in small resistance arteries after 48 h in vessel culture. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 279, H1434-H1439.

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. *Journal of Vascular Research* 40, 399-405.

Bolz, S. S., Vogel, L., Sollinger, D., Derwand, R., Boer, C., Pitson, S. M., Spiegel, S., & Pohl, U. Transfection of sphingosine kinase into vascular smooth muscle cells of isolated resistance arteries increases myogenic tone via activation of the RhoA/Rho kinase pathway. *Circulation* 106[19], 1362. 2002. Ref Type: Abstract

Bolz, S. S., Vogel, L., Sollinger, D., Derwand, R., Boer, C., Pitson, S. M., Spiegel, S., & Pohl, U. (2003a). Sphingosine Kinase Modulates Microvascular Tone and Myogenic Responses Through Activation of RhoA/Rho Kinase. *Circulation* 108, 342-347.

Bolz, S. S., Vogel, L., Sollinger, D., Derwand, R., de Wit, C., Loirand, G., & Pohl, U. (2003b). Nitric Oxide-Induced Decrease in Calcium Sensitivity of Resistance Arteries Is Attributable to Activation of the Myosin Light Chain Phosphatase and Antagonized by the RhoA/Rho Kinase Pathway. *Circulation* 107, 3081-3087.

Boujaoude, L. C., Bradshaw-Wilder, C., Mao, C., Cohn, J., Ogretmen, B., Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2001). Cystic fibrosis transmembrane regulator regulates uptake of sphingoid base phosphates and lysophosphatidic acid: modulation of cellular activity of sphingosine 1-phosphate. *Journal of Biological Chemistry* 276, 35258-35264.

Brindley, D. N., English, D., Pilquil, C., Buri, K., & Ling, Z. C. (2002). Lipid phosphate phosphatases regulate signal transduction through glycerolipids and sphingolipids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1582, 33-44.

Brinkmann, V., Cyster, J. G., & Hla, T. (2004). FTY720: sphingosine 1-phosphate receptor-1 in the control of lymphocyte egress and endothelial barrier function. *Am.J.Transplant.* 4, 1019-1025.

Brinkmann, V., Davis, M. D., Heise, C. E., Albert, R., Cottens, S., Hof, R., Bruns, C., Prieschl, E., Baumruker, T., Hiestand, P., Foster, C. A., Zollinger, M., & Lynch, K. R. (2002). The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *Journal of Biological Chemistry* 277, 21453-21457.

Brinkmann, V. & Lynch, K. R. (2002). FTY720: targeting G-protein-coupled receptors for sphingosine 1-phosphate in transplantation and autoimmunity. *Curr.Opin.Immunol.* 14, 569-575.

Cavalli, A. L., O'Brien, N. W., Barlow, S. B., Betto, R., Glembotski, C. C., Palade, P. T., & Sabbadini, R. A. (2003). Expression and functional characterization of SCaMPER: a sphingolipid-modulated calcium channel of cardiomyocytes. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 284, C780-C790.

Cornwell, T. L. & Lincoln, T. M. (1989). Regulation of intracellular Ca²⁺ levels in cultured vascular smooth muscle cells: reduction of Ca²⁺ by atriopeptin and 8-bromo- cyclic GMP is mediated by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 264, 1146-1155.

Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P. G., Coso, O. A., Gutkind, S., & Spiegel, S. (1996). Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 381, 800-803.

Dantas, A. P., Igarashi, J., & Michel, T. (2003). Sphingosine 1-phosphate and control of vascular tone. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 284, H2045-H2052.

De Ceuster, P., Mannaerts, G. P., & Van Veldhoven, P. P. (1995). Identification and subcellular localization of sphinganine-phosphatases in rat liver. *Biochem.J* 311 (Pt 1), 139-146.

Deutschman, D. H., Carstens, J. S., Klepper, R. L., Smith, W. S., Page, M. T., Young, T. R., Gleason, L. A., Nakajima, N., & Sabbadini, R. A. (2003). Predicting obstructive coronary artery disease with serum sphingosine-1-phosphate. *American Heart Journal* 146, 62-68.

Driska, S. P., Stein, P. G., & Porter, R. (1989). Myosin dephosphorylation during rapid relaxation of hog carotid artery smooth muscle. *Am.J.Physiol* 256, C315-C321.

Dudley, D. T., Pang, L., Decker, S. J., Bridges, A. J., & Saltiel, A. R. (1995). A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 7686-7689.

Edsall, L. C. & Spiegel, S. (1999). Enzymatic measurement of sphingosine 1-phosphate. *Analytical Biochemistry* 272, 80-86.

Emerson, G. G. & Segal, S. S. (2000). Endothelial cell pathway for conduction of hyperpolarization and vasodilation along hamster feed artery. *Circulation Research* 86, 94-100.

Fujisawa, K., Fujita, A., Ishizaki, T., Saito, Y., & Narumiya, S. (1996). Identification of the Rho-binding domain of p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil containing protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 271, 23022-23028.

Gong, M. C., Cohen, P., Kitazawa, T., Ikebe, M., Masuo, M., Somlyo, A. P., & Somlyo, A. V. (1992). Myosin light chain phosphatase activities and the effects of phosphatase inhibitors in tonic and phasic smooth muscle. *Journal of Biological Chemistry* 267, 14662-14668.

Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry* 260, 3440-3450.

Hannun, Y. A., Luberto, C., & Argraves, K. M. (2001). Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling. *Biochemistry* 40, 4893-4903.

Hashimoto, T., Hirata, M., & Ito, Y. (1985). A role for inositol 1,4,5-trisphosphate in the initiation of agonist-induced contractions of dog tracheal smooth muscle. *British Journal of Pharmacology* 86, 191-199.

Himpens, B., Kitazawa, T., & Somlyo, A. P. (1990). Agonist-dependent modulation of Ca²⁺ sensitivity in rabbit pulmonary artery smooth muscle. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 417, 21-28.

Himpens, B., Matthijs, G., & Somlyo, A. P. (1989). Desensitization to cytoplasmic Ca²⁺ and Ca²⁺ sensitivities of guinea-pig ileum and rabbit pulmonary artery smooth muscle. *Journal of Physiology - London* 413, 489-503.

Igarashi, J. & Michel, T. (2000). Agonist-modulated targeting of the EDG-1 receptor to plasmalemmal caveolae. eNOS activation by sphingosine 1-phosphate and the role of caveolin-1 in sphingolipid signal transduction. *Journal of Biological Chemistry* 275, 32363-32370.

Igarashi, N., Okada, T., Hayashi, S., Fujita, T., Jahangeer, S., & Nakamura, S. (2003). Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 278, 46832-46839.

Ishikawa, T. & Hidaka, H. (1990). Molecular pharmacology of calcium, calmodulin-dependent myosin phosphorylation in vascular smooth muscle. *American Journal of Hypertension* 3, 231S-234S.

Ishizaki, T., Maekawa, M., Fujisawa, K., Okawa, K., Iwamatsu, A., Fujita, A., Watanabe, N., Saito, Y., Kakizuka, A., Morii, N., & Narumiya, S. (1996). The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO Journal* 15, 1885-1893.

Ishizaki, T., Naito, M., Fujisawa, K., Maekawa, M., Watanabe, N., Saito, Y., & Narumiya, S. (1997). p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of Rho and induces focal adhesions. *FEBS Letters* 404, 118-124.

Izzard, A. S. & Heagerty, A. M. (1995). Hypertension and the vasculature: arterioles and the myogenic response. *Journal of Hypertension* 13, 1-4.

Jasinska, R., Zhang, Q. X., Pilquil, C., Singh, I., Xu, J., Dewald, J., Dillon, D. A., Berthiaume, L. G., Carman, G. M., Waggoner, D. W., & Brindley, D. N. (1999). Lipid phosphate phosphohydrolase-1 degrades exogenous glycerolipid and sphingolipid phosphate esters. *Biochemical Journal* 340 (Pt 3), 677-686.

Johnson, K. R., Becker, K. P., Facchinetti, M. M., Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2002). PKC-dependent activation of sphingosine kinase 1 and translocation to the plasma membrane. Extracellular release of sphingosine-1-phosphate induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). *Journal of Biological Chemistry* 277, 35257-35262.

Johnson, K. R., Johnson, K. Y., Becker, K. P., Bielawski, J., Mao, C., & Obeid, L. M. (2003). Role of human sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 in the regulation of intra- and extracellular sphingosine-1-phosphate levels and cell viability. *J.Biol.Chem.* 278, 34541-34547.

Kappos, L., Antel, J., Comi, G., Montalban, X., O'Connor, P., Polman, C. H., Haas, T., Korn, A. A., Karlsson, G., & Radue, E. W. (2006). Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine* 355, 1124-1140.

Kargacin, M. E., Scheid, C. R., & Honeyman, T. W. (1988). Continuous monitoring of Ca²⁺ uptake in membrane vesicles with fura-2. *Am.J.Physiol* 255, C694-C698.

Kim, S., Lakhani, V., Costa, D. J., Sharara, A. I., Fitz, J. G., Huang, L. W., Peters, K. G., & Kindman, L. A. (1995). Sphingolipid-gated Ca²⁺ release from intracellular

stores of endothelial cells is mediated by a novel Ca²⁺-permeable channel. *Journal of Biological Chemistry* 270, 5266-5269.

Kindman, L. A., Kim, S., McDonald, T. V., & Gardner, P. (1994). Characterization of a novel intracellular sphingolipid-gated Ca²⁺-permeable channel from rat basophilic leukemia cells. *J Biol.Chem.* 269, 13088-13091.

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. *Journal of Biological Chemistry* 266, 1708-1715.

Kitazawa, T. & Somlyo, A. P. (1990). Desensitization and muscarinic Re-sensitization of force and myosin light chain phosphorylation to cytoplasmic Ca²⁺ in smooth muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 172, 1291-1297.

Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., & Spiegel, S. (1998). Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *Journal of Biological Chemistry* 273, 23722-23728.

Le Stunff, H., Galve-Roperh, I., Peterson, C., Milstien, S., & Spiegel, S. (2002a). Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase in regulation of sphingolipid metabolism and apoptosis. *Journal of Cell Biology* 158, 1039-1049.

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. *Journal of Biological Chemistry* 279, 34290-34297.

Le Stunff, H., Peterson, C., Liu, H., Milstien, S., & Spiegel, S. (2002b). Sphingosine-1-phosphate and lipid phosphohydrolases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1582, 8-17.

Le Stunff, H., Peterson, C., Thornton, R., Milstien, S., Mandala, S. M., & Spiegel, S. (2002c). Characterization of murine sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase. *Journal of Biological Chemistry* 277, 8920-8927.

Lee, M. J., Van Brocklyn, J. R., Thangada, S., Liu, C. H., Hand, A. R., Menzeleev, R., Spiegel, S., & Hla, T. (1998). Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science* 279, 1552-1555.

Levade, T., Andrieu-Abadie, N., Segui, B., Auge, N., Chatelut, M., Jaffrezou, J. P., & Salvayre, R. (1999). Sphingomyelin-degrading pathways in human cells role in cell signalling. *Chemistry and Physics of Lipids* 102, 167-178.

Levenson, J. W., Skerrett, P. J., & Gaziano, J. M. (2002). Reducing the global burden of cardiovascular disease: the role of risk factors. *Prev.Cardiol.* 5, 188-199.

Liu, H., Sugiura, M., Nava, V. E., Edsall, L. C., Kono, K., Poulton, S., Milstien, S., Kohama, T., & Spiegel, S. (2000a). Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *Journal of Biological Chemistry* 275, 19513-19520.

Liu, Y., Wada, R., Yamashita, T., Mi, Y., Deng, C. X., Hobson, J. P., Rosenfeldt, H. M., Nava, V. E., Chae, S. S., Lee, M. J., Liu, C. H., Hla, T., Spiegel, S., & Proia, R. L. (2000b). Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J.Clin.Invest* 106, 951-961.

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, 2419-2424.

Mandala, S., Hajdu, R., Bergstrom, J., Quackenbush, E., Xie, J., Milligan, J., Thornton, R., Shei, G. J., Card, D., Keohane, C., Rosenbach, M., Hale, J., Lynch, C. L., Rupprecht, K., Parsons, W., & Rosen, H. (2002). Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* 296, 346-349.

Mandala, S. M., Thornton, R., Galve-Roperh, I., Poulton, S., Peterson, C., Olivera, A., Bergstrom, J., Kurtz, M. B., & Spiegel, S. (2000). Molecular cloning and characterization of a lipid phosphohydrolase that degrades sphingosine-1-phosphate and induces cell death. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 7859-7864.

Mandala, S. M., Thornton, R., Tu, Z., Kurtz, M. B., Nickels, J., Broach, J., Menzeleev, R., & Spiegel, S. (1998). Sphingoid base 1-phosphate phosphatase: a key regulator of sphingolipid metabolism and stress response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 150-155.

Mao, C., Kim, S. H., Almenoff, J. S., Rudner, X. L., Kearney, D. M., & Kindman, L. A. (1996). Molecular cloning and characterization of SCA₁MPER, a sphingolipid Ca²⁺ release-mediating protein from endoplasmic reticulum. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 1993-1996.

Mao, C., Wadleigh, M., Jenkins, G. M., Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (1997). Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* dihydrosphingosine-1-phosphate phosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 272, 28690-28694.

Massberg, S. & von Andrian, U. H. (2006). Fingolimod and sphingosine-1-phosphate-modifiers of lymphocyte migration. *New England Journal of Medicine* 355, 1088-1091.

Mattie, M., Brooker, G., & Spiegel, S. (1994). Sphingosine-1-phosphate, a putative second messenger, mobilizes calcium from internal stores via an inositol trisphosphate-independent pathway. *Journal of Biological Chemistry* 269, 3181-3188.

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. *American Journal of Physiology* 261, H950-H959.

Metting, P. J., Stein, P. M., Stoos, B. A., Kostrzewski, K. A., & Britton, S. L. (1989). Systemic vascular autoregulation amplifies pressor responses to vasoconstrictor agents. *American Journal of Physiology* 256, R98-R105.

Mitra, P., Oskeritzian, C. A., Payne, S. G., Beaven, M. A., Milstien, S., & Spiegel, S. (2006). Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103, 16394-16399.

Morales-Ruiz, M., Lee, M. J., Zollner, S., Gratton, J. P., Scotland, R., Shiojima, I., Walsh, K., Hla, T., & Sessa, W. C. (2001). Sphingosine 1-phosphate activates Akt, nitric oxide production, and chemotaxis through a Gi protein/phosphoinositide 3-kinase pathway in endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 276, 19672-19677.

Moreland, R. S., Cilea, J., & Moreland, S. (1991). Calcium dependent regulation of vascular smooth muscle contraction. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 308, 81-94.

Morgan, K. G., Papageorgiou, P., & Jiang, M. J. (1989). Pathophysiologic role of calcium in the development of vascular smooth muscle tone. *American Journal of Cardiology* 64, F35-F40.

Motulsky, H. J. & Ransnas, L. A. (1987). Fitting curves to data using nonlinear regression: a practical and nonmathematical review. *FASEB Journal* 1, 365-374.

Nava, V. E., Lacana, E., Poulton, S., Liu, H., Sugiura, M., Kono, K., Milstien, S., Kohama, T., & Spiegel, S. (2000). Functional characterization of human sphingosine kinase-1. *FEBS Letters* 473, 81-84.

Ogawa, C., Kihara, A., Gokoh, M., & Igarashi, Y. (2003). Identification and characterization of a novel human sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase, hSPP2. *Journal of Biological Chemistry* 278, 1268-1272.

Ohmori, T., Yatomi, Y., Osada, M., Kazama, F., Takafuta, T., Ikeda, H., & Ozaki, Y. (2003). Sphingosine 1-phosphate induces contraction of coronary artery smooth muscle cells via S1P2. *Cardiovascular Research* 58, 170-177.

Olivera, A., Kohama, T., Tu, Z., Milstien, S., & Spiegel, S. (1998). Purification and characterization of rat kidney sphingosine kinase. *Journal of Biological Chemistry* 273, 12576-12583.

Olivera, A. & Spiegel, S. (1993). Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* 365, 557-560.

Peter, B. F., Lidington, D., Harada, A., Bolz, H. J., Vogel, L., Heximer, S., Spiegel, S., Pohl, U., & Bolz, S. S. (2008). Role of sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase 1 in the regulation of resistance artery tone. *Circulation Research* 103, 315-324.

Pike, L. J. (2003). Lipid rafts: bringing order to chaos. *Journal of Lipid Research* 44, 655-667.

Pike, L. J. (2004). Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochemical Journal* 378, 281-292.

Pitson, S. M., Moretti, P. A., Zebol, J. R., Lynn, H. E., Xia, P., Vadas, M. A., & Wattenberg, B. W. (2003). Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation. *EMBO Journal* 22, 5491-5500.

Pitson, S. M., Moretti, P. A., Zebol, J. R., Xia, P., Gamble, J. R., Vadas, M. A., D'Andrea, R. J., & Wattenberg, B. W. (2000). Expression of a catalytically inactive sphingosine kinase mutant blocks agonist-induced sphingosine kinase activation. A dominant-negative sphingosine kinase. *Journal of Biological Chemistry* 275, 33945-33950.

Pitson, S. M., Xia, P., Leclercq, T. M., Moretti, P. A., Zebol, J. R., Lynn, H. E., Wattenberg, B. W., & Vadas, M. A. (2005). Phosphorylation-dependent translocation of sphingosine kinase to the plasma membrane drives its oncogenic signalling. *Journal of Experimental Medicine* 201, 49-54.

Pyne, S. & Pyne, N. (2000). Sphingosine 1-phosphate signalling via the endothelial differentiation gene family of G-protein-coupled receptors. *Pharmacology and Therapeutics* 88, 115-131.

Resh, M. D. (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1451, 1-16.

Roviezzo, F., Bucci, M., Delisle, C., Brancaleone, V., Di Lorenzo, A., Mayo, I. P., Fiorucci, S., Fontana, A., Gratton, J. P., & Cirino, G. (2006). Essential requirement for sphingosine kinase activity in eNOS-dependent NO release and vasorelaxation. *FASEB Journal* 20, 340-342.

Saba, J. D. & Hla, T. (2004). Point-counterpoint of sphingosine 1-phosphate metabolism. *Circulation Research* 94, 724-734.

Safadi-Chamberlain, F., Wang, L. P., Payne, S. G., Lim, C. U., Stratford, S., Chavez, J. A., Fox, M. H., Spiegel, S., & Summers, S. A. (2005). Effect of a membrane-targeted sphingosine kinase 1 on cell proliferation and survival. *Biochemical Journal* 388, 827-834.

Sauzeau, V., Le, J. 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. *Journal of Biological Chemistry* 275, 21722-21729.

Schwab, S. R., Pereira, J. P., Matloubian, M., Xu, Y., Huang, Y., & Cyster, J. G. (2005). Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science* 309, 1735-1739.

Shirazi, A., Iizuka, K., Fadden, P., Mosse, C., Somlyo, A. P., Somlyo, A. V., & Haystead, T. A. (1994). Purification and characterization of the mammalian myosin light chain phosphatase holoenzyme. The differential effects of the holoenzyme and its subunits on smooth muscle. *Journal of Biological Chemistry* 269, 31598-31606.

Sobieszek, A. (1991). Regulation of smooth muscle myosin light chain kinase - allosteric effects and co-operative activation by calmodulin. *Journal of Molecular Biology* 220, 947-957.

Somlyo, A. P., Kitazawa, T., Himpens, B., Matthijs, G., Horiuti, K., Kobayashi, S., Goldman, Y. E., & Somlyo, A. V. (1989). Modulation of Ca²⁺-sensitivity and of the

time course of contraction in smooth muscle: a major role of protein phosphatases?, *Adv. Prot. Phosphatases ed.*, pp. 181-195. University Press, Leuven, Belgium.

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, 1325-1358.

Sparks, H. V. (1980). Effect of local metabolic factors on vascular smooth muscle. In *The Cardiovascular System. Vascular Smooth Muscle*, eds. Bohr, D. F., Somlyo, A. P., & Sparks, H. V., pp. 475-513. Am.Physiol.Soc., Bethesda, Maryland.

Spiegel, S. & Milstien, S. (2002). Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *Journal of Biological Chemistry* 277, 25851-25854.

Spiegel, S. & Milstien, S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 4, 397-407.

Stull, J. T., Lin, P. J., Krueger, J. K., Trewhella, J., & Zhi, G. (1998). Myosin light chain kinase: functional domains and structural motifs. *Acta Physiol Scand.* 164, 471-482.

Sutherland, C. M., Moretti, P. A., Hewitt, N. M., Bagley, C. J., Vadas, M. A., & Pitson, S. M. (2006). The calmodulin-binding site of sphingosine kinase and its role in agonist-dependent translocation of sphingosine kinase 1 to the plasma membrane. *J Biol.Chem.*

Sweeney, H. L., Yang, Z., Zhi, G., Stull, J. T., & Trybus, K. M. (1994). Charge replacement near the phosphorylatable serine of the myosin regulatory light chain mimics aspects of phosphorylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 1490-1494.

Takuwa, Y. (1996). Regulation of vascular smooth muscle contraction. The roles of Ca²⁺, protein kinase C and myosin light chain phosphatase. *Japanese Heart Journal* 37, 793-813.

Thompson, C. R., Iyer, S. S., Melrose, N., VanOosten, R., Johnson, K., Pitson, S. M., Obeid, L. M., & Kusner, D. J. (2005). Sphingosine kinase 1 (SK1) is recruited to nascent phagosomes in human macrophages: inhibition of SK1 translocation by *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Immunology* 174, 3551-3561.

Trybus, K. M., Waller, G. S., & Chatman, T. A. (1994). Coupling of ATPase activity and motility in smooth muscle myosin is mediated by the regulatory light chain. *Journal of Cell Biology* 124, 963-969.

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, 990-994.

Van Veldhoven, P. P., Gijssbers, S., Mannaerts, G. P., Vermeesch, J. R., & Brys, V. (2000). Human sphingosine-1-phosphate lyase: cDNA cloning, functional expression studies and mapping to chromosome 10q22(1). *Biochimica et Biophysica Acta* 1487, 128-134.

Van Veldhoven, P. P. & Mannaerts, G. P. (1994). Sphinganine 1-phosphate metabolism in cultured skin fibroblasts: evidence for the existence of a sphingosine phosphatase. *Biochem.J* 299 (Pt 3), 597-601.

VanBavel, E., Van Der Meulen, E. T., & Spaan, J. A. (2001). Role of Rho-associated protein kinase in tone and calcium sensitivity of cannulated rat mesenteric small arteries. *Exp.Physiol* 86, 585-592.

VanBavel, E., Wesselman, J. P., & Spaan, J. A. (1998). Myogenic activation and calcium sensitivity of cannulated rat mesenteric small arteries. *Circulation Research* 82, 210-220.

Venkataraman, K., Thangada, S., Michaud, J., Oo, M. L., Ai, Y., Lee, Y. M., Wu, M., Parikh, N., Khan, F., Proia, R. L., & Hla, T. (2006). Extracellular export of Sphingosine Kinase-1a contributes to the vascular S1P gradient. *Biochemical Journal*.

Volpe, P., Salviati, G., Di Virgilio, F., & Pozzan, T. (1985). Inositol 1,4,5-trisphosphate induces calcium release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Nature* 316, 347-349.

Wang, F., Van, B. J., Hobson, J. P., Movafagh, S., Zukowska-Grojec, Z., Milstien, S., & Spiegel, S. (1999). Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a G(i)-coupled cell surface receptor. Potential involvement in angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 274, 35343-35350.

Yatomi, Y., Igarashi, Y., Yang, L., Hisano, N., Qi, R., Asazuma, N., Satoh, K., Ozaki, Y., & Kume, S. (1997). Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum. *J.Biochem.* 121, 969-973.

Yokoyama, M. & Henry, P. D. (1979). Sensitization of isolated canine coronary arteries to calcium ions after exposure to cholesterol. *Circulation Research* 45, 479-486.

Young, K. W., Willets, J. M., Parkinson, M. J., Bartlett, P., Spiegel, S., Nahorski, S. R., & Challiss, R. A. (2003). Ca²⁺/calmodulin-dependent translocation of sphingosine kinase: role in plasma membrane relocation but not activation. *Cell Calcium* 33, 119-128.

Zhou, J. & Saba, J. D. (1998). Identification of the first mammalian sphingosine phosphate lyase gene and its functional expression in yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 242, 502-507.

Zlatkine, P., Mehul, B., & Magee, A. I. (1997). Retargeting of cytosolic proteins to the plasma membrane by the Lck protein tyrosine kinase dual acylation motif. *Journal of Cell Science* 110 (Pt 5), 673-679.

Curriculum Vitae

Bernhard Friedrich Décard geb. Peter

Geburtsdatum: 28.03.1979
Geburtsort: Hannover
Familienstand: verheiratet
Religion: römisch-katholisch
Adresse: Hektorstr. 33
45131 Essen
E-Mail: b.f.decard@googlemail.com

Schullaufbahn

1985 – 1989 Besuch der Paul Hindemith Grundschule in Freiburg.
1989 – 1998 Deutsch-Französisches Gymnasium Freiburg.
Erwerb des deutschen und französischen Abiturs mit naturwissenschaftlichem Schwerpunkt. Note 1,0.

Zivildienst

1998 – 1999 Ausbildung und Tätigkeit als Rettungssanitäter im Rahmen des Zivildienstes beim DRK Rheinberg.

Studium

2000 – 2002 Studium an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf.
Vorklinischer Abschnitt des Medizinstudiums. Physikum Note 2,0.
2002 – 2006 Studium an der Technischen Universität München (TUM).
Klinischer Abschnitt des Medizinstudiums, abgeschlossen mit der Note „sehr gut“ (1,49).

Berufserfahrungen

Januar-März 2007 Universitätsklinikum Essen. Assistenzarzt der Kardiologie im Westdeutschen Herzzentrum bei Prof. Dr. med. R. Erbel.

Seit Mai 2007 St. Josef Hospital, Klinikum der Ruhr-Universität Bochum. Assistenzarzt in der Klinik für Neurologie bei Prof. Dr. med. R. Gold.

Veröffentlichungen

Keller, M., Lidington, D., Vogel, L., Peter, B. F., Sohn, H. Y., Pagano, P. J., Pitson, S., Spiegel, S., Pohl, U., & Bolz, S. S. (2006). ***Sphingosine kinase functionally links elevated transmural pressure and increased reactive oxygen species formation in resistance arteries.*** FASEB Journal 20, 702-704.

Peter, B.F., Lidington, D., Harada, A., Bolz, H.J., Vogel, L., Heximer, S., Spiegel, S., Pohl, U., Bolz, S.S. (2008). ***Role of sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase 1 in the regulation of resistance artery tone.*** Circulation Research 2008 Aug 1; 103(3):315-24.

Peter, B.F., Gold, R. (2008). ***Schubförmige multiple Sklerose - B-Zell-Antikörper eröffnet hoffnungsvolle Perspektiven.*** Info Neurologie & Psychiatrie, Ausgabe 5, Mai 2008.

Lidington D., Peter B.F., Meissner A., Kroetsch J.T., Pitson S.M., Pohl U., Bolz S.S. (2009) ***The phosphorylation motif at serine 225 governs the localization and function of sphingosine kinase 1 in resistance arteries.*** Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2009; 29: 1916-1922.