

Aus dem Physiologischen Institut der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Vegetative Physiologie
Vorstand: Prof. Dr. U. Pohl

**Einfluss des Sphingosinkinase-Signalweges auf die Regulation des
basalen Tonus und der druckinduzierten myogenen Antwort**

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

vorgelegt von
Lukas Vogel

aus
München

Jahr
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. U. Pohl

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. M. Aepfelbacher

Prof. dr. med F. Krombach

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dr. med. Steffen-Sebastian Bolz

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 02.04.2004

für
meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1. Einleitung	4
2. Materialien.....	12
2.1 Versuchstiere	12
2.2 Präparat	12
2.4 Lösungen und Pharmaka	14
2.5 Hersteller der für die Puffer und das Kulturmedium verwendeten Substanzen	16
2.6 Sonstige verwendete Substanzen.....	16
3. Methoden	20
3.1 Präparation der arteriellen Widerstandsgefäße.....	20
3.2 Kanülierung der Widerstandsgefäße.....	21
3.3 Mikroskop und Versuchsaufbau.....	22
3.4 Fura-2-Methode	22
3.5 Calciummesssystem	23
3.6 Durchmesserregistrierung.....	25
3.7 RNA-Isolierung aus Gewebe mittels TRIzol-Reagenz	25
3.8 RNA-Isolierung aus Widerstandsgefäßen mittels RNeasy Protect Mini Kit	26
3.9 Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	27
3.10 Gelelektrophorese der RT-PCR Produkte.....	28
3.11 Inkubation der glatten Gefäßmuskulatur mit Fura 2-AM	29
3.12 Kultivierung und Transfektion der zu untersuchenden Widerstandsgefäße	30
3.13 Versuchsprotokoll	31
3.14 Auswertung und Statistik.....	31

4.	Ergebnisse	34
4.1	Effekte auf den Basaltonus in Widerstandsgefäßen	35
4.1.1	Effekte einer Überexpression der Sphingosinkinase (Sphk1) bzw. Hemmung der Sphingosinkinase (hSK-G82D) auf den Basaltonus	35
4.1.2	Effekte einer Überexpression der aktiven RhoA-Mutante L63RhoA auf den Basaltonus	35
4.1.3	Effekte einer Koexpression der Sphingosinkinase (Sphk1) mit der dominant negativen RhoA-Mutante N19RhoA	36
4.1.4	Effekte einer Koexpression der Sphingosinkinase (Sphk1) mit der dominant negativen Mutante der Rhokinase (KD1A)	36
4.1.5	Grafische Zusammenfassung der Effekte der verschiedenen, unter 4.1 aufgeführten, genetischen Manipulationen auf den Basaltonus in Widerstandsgefäßen	38
4.2	Effekte auf die druckinduzierte myogene Vasokonstriktion (myogene Antwort) in Widerstandsgefäßen	39
4.2.1	Druckinduzierte myogene Vasokonstriktionen in GFP-transfizierten Widerstandsgefäßen	39
4.2.3	Druckinduzierte myogene Vasokonstriktionen in Sphk1- oder hSK-G82D- transfizierten Widerstandsgefäßen	43
4.2.4	Druckinduzierte myogene Vasokonstriktionen in Widerstandsgefäßen, die Sphk1 und N19RhoA koexprimieren	43
4.2.5	Druckinduzierte myogene Vasokonstriktionen in Widerstandsgefäßen, die Sphk1 und KD1A koexprimieren	44
4.2.6	Druckinduzierte myogene Vasokonstriktionen in Widerstandsgefäßen, die die dominant aktive RhoA-Mutante L63RhoA exprimieren	44

4.2.7	Noradrenalin- und depolarisationsabhängige Vasokonstriktionen in Widerstandsgefäßen	45
4.2.8	Grafische Zusammenfassung der verschiedenen unter 4.2 aufgeführten genetischen Manipulationen auf die druckinduzierte myogene Vasokonstriktion in Widerstandsgefäßen	47
4.2.9	Vergleich der druckinduzierten Ca ²⁺ -Anstiege in GFP-, Sphk1-, hSK-G82D- und L63RhoA-transfizierten Widerstandsgefäßen.....	48
4.3	Erhöhung des Basaltonus in Sphk1-transfizierten Widerstandsgefäßen durch repetitive Auslösung myogener Antworten	49
4.4	Einfluss des Ruhetonus auf die Amplitude der folgenden myogenen Antwort	51
4.5.	Effekte exogenen Sphingosin-1-phosphats auf den Tonus isolierter Widerstandsgefäße	53
4.6	Nachweis des S1PR ₂ in der Hamsterlunge mittels RT-PCR	56
4.7.	Nachweis des S1PR-2 in Widerstandsgefäßen mittels RT-PCR.....	57
4.8	Effekte von S1PR ₂ -Sense und S1PR ₂ -Antisenseoligonukleotiden auf die durch exogenes S1P induzierten Änderungen des Tonus isolierter Widerstandsgefäße	58
5.	Diskussion.....	60
5.1	Diskussion der erhobenen Befunde	60
5.2.	Methodenkritik.....	76
6.	Zusammenfassung.....	83
7.	Literaturverzeichnis	86
8.	Danksagung.....	95
9.	Tabellarischer Lebenslauf	96

1. Einleitung

Pathologische Erhöhungen des Blutdrucks (Hypertonus) führen zu kardiovaskulären Erkrankungen, wie z.B. Arteriosklerose, Arteriosklerose oder Atherosklerose, Herzinfarkt und Schlaganfall. Diese sind die häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrieländern (Chobanian *et al.*, 2003). Dennoch kann bisher nur bei etwa 10% der unter Bluthochdruck leidenden Patienten eine eindeutige Ursache diagnostiziert werden, die eine *kausale* Therapie erlauben würde. Die restlichen 90% der hypertensiven Patienten leben mit der Diagnose eines „essentiellen“ Hypertonus und werden folglich nur symptomatisch therapiert.

Die Höhe des arteriellen Blutdrucks (ABD) wird im Organismus im wesentlichen durch zwei Größen bestimmt, nämlich das Herzzeitvolumen (HZV) und den totalen peripheren Widerstand (TPR), die im Ohmschen Gesetz als Faktoren miteinander verknüpft sind ($ABD = HZV \times TPR$). Ca. 50% des TPR sind in den distal im Gefäßbett gelegenen, den Kapillaren vorgeschalteten, arteriellen Widerstandsgefäßen (kleine Arterien und Arteriolen) lokalisiert (der Rest verteilt sich mit ca. 25% auf das Kapillarbett, mit ca. 19% auf die Aorta und große Arterien und mit ca. 7% auf das venöse System). Änderungen des Radius dieser kleinen Gefäße und somit ihres Strömungswiderstands führen unter physiologischen Bedingungen im Organismus zu den jeweils erforderlichen Perfusionsänderungen im nachgeschalteten Kapillarbett. Dies beruht darauf, dass nach dem Hagen-Poiseuille Gesetz selbst geringe Änderungen des Radius dieser Widerstandsgefäße bereits starke Änderungen des Strömungswiderstandes bewirken, da der Radius in der 4. Potenz in die Formel eingeht.

Es ist somit ersichtlich, dass die Mechanismen, die zur Regulation des Radius der Widerstandsgefäße beitragen, außer für die Regulation der Organperfusion in ihrer

Gesamtheit auch für die Regulation des systemischen Blutdrucks wesentliche Bedeutung haben. Die Änderungen des Radius der Widerstandsgefäße resultieren aus Änderungen des Kontraktionszustandes der zirkulär um das Lumen des Gefäßes angeordneten glatten Muskelzellen. Damit nehmen die Signalwege, die den Kontraktionszustand der glatten Muskelzellen und damit im Zusammenspiel mit endothelialen Faktoren, wie z.B. dem Stickstoffmonoxid (NO, (Furchgott & Zawadzki, 1980)) oder dem endothelabhängigen hyperpolarisierenden Faktor (EDHF (Bolz *et al.*, 1999; Bolz *et al.*, 2000a)), die Konstriktion der Widerstandsgefäße regulieren, eine Schlüsselstellung für das pathophysiologische Verständnis der Hypertonie und die Entwicklung neuer Therapiekonzepte ein.

Zudem wird klar, dass Modelle und Konzepte für diese Signalwege nur durch Untersuchung kleiner Widerstandsgefäße selbst entwickelt werden können. Dies ist der Grund, warum die in dieser Arbeit vorgestellten Befunde konsequent am Modell des isolierten Widerstandsgefäßes des Hamsters erhoben worden sind. Die Wahl dieses Versuchsmodells folgt der Erkenntnis, dass diese im distalen Teil des Gefäßbaumes lokalisierten Arterien maßgeblich den peripheren Widerstand regulieren und dass sich die tonusregulierenden Mechanismen in diesen kleinen Gefäßen signifikant von denen in bisher vorrangig untersuchten, großen Leitungsgefäßen unterscheiden.

Während bisher in Leitungsgefäßen und in aus diesen Gefäßen gewonnenen Zellen vornehmlich Signalwege untersucht wurden, die calciumabhängig die Kontraktion der glatten Muskelzellen regulieren (Cornwell & Lincoln, 1989; Cornwell *et al.*, 1991; Lincoln *et al.*, 1990), deuten neuere Studien darauf hin, dass auch calciumunabhängige Mechanismen für die Regulation des glattmuskulären Tonus eine wichtige Rolle spielen (Tran *et al.*, 1998; Pabelick *et al.*, 2000; Bolz *et al.*, 1999). Dabei ist besonders die Rolle der GTPase RhoA bei der Tonusregulation in Widerstandsgefäßen

ausführlich untersucht worden (Sauzeau *et al.*, 2001; Sakurada *et al.*, 2001; Chitaley *et al.*, 2001; Bolz *et al.*, 2003b).

Der zugrundeliegende Wirkmechanismus der RhoA-abhängigen Regulation des arteriellen Tonus ist eine Modulation der Ca^{2+} -Sensitivität in glatten Muskelzellen (Hirata *et al.*, 1992; Gong *et al.*, 1996; Bolz *et al.*, 2000b). Über die Regulation des Gefäßtonus in Widerstandsgefäßen spielt RhoA wahrscheinlich mittelbar eine wichtige Rolle für die Kontrolle des systemischen Blutdrucks. Letzteres ist bereits in vivo im Tiermodell gezeigt worden, indem bei drei pathogenetisch unterschiedlichen Hypertonusformen der Blutdruck durch Behandlung der Tiere mit dem chemischen Rhokinaseinhibitor Y27632 normalisiert werden konnte (Uehata *et al.*, 1997b).

RhoA beeinflusst die Ca^{2+} -Sensitivität des kontraktiven Apparates mittelbar durch Aktivierung der Rhokinase (Ishizaki *et al.*, 1996; Ishizaki *et al.*, 1997; Fujisawa *et al.*, 1996) und mindestens einer weiteren, ZIP-ähnlichen (ZIP-like) Kinase (Tamm *et al.*, 2001), welche eine Hemmung der Myosinleichtkettenphosphatase (MLCP) durch Phosphorylierung bewirken. (Amano *et al.*, 1996; Somlyo *et al.*, 1989; Kitazawa *et al.*, 1991; Somlyo & Somlyo, 1994). Die verringerte MLCP-Aktivität resultiert bei unverändertem intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel und unveränderter Myosinleichtkettenkinase-Aktivität in einer verstärkten Phosphorylierung am Serin 19, der sogenannten leichten Kette des Myosins (MLC_{20}) (Somlyo & Somlyo, 2000).

Für verschiedene Vasokonstriktoren konnte gezeigt werden, dass deren vasokonstriktorischen Effekte teilweise durch Aktivierung des RhoA/Rhokinase-Signalweges vermittelt werden (Coussin *et al.*, 2002). Die bereits angeführte Studie, in der die pharmakologische Hemmung der Rhokinase in drei genetisch unterschiedlichen Rattenhochdruckmodellen den Blutdruck senkte (Uehata *et al.*, 1997a), ist ein weiterer Beleg dafür, dass Änderungen der Aktivität des

RhoA/Rhokinase-Signalweges tatsächlich, vermutlich über eine Änderung des TPR, die Regulation des Blutdrucks beeinflussen.

Für die in dieser Studie verwendeten Widerstandsgefäße aus der Skelettmuskulatur des Hamsters konnte unsere Arbeitsgruppe schon früher zeigen, dass die durch exogen zugeführte, oxidierte Lipoproteine (oxidized low density lipoproteins, oxLDL) entstehenden Ca^{2+} -sensitivierenden, vasokonstriktionsverstärkenden Effekte ebenfalls durch Aktivierung von RhoA bzw. der Rhokinase vermittelt werden (Bolz *et al.*, 2000b). Die sich zunehmend abzeichnende Bedeutung von RhoA für die Regulation des mikrovaskulären Tonus wirft die Frage auf, wie die Aktivierung der RhoA/Rhokinase-Kaskade unter physiologischen Bedingungen reguliert ist. Dabei ist von besonderem Interesse, welche endogenen Mediatoren involviert sind, und ob Fehlfunktionen der durch diese Mediatoren angestoßenen Signalkaskaden zu einer Verstärkung der Konstriktion von Widerstandsgefäßen führen könnten, was wiederum im Gesamtorganismus einen Anstieg des systemischen Blutdrucks zur Folge haben könnte.

Auf der Suche nach möglichen endogenen Mediatoren des RhoA/Rhokinase-Signalweges fand sich ein interessanter Vorbefund. Der mitogene Effekt von oxLDL an pulmonalen glatten Muskelzellen wird nämlich durch den Sphingolipidmetaboliten Sphingosin-1-Phosphat (S1P) vermittelt. S1P wird über die Zwischenstufen Ceramid und Sphingosin aus dem Membranlipid Sphingomyelin gebildet (Auge *et al.*, 1999). Als Produkt der Sphingosinkinase (Sphk1 (Kohama *et al.*, 1998; Pitson *et al.*, 2000a)) spielt S1P eine bedeutende Rolle bei einer Vielzahl biologischer Prozesse, wie z.B. Zellwachstum und Angiogenese (Licht *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 1999) und vor allem bei zytoskelettalen Veränderungen, die durch die Aktivierung der Rho-Familie reguliert werden (Spiegel & Milstien, 2002; Kimura *et al.*, 2003). Die zahlreichen, verschiedenen

Effekte von S1P werden durch eine spezielle Rezeptorfamilie aus fünf spezifischen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, S1PR₁- S1PR₅, vermittelt (Pyne & Pyne, 2000).

Die dargestellten Eigenschaften machen das S1P zu einem interessanten Kandidaten für einen endogenen Mediator der Aktivität des RhoA/Rhokinase-Signalweges. Die vorliegende Arbeit sollte klären, ob diese mögliche Funktion des S1P auch in vaskulären glatten Muskelzellen eine Rolle spielt.

Die Untersuchung der möglichen Rolle des S1P für die Tonuskontrolle in Widerstandsgefäßen wurde in mehreren Schritten vorgenommen.

Zunächst wurde überprüft, ob *exogen* zugegebenes S1P am Modell des isolierten Widerstandsgefäßes dosisabhängige vasokonstringierende Wirkungen hat und ob diese Vasokonstriktionen tatsächlich über eine Aktivierung des RhoA/Rhokinase-Signalweges vermittelt waren.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Untersuchungen sollte dann die Funktion der Sphingosinkinase als wahrscheinlicher Quelle *endogen* synthetisierten S1Ps untersucht werden. Dem Enzym würde über die Beeinflussung der Konzentration des endogenen S1Ps in vaskulären glatten Muskelzellen und in der Gefäßwand eine wichtige Rolle als „Upstream-Modulator“ des RhoA-Signalweges zukommen.

Es sollten dabei die Auswirkungen einer veränderten Expression oder Aktivität der Sphingosinkinase auf den Ruhetonus der Gefäße und auf die druckinduzierte myogene Vasokonstriktion (myogene Antwort, MR) untersucht werden. Letztere ist eine zuerst durch Bayliss (Bayliss, 1919) zu Beginn des letzten Jahrhunderts beschriebene, intrinsische Fähigkeit glatter Muskelzellen, auf Dehnung mit einer anhaltenden Kontraktion zu reagieren. Im vaskulären System hat diese Eigenschaft glatter Muskelzellen, welche zu Ehren des Entdeckers heute als Bayliss-Effekt beschrieben wird, wesentliche Funktionen für die Autoregulation der

Organdurchblutung. Der Entdecker hat dies selbst bereits erkannt und trefflich mit den folgenden Worten beschrieben:

„The reaction possessed by the arteries is of such a nature as to provide as far as possible for the maintenance of a constant flow of blood through the tissues supplied by them, whatever may be the height of the general blood pressure”.

Bayliss erkannte aber auch schon die Möglichkeit einer positiven Rückkopplung:

“Thus, without the controlling government of the central nervous system, every rise of pressure would automatically cause a further rise, and every fall, from whatever cause, a further fall of blood pressure from peripheral vascular dilatation”.

Es ist tatsächlich gezeigt, dass die MR signifikant systemische vasokonstriktorische Effekte verstärkt und damit erheblich zum Anstieg des totalen peripheren Widerstandes bei Infusion von Vasokonstriktoren beitragen kann und somit direkt den systemischen Blutdruck beeinflusst (Metting *et al.*, 1989a).

Dennoch ist auch fast 100 Jahre nach der Erstbeschreibung noch immer weitgehend ungeklärt, wie glatte Muskelzellen die mechanische Stimulation durch Druckerhöhung in intrazelluläre Signale umwandeln, die letztendlich eine Vasokonstriktion induzieren.

Gut belegt ist, dass ein Anstieg des transmuralen Drucks zu einem umgehenden und anhaltenden Ca^{2+} -Anstieg in den glatten Muskelzellen der Widerstandsgefäße führt (D'Angelo *et al.*, 1997a; D'Angelo & Meininger, 1994; Hill & Meininger, 1994). Diesem umgehenden Anstieg folgt eine, über mehrere Minuten stetig zunehmende Vasokonstriktion, bei der in den durch uns untersuchten Skelettmuskel-Widerstandsgefäßen des Hamsters annähernd 50% der durch initialen Druck induzierten Aufdehnung rückgängig gemacht werden (de Wit *et al.*, 1998). Da der Tonus ohne weiteren Ca^{2+} -Anstieg kontinuierlich ansteigt, sind mit hoher Wahrscheinlichkeit Ca^{2+} -sensitivierende Mechanismen beteiligt (VanBavel *et al.*,

1998), wobei jüngere Literatur hier auf eine wesentliche Rolle des RhoA/Rhokinase-Signalweges hinweist (VanBavel *et al.*, 2001).

Dabei ist nicht bekannt, wie diese zwei calciumabhängigen und calciumunabhängigen Mechanismen zusammenspielen, um eine so komplexe und hoch reproduzierbare vaskuläre Reaktion wie die MR zu ermöglichen.

Hier könnte endogen freigesetztes S1P mit seinen Ca^{2+} -erhöhenden und RhoA-aktivierenden Eigenschaften als ein integrierender Stimulus wirksam werden. Interessanterweise ist die Aktivität des S1P-generierenden Enzyms Sphk1 bei Membrandepolarisation und Aktivierung der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle erhöht (Alemany *et al.*, 2001). Es ist bekannt, dass beide Effekte auch essentiell für das Zustandekommen einer MR sind, was uns zu der Hypothese führte, dass Sphk1 ein Teil der druckinduzierten Signalkaskade sein könnte.

Diese so abgeleitete Hypothese sollte überprüft werden, indem wir untersuchten, ob die Überexpression des Enzyms oder seine funktionelle Ausschaltung durch eine dominant negative Mutante (Pitson *et al.*, 2000b) die myogene Antwort beeinflusst.

In einem letzten Schritt sollte geklärt werden, welche(r) der S1P-Rezeptor(en) die vasokonstriktiven Wirkungen an den isolierten Skelettmuskel-Widerstandsgefäßen vermittelt/n. Dabei konzentrierten wir uns bei der Auswahl der „Kandidatenrezeptoren“ zunächst auf diejenigen, die prinzipiell in der Lage waren, den RhoA/Rhokinase-Signalweg zu aktivieren. Dies sind nach Takuwa (Takuwa, 2002) und Pyne (Pyne & Pyne, 2002) in erster Linie S1PR₂ und S1PR₃, deren Expression wir mittels RT-PCR in den Widerstandsgefäßen nachzuweisen versuchten. Die Expression der entsprechenden Rezeptorsubtypen sollte dann mit Hilfe von spezifischen Antisenseoligonukleotiden gezielt reduziert werden. Antisenseoligonukleotide sind unmodifizierte, oder chemisch modifizierte, einzelstrangige DNA-Moleküle mit einer Länge von 13 - 25 Nucleotiden. Sie verhindern die Translation der mRNA, indem sie

sich an diese binden und über die Aktivierung der RNase H die mRNA zerstören (Roush, 1997; Tamm *et al.*, 2001). Sollten also der S1PR₂ oder der S1PR₃ zur Vasokonstriktion der Widerstandsgefäße beitragen, müsste die Reduktion ihrer Expression Auswirkungen auf die S1P-induzierte Vasokonstriktion haben.

Um die geplanten Untersuchungen zur Bedeutung der Sphk1 und der an der Wirkung des S1P beteiligten Rezeptoren durchführen zu können, benutzten wir ein in unserem Labor entwickeltes Transfektionsmodell, welches für die glatten Muskelzellen im intakten Widerstandsgefäß eine für primäre Zellen ungewöhnlich hohe Transfektionsrate von über 95% ermöglichte (Bolz & Pohl, 2003). Die Gefäße wurden hierzu aus dem Musculus gracilis des Hamsters isoliert, in eine speziell entwickelte Apparatur eingebracht, und über einen Zeitraum von 19 - 22 Stunden am Leben gehalten. Essentiell war dabei, die Gefäße in einer optimierten Nährlösung dem gleichen transmuralen Druck, sowie der gleichen Längsdehnung und Wandschubspannung wie unter *in vivo* Bedingungen auszusetzen (Bolz *et al.*, 2000c). Die Expression der Sphk1, ihrer dominant negativen Mutante hSK-G82D (Pitson *et al.*, 2000b) und die der dominant negativen RhoA- bzw. Rhokinase-Mutanten in den glatten Muskelzellen isolierter Widerstandsgefäße konnte so gezielt gesteigert werden, um dann die Auswirkungen auf das Konstriktionsverhalten der intakten Widerstandsgefäße zu untersuchen.

2. Materialien

2.1 Versuchstiere

Syrische Goldhamster (Gattung *Mesocricetus*), Charles River Laboratory, Sulzfeld und eigene Zucht. Verwendung im Alter von 4 – 8 Monaten bei einem Gewicht zwischen 90 und 125 g

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 Durchmesser von $211 \pm 3 \mu\text{m}$ ($n = 131$).

2.3 Versuchsaufbau

~~☞~~ 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, $L = 100$ mm, $D_a = 1.0$ mm, $D_i = 0.58$ mm, $d_a = 0.16$ mm: Science Products GmbH, Hofheim
- ✂ Vertikal-Mikropipettenpuller, Modell P 2000, Sutter Instruments, USA
- ✂ Silikonschläuche, $D_i = 1.0$ mm, $d_a = 1.0$ mm: Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- ✂ Dreiwegehahn Discifix: 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

✂ 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, CaCl₂ 3.0; MgSO₄ 1.17, NaH₂PO₄ 1.2, Pyruvat 2.0, Glucose 5.0, MOPS 3.0, EDTA 0.02

Um die Widerstandsgefäße zu depolarisieren, wurde die K⁺-Konzentration der Lösung von 4.7 mmol/L auf 125 mmol/L erhöht. Gleichzeitig wurden in den unten aufgeführten Lösungen verschiedene Ca²⁺-Konzentrationen (0 - 3 mmol/L) eingestellt. Änderungen der KCl- und der CaCl₂-Konzentration wurden bezüglich der Ionenstärke durch Änderungen der NaCl-Konzentration kompensiert (Programm „Ionostat“, entwickelt am Physiologischen Institut der Universität Rostock).

✂ **Calciumfreier MOPS-Puffer:** NaCl 147, KCl 4.7, 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 wurden der pH-Wert mit 1N NaOH auf pH 7.4 titriert, die Pufferlösungen steril filtriert und bis zum Gebrauch für maximal 14 Tage bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

- ~~☞~~ **Kulturmedium:** Leibovitz L15, #L4386, Sigma, Inhaltsstoffe (Konzentrationsangaben in [mg/l]):
- CaCl₂ 140; KCl 400; KH₂PO₄ 60; MgCl₂ 93.68; MgSO₄ 97.67; NaCl 80000; NaH₂PO₄ 190.12; D(+) Galaktose 900; Phenolrot 10 (als pH-

Indikator); Na-Pyruvat 50; dl-Alanin 450; l-Arginin 500 (freie Base); l-Asparagin 200; l-Cystin 120 (freie Base); l-Glutamin 300; Glycin 200; l-Histidin 250 (freie Base); l-Isoleucin 250; l-Leucin 125; l-Lysin 125 (freie Base); dl-Methionin 150; dl-Phenylalanin 250; l-Serin 250; dl-Threonin 600; l-Tryptophan 20; l-Thyrosin 300; dl-Valin 200; d-Ca Pantothenat 1; Cholinchlorid 1; Folsäure 1; i-Inositol 2; Nikotinamid 1; Pyridoxal HCl 1; Flavin Mononucleotid 0.1; Thiaminmonophosphat(HCl) 1.

Vor der Verwendung wurde das Stammmedium mit 15% hitzeinaktiviertem (50min bei 56°C) Kälberserum (Cool Calf 2, #C6204, Sigma), 20000 U/l Penicillin, 20 mg/l Streptomycin und 0.4 µmol/l L-Glutamin versetzt. Anschließend wurde die Lösung mit 1N HCl unter Zuhilfenahme eines pH-Meters auf pH 7.4 eingestellt und das fertige Kulturmedium mit Sterilfilter in sterile 100 ml-Flaschen filtriert.

2.5 Hersteller der für die Puffer und das Kulturmedium verwendeten Substanzen

~~☞~~ NaCl, KCl, NaH₂PO₄, Glucose, EDTA: Merck, Darmstadt

~~☞~~ MgSO₄: Fluka Chemie AG, Schweiz

~~☞~~ MOPS, Leibovitz L50, 15% Kälberserum (Cool Calf 2), Penicillin, Streptomycin, L-Glutamin: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

~~☞~~ Pyruvat: Serva GmbH & Co KG, Heidelberg

2.6 Sonstige verwendete Substanzen

~~☞~~ Sphingosin-1-Phosphat (S1P), Biomol, Hamburg

- ~~☞~~ Sphingosinkinase (Sphk1)-Plasmid (Kohama *et al.*, 1998), Sarah Spiegel, Medical College of Virginia, Virginia Commonwealth University, Richmond, USA
- ~~☞~~ dominant negative Mutante der Sphk1 hSk-G82D (Pitson *et al.*, 2000b), Dr. Stuart Pitson, Hanson Research Center and Institute of Medical and Veterinary Science, Adelaide, Australia
- ~~☞~~ N19RhoA, Dr. Alan Hall, University College London, UK (Qiu *et al.*, 1995)
- ~~☞~~ KD1A (Itoh *et al.*, 1999), Dr. Shuh Narumiya, Dept. of Pharmacology, Kyoto University Faculty of Medicine, Sakyo, Kyoto, Japan
- ~~☞~~ S1PR₂- Sense-Primer, human, modifiziert, MWG-Biotech, Ebersberg
5`-ACA TAA TGC TTG GCG TAG AGA G-3`
- ~~☞~~ S1PR₂-Antisense-Primer, human, modifiziert, MWG-Biotech, Ebersberg
5`-CTC TCT ACG CCA AGC ATT ATG T-3`
- ~~☞~~ S1PR₂-Primer, human, MWG-Biotech, Ebersberg
S1PR₂_for: 5`-CTC TCT ACG CCA AGC ATT ATG TGC T-3`
S1PR₂_rev: 5`-ATC TAG ACC CTC AGA CCA CCG TGT TGC CCT C-3`
- ~~☞~~ GAPDH-Hamster-Primer, MWG-Biotech AG, Ebersberg
GAP-C_for: 5`-TCT ACC CAT GGC AAG TTC AAA GGC-3`
GAP-C_rev: 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)
- ✂ Natriumnitroprussid (SNP): Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Stammlösung 100mmol/L in Natriumacetat gelöst, täglich neu angesetzt)
- ✂ Y27632 [(+)-(R)-trans-4-(1-aminoethyl)-N-(4-pyridyl)]: Yoshitomie Pharmaceutical Industries, Ltd, Osaka, Japan
- ✂ *Clostridium botulinum* Exoenzym C3 Transferase (C3) (Aktories & Hall, 1989): Dr. Martin Äpfelbacher, Institut für Mikrobiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München
- ✂ TRIzol Reagenz (enthält Phenol und Guonidinisothiocyanat), Invitrogen, Karlsruhe
- ✂ Chloroform, H₂O gesättigt, Merck Darmstadt
- ✂ 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), Dithiothreit-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 der arteriellen Widerstandsgefäße

Die zu untersuchenden Gefäße wurden aus dem *Musculus gracilis* des Hamsters isoliert. Die Tiere wurden zuvor durch Injektion einer letalen Dosis (50 mg/kg Körpergewicht) des Anästhetikums Pentobarbital-Natrium getötet und anschließend an den Hinterläufen rasiert.

Zur Präparation wurden die Tiere auf dem eigens hierfür entwickelten Präparationstisch auf dem Rücken liegend an den Hinterläufen mit speziellen Klammern fixiert. Im Anschluss daran wurden die Haut und das subkutane Fettgewebe an der linken Oberschenkelinnenseite unter konstanter Superfusion (12 ml/h) mit vorgekühlter (4°C) Standard-MOPS-Pufferlösung entfernt.

Unter einem Operationsmikroskop wurde mit einer Irisschere und mikrochirurgischen Pinzetten der zuvor dargestellte *Musculus gracilis* an der Sehne durchtrennt und zur Seite geklappt. Nach Abtrennung der Begleitvene wurden Gefäßabschnitte von Abzweigungen aus der *Arteria femoralis profunda* (erste oder zweite Generation, Außendurchmesser 180 - 240 µm, Länge 1.0 – 2.0 mm) von Binde- und Fettgewebe befreit. Anschließend wurden die Gefäße entnommen und entweder sofort zur Kanülierung in ein Organbad eingebracht oder bei 4°C bis zu 24 Stunden in Standard-MOPS-Pufferlösung aufbewahrt und dann kanüliert, was weder die Noradrenalin-induzierten Kontraktionen noch die endothelabhängigen Dilatationen nach Gabe von Acetylcholin in diesen Arterien beeinflusste.

3.2 Kanülierung der Widerstandsgefäße

Für die Kanülierung der Gefäße wurden Borosilikatglaskapillaren verwendet, die mit Hilfe eines Laserpipettenpullers fein ausgezogen wurden. Die Spitzen wurden mit der Schere so gekappt, dass das Lumen der Pipette einen Durchmesser von ca. 30 µm hatte. Die Pipetten wurden an den zwei gegenüberliegenden Auslegern des in unserer Werkstatt entwickelten Versuchsaufbaus befestigt, die durch Mikromanipulatoren auf der einen Seite in der Höhe und auf der anderen Seite in allen drei Ebenen des Raumes stufenlos verstellbar waren. Die Pipetten ragten in einem Winkel von ca. 45° in ein aus Edelstahl gefertigtes Organbad, dessen Boden eine 50 µm dicke Quarzglasscheibe bildete. Am anderen Ende der Pipette wurde ein mit einem Dreiwegehahn versehener Silikonschlauch aufgeschoben, durch den die Pipetten blasenfrei mit Standard-MOPS-Pufferlösung gefüllt wurden. An den Dreiwegehahn der Seite, die zuerst kanüliert wurde, wurde eine Heidelberger Verlängerung, die an einem 50 cm hohen Stativ befestigt wurde, angeschlossen und ebenfalls blasenfrei mit Standard-MOPS-Pufferlösung gefüllt.

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

3.3 Mikroskop und Versuchsaufbau

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

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

3.4 Fura-2-Methode

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

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

Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 emittiert nach Anregung Licht der Wellenlänge 510 nm. Unter calciumfreien Bedingungen zeigt er ein Fluoreszenzmaximum bei Anregung

mit Licht der Wellenlänge 380 nm. Mit steigender Calciumbindung nimmt dieses Maximum ab, während es bei Anregung mit 340 nm zunimmt. Es kommt somit zu einer zunehmenden Verschiebung des Fluoreszenzmaximums zur Anregungswellenlänge 340 nm.

3.5 Calciummesssystem

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

Die intrazelluläre Fura-2-Konzentration der glatten Gefäßmuskelzellen bleibt während einer Versuchsdurchführung nicht stabil. Sie nimmt durch Auswaschen, aktiven Transport in den Extrazellulärraum und photochemischen Zerfall ab. Um dennoch Aussagen über intrazelluläre Calciumveränderungen treffen zu können, wurde bei der Auswertung der Versuche die Ratio $R (F_{350nm}/F_{380nm})$ betrachtet, die unabhängig von

der Farbstoffkonzentration für eine gegebene Calciumkonzentration konstant bleibt. Bei Kenntnis der Ratio R , ihres Maximal- und Minimalwertes und der Dissoziationskonstanten (K_d) von Calcium lässt sich mit Hilfe der Formel $[Ca^{2+}] = K_d \times ((R - R_{min}) / (R_{max} - R)) \times (S_{f2} / S_{b2})$ von Grynkiewicz *et al.* ((Grynkiewicz *et al.*, 1985) die freie Calciumkonzentration berechnen. In dieser Formel steht K_d für die effektive Dissoziationskonstante von Fura-2 bzgl. Calciumkomplexierung, R für „ratio“- das Verhältnis der gemessenen Intensitäten bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ (Fura-2- Ca^{2+} -Komplex) und $\lambda = 380 \text{ nm}$ (freies Fura-2) nach Abzug der Autofluoreszenz; R_{min} und R_{max} sind die jeweiligen Ratiowerte bei Abwesenheit von bzw. voller Sättigung mit Calcium; (S_{f2}/S_{b2}) ist das durch Eichung an Calciumlösungen ermittelte Intensitätsverhältnis von freiem und gebundenen Fura-2 bei $\lambda = 380 \text{ nm}$).

Nach Meininger *et al.* (Meininger *et al.*, 1991) ist die Bestimmung der Ca^{2+} -Konzentration in intakten Widerstandsgefäßen problematisch und ungenau. Wir haben deshalb auf die Angabe absoluter Konzentrationen verzichtet und stattdessen die Änderungen der Ratio in % angegeben. Diese Angabe der Änderungen in % ist zulässig, da die Kalibrationskurve für unser Calciummeßsystem in einem Ca^{2+} -Konzentrationsbereich, der die physiologisch relevanten Konzentrationen einschließt (42.2 - 1520 nmol), einen linearen Verlauf zeigt. Die Fluoreszenzratio F_{340nm}/F_{380nm} 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 8mmol/L $MnCl_2$ noch messbar war.

Mit der niedrigen Fura 2-Konzentration, welche in diesen Versuchen benutzt wurde, waren keine funktionell relevanten Ca^{2+} -Pufferungseffekte nachweisbar, d.h. beladene und unbeladene Arterien zeigten dieselbe Kontraktionsamplitude gegenüber

Noradrenalin, Angiotensin und Erhöhungen des transmuralen Drucks (myogene Vasokonstriktion).

3.6 Durchmesserregistrierung

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

3.7 RNA-Isolierung aus Gewebe mittels TRIzol-Reagenz

modifiziert nach Herstellerangaben (*Invitrogen life technologies*)

Die aus dem Hamster isolierten Widerstandsgefäße wurden in ein mit flüssigem Stickstoff vorgekühltes Pistill gegeben und mit Hilfe eines ebenfalls vorgekühlten Mörsers zerstoßen. Das zerstoßene Gewebe wurde rasch in ein 2ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf), ebenfalls vorgekühlt, überführt und mit 1 ml TRIzol Reagenz überschichtet, homogenisiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Dissoziation von Nucleoproteinkomplexen zu vervollständigen. Anschließend wurden 200 µl Chloroform, H₂O-gesättigt, zugegeben, das Reaktionsgefäß geschlossen, 15 sec von Hand geschüttelt und für 2 bis 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Probe 15 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert. Um den Phenolgehalt zu reduzieren, wurde dieser Schritt in Abweichung von den Herstellerangaben wiederholt, nachdem die obere, wässrige und RNA-haltige Phase in ein neues Eppendorfgefäß

überführt und somit von der DNA und den Proteinen der unteren bzw. Interphase abgetrennt wurde. Im Anschluss wurde wiederum die obere Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zur Ausfällung der RNA wurden 500 µl Isopropylalkohol zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei 12.000 g und 4°C wurde die gefällte RNA in Form eines Pellets sichtbar. Zum Waschen der RNA wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 1ml Ethanol 75% (in DEPC-H₂O) versetzt, gemixt und erneut 5 min bei 7.500 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend getrocknet und in 20 - 50 µl DEPC-H₂O gelöst. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA erfolgte photometrisch. (Sambrook et al., Molecular cloning 2nd edition, cold spring, laboratory Press, 1989).

3.8 RNA-Isolierung aus Widerstandsgefäßen mittels RNeasy Protect Mini Kit

Die aus dem Hamster isolierten Widerstandsgefäße wurden in ein mit flüssigem Stickstoff vorgekühltes Pistill gegeben und mit Hilfe eines ebenfalls vorgekühlten Mörsers zerstoßen. Das zerstoßene Gewebe wurde rasch in ein 2 ml-Eppendorfgefäß, ebenfalls vorgekühlt, überführt und 350 – 600 µl RLT-Lysispuffer zugegeben. Das Lysat wurde direkt in eine QIAshredder spin column überführt und für 2 min bei 10000 U/min zentrifugiert. Der gebildete Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 350 – 600 µl Ethanol 70% versetzt und sofort durch Pipettieren gemischt (nicht zentrifugiert). Dann wurde die Probe unverzüglich in eine RNeasy mini column überführt und 15 sec bei 10000 U/min zentrifugiert. Im Anschluss daran wurden der Überstand verworfen, 700 µl RW-1-Puffer auf die Säule gegeben und, um die Säule zu waschen, 15 sec bei 10000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals verworfen, die Säule in ein neues 2 ml-Eppendorfgefäß überführt und mit 500 µl RPE-Puffer versetzt und 15 sec bei 10000 U/min zentrifugiert, um die

„RNeasy silica-gel membrane“ zu trocknen. Die Flüssigkeit wurde verworfen und die Säule wurde in das gleiche 2ml-Eppendorfgefäß gesteckt. Dieser Schritt wurde nach 2 min wiederholt. 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 1 min Zentrifugation wurde die isolierte RNA entweder sofort weiterverarbeitet oder bei –80°C gelagert.

3.9 Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

modifiziert nach Herstellerangaben Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Die RT-PCR besteht aus zwei Schritten. Im ersten Schritt, der reversen Transkription (RT), wird die interessierende RNA in cDNA umgeschrieben. Im zweiten Schritt, der Polymerase Kettenreaktion (PCR), wird die cDNA so stark amplifiziert, dass sie im Agarosegel als Bande sichtbar gemacht werden kann. In beiden Fällen sind spezifische Primer nötig, um die gewünschte RNA zu vervielfältigen. Der von der Firma Roche angebotene Kit „Titan One Tube RT-PCR System“ ermöglicht durch Optimierung des Puffers diese beiden Schritte in einem einzigen Ansatz. Für die RT wird DMSO und die AMV-Reverse-Transkriptase verwendet, die bei höheren Temperaturen arbeiten kann als andere Transkriptasen. So wird die Bildung von RNA-Haarnadel-Strukturen vermieden, die die RT abbrechen lassen. Die PCR läuft unter Verwendung der Enzyme *Thermophilus aquaticus*- (*Taq*-) sowie *Pyrococcus woesei*- (*Pwo*-) DNA-Polymerase ab. Die *Taq* Polymerase zeichnet sich durch eine hohe Geschwindigkeit und hohe Zuverlässigkeit aus, die *Pwo*-Polymerase ist in der Lage, gewissermaßen Korrektur zu lesen und reduziert so die Fehlerquote um ca. 60 - 70%. Durch die Optimierung des Puffers, der sowohl ein einwandfreies Arbeiten der reversen Transkriptase als auch der DNA Polymerasen ermöglicht, ist es möglich

geworden, die RT-PCR in einem Reaktionsgefäß ohne Umpuffern durchzuführen. Des weiteren wurde durch die Abstimmung des Enzymsystems die Sensitivität erhöht. Das Amplifikationsprotokoll wurde auf die gleichzeitige Detektion von S1PR₂ und GAPDH optimiert, die zwar in unterschiedlichen Reaktionsgefäßen, aber zur gleichen Zeit und unter Einsatz desselben RNA-Materials erfolgte. Zuerst wurde 30 min bei 50°C inkubiert (Angabe Roche), um die reverse Transkription ablaufen zu lassen. Anschließend folgte eine zweiminütige Denaturierung bei 94°C, die die reverse Transkriptaseaktivität terminierte. Die eigentliche PCR lief in 36 Zyklen ab, die aus 10sekündiger Denaturierung bei 94°C, gefolgt von einem 30sekündigem Annealing der Primer bei 55°C und 45sekündiger Transfektionszeit bestanden. Letztere wurde in den letzten 25 Zyklen je Zyklus um 5 sec erhöht, um die Abnahme der Polymeraseaktivität durch die Denaturierung auszugleichen. Die Temperaturwerte wurden vom Hersteller als die für optimal ermittelten empfohlen. Die vom Hersteller als optimal beschriebene Mg²⁺-Konzentration für die RT-PCR bei obigen Protokoll ist 1,5 mM Magnesium. Durch Anheben der Konzentration auf 3,0 mM konnte die Spezifität und Sensitivität unserer Banden deutlich verbessert werden.

3.10 Gelelektrophorese der RT-PCR Produkte

Für die Herstellung des Agarosegels wurden 0.4 g Agarose eingewogen und in 40 ml Tris-EDTA Puffer kurz aufgekocht. 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. Die erfolgreiche Durchführung der Elektrophorese, was mit einer guten optischen Trennung der Banden des Längenstandards gleichzusetzen ist, konnte mit Hilfe der Fluoreszenz des in die DNA-Fragmente eingelagerten Ethidiumbromids durch UV-Bestrahlung auf dem Transluminator festgestellt werden.

3.11 Inkubation der glatten Gefäßmuskulatur mit Fura 2-AM

Die zu untersuchenden Widerstandsgefäße wurden mit einer täglich frisch angesetzten Lösung, bestehend aus 5% Rinderserumalbumin (BSA), 2 $\mu\text{mol/l}$ Fura 2-AM und 200 μl Indomethacin in 5 ml Standard-MOPS-Puffer gelöst, inkubiert. Dazu wurde das ganze Organbadvolumen gegen die Inkubationslösung ausgetauscht.

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

Durch die von uns verwendete niedrige Konzentration von Fura 2-AM wurden mögliche calciumpuffernde Effekte des Farbstoffs auf ein Ausmaß reduziert, dass die durch Noradrenalin ausgelöste Vasokonstriktion in beladenen und unbeladenen Gefäßen nicht signifikant verschieden waren.

3.12 Kultivierung und Transfektion der zu untersuchenden Widerstandsgefäße

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

Auch für die selektive Transfektion der glatten Muskelzellen mit Plasmiden wurde die Standard-MOPS-Pufferlösung im Organbad zunächst durch das Kulturmedium Leibovitz L15 ersetzt. Die eigentliche Transfektionslösung wurde hergestellt, indem 5 µg des Plasmids in 150 ml der im Transfektionskit enthaltenen Pufferlösung gelöst und nach Zugabe von 40 µl Enhancer kurz gemischt wurde. Nach 3 min wurden 60 µl Effectene zugegeben und wiederum kurz gemischt. Nach weiteren 15 min wurde 1 ml des Kulturmediums L15 zugegeben und mit Hilfe einer Pipette vermischt. Diese Transfektionslösung wurde dann zusätzlich zum Leibovitzmedium in das Organbad pipettiert. Die Widerstandsgefäße wurden bei Raumtemperatur (28°C) 19 – 21 Stunden inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Leibovitzmedium durch Standard-MOPS-Pufferlösung ersetzt und mit Ca²⁺-Indikator Fura 2-AM inkubiert. (siehe 3.11)

3.13 Versuchsprotokoll

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

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 (5 von 151 Gefäßen). Im Anschluss an diese Funktionalitätstests wurde das eigentliche Versuchsprotokoll gestartet (siehe Ergebnisteil).

3.14 Auswertung und 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 µmol/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 :

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

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

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

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

($dia_{distended}$ = 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.

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

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

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

Steady state-Werte verschiedener Gruppen wurden mit ANOVA und folgender post hoc Analyse (Tukey) der Mittelwerte verglichen.

Unterschiede wurden als signifikant angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5% war ($p < 0.05$).

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

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

4. Ergebnisse

Die hier vorgestellten Experimente an isolierten Widerstandsgefäßen des Hamsters sind im Zeitraum vom Dezember 2000 bis zum Februar 2003 durchgeführt worden. Dabei sind die an 131 Gefäßen erhobenen Befunde statistisch ausgewertet worden. Insgesamt sind 151 Gefäße isoliert und kanüliert worden, von denen 20 jedoch nicht untersucht wurden. Die Gründe hierfür gliedern sich wie folgt:

1. fehlende Vasodilatation in vorkontrahierten Arterien nach Gabe von 1 $\mu\text{mol/L}$ Acetylcholin (5 Arterien)
2. Okklusion der zuführenden Glaspipette über Nacht (4 Arterien)
3. Leerlaufen des Organbades über Nacht (im kompletten Organbad nicht sichtbare Brüche des Quarzglas unter der Gummidichtung, 4 Arterien)
4. Bruch einer der Glaspipetten bei Aufsetzen des experimentellen Aufbaus auf die Wärmeplatte des Mikroskops (4 Arterien)
5. fehlende Konstriktion auf 1 $\mu\text{mol/L}$ Noradrenalin (3 Arterien)

Wie bereits im Methodenteil beschrieben, wurden DNA Plasmide in die glatten Muskelzellen der intakten Widerstandsgefäße eingebracht, indem diese für 18 - 21 h mit Kulturmedium inkubiert wurden, welches Antibiotika (Penicillin/Streptomycin), das nicht-liposomale Transfektionsreagenz Effectene² (16 $\mu\text{l/ml}$, Qiagen) und das jeweilige Plasmid enthielt.

Mögliche unspezifische Effekte der Transfektionsmethode konnten in Vorversuchen ausgeschlossen werden, da nichttransfizierte Arterien und solche, welche ein fluoreszierendes Protein der Meeresqualle, GFP (green fluorescent protein), exprimierten, einen Ruhetonus (9 \pm 2%), Vasokonstriktionen nach Stimulation mit 0.3 $\mu\text{mol/L}$ Noradrenalin (48 \pm 4%), myogene Antworten (60 \pm 12%) und Dilatationen nach Gabe von 1 $\mu\text{mol/L}$ ACh (84 \pm 7%) zeigten, die sich nicht signifikant von den

entsprechenden Parametern in frisch isolierten (Bolz *et al.*, 1999) oder kultivierten (Bolz *et al.*, 2000c) Widerstandsgefäßen unterschieden.

4.1 Effekte auf den Basaltonus in Widerstandsgefäßen

4.1.1 Effekte einer Überexpression der Sphingosinkinase (Sphk1) bzw. Hemmung der Sphingosinkinase (hSK-G82D) auf den Basaltonus

In dieser Versuchsreihe wurden die Effekte einer Überexpression der Sphingosinkinase (Sphk1, $\text{dia}_{\text{max}} 230 \pm 6 \mu\text{m}$, $R_{\text{basal}} 1.16 \pm 0.07$, $n = 12$) oder ihrer dominant negativen Mutante (hSK-G82D, $\text{dia}_{\text{max}} 247 \pm 5 \mu\text{m}$, $R_{\text{basal}} 0.91 \pm 0.02$, $n = 16$) auf den Ruhetonus der Widerstandsgefäße untersucht. GFP-transfizierte Widerstandsgefäße (GFP, $\text{dia}_{\text{max}} 218 \pm 7 \mu\text{m}$, $R_{\text{basal}} 1.26 \pm 0.09$, $n = 18$) dienten als Kontrollgruppe. Diese zeigten nach einer Transfektionszeit von 19 Stunden bei 45 mmHg einen Ruhetonus, der $10 \pm 1\%$ des dia_{max} betrug.

Die mit der aktiven Sphk1-Mutante transfizierten Gefäße zeigten bei 45 mmHg eine signifikante Zunahme des Ruhetonus auf $23 \pm 3\%$ des dia_{max} ($p < 0.05$).

Im Gegensatz dazu wurde der Ruhetonus in den mit der dominant negativen Sphingosinkinasemutante transfizierten Gefäßen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant auf 2% des dia_{max} reduziert ($p < 0.05$).

4.1.2 Effekte einer Überexpression der aktiven RhoA-Mutante L63RhoA auf den Basaltonus

In diesen Widerstandsgefäßen wurde der Ruhetonus der Gefäße nach Transfektion mit der aktiven Mutante von RhoA (L63RhoA, $\text{dia}_{\text{max}} 223 \pm 8 \mu\text{m}$, $R_{\text{basal}} 1.29 \pm 0.06$, $n = 8$) untersucht.

Im Vergleich zu GFP-transfizierten Gefäßen war in L63RhoA-transfizierten Widerstandsgefäßen der Grundtonus signifikant auf $22 \pm 2\%$ des dia_{max} erhöht (vs $10 \pm 1\%$ des dia_{max} in GFP-transfizierten Gefäßen).

4.1.3 Effekte einer Koexpression der Sphingosinkinase (Sphk1) mit der dominant negativen RhoA-Mutante N19RhoA

Um zu untersuchen, ob die basaltonussteigernde Wirkung einer Überexpression von Sphk1 durch eine Aktivierung des RhoA/Rhokinasesignalweges vermittelt war, wurde in dieser Versuchsgruppe der Ruhetonus der Widerstandsgefäße nach Koexpression der aktiven Mutante der Sphingosinkinase (Sphk1) mit der negativen Mutante von RhoA (N19RhoA) verglichen ((Sphk1 + N19RhoA, dia_{max} $242 \pm 9 \mu\text{m}$, R_{basal} 1.07 ± 0.11 , $n = 8$).

Die Koexpression von N19RhoA führte zu einer signifikanten Reduktion des in mit Sphk1 transfizierten Gefäßen deutlich erhöhten Ruhetonus. Er entsprach in Sphk1 + N19RhoA – Widerstandsgefäße nur noch $1.0 \pm 0.3\%$ des dia_{max} ($p < 0.05$).

4.1.4 Effekte einer Koexpression der Sphingosinkinase (Sphk1) mit der dominant negativen Mutante der Rhokinase (KD1A)

In Erweiterung der unter 4.1.3. beschriebenen Versuche, wurde in dieser Versuchsreihe der Ruhetonus der Gefäße nach Doppeltransfektion mit Sphk1 und der dominant negativen Mutante der Rhokinase KD1A (Sphk1 + KD1A, dia_{max} $239 \pm 8 \mu\text{m}$, R_{basal} 0.94 ± 0.03 , $n = 8$) mit dem nach einfacher Transfektion mit Sphk1 verglichen. Die Untersuchungen sollten dazu dienen, zu überprüfen, ob auch die Rhokinase als ein mögliches Zielprotein von RhoA an der Vermittlung der basaltonussteigernden Wirkungen einer Sphk1-Transfektion beteiligt ist.

Die Koexpression der dominant negativen Mutante der Rhokinase (KD1A) mit der Sphk1 reduzierte den Ruhetonus der Gefäße auf $2.8 \pm 1.0\%$ ($p < 0.05$) des maximalen Durchmessers. Diese Reduktion war sowohl gegenüber der GFP-Kontrolle wie auch gegenüber den nur mit Sphk1 transfizierten Gefäßen signifikant.

4.1.5 Grafische Zusammenfassung der Effekte der verschiedenen, unter 4.1 aufgeführten, genetischen Manipulationen auf den Basaltonus in Widerstandsgefäßen

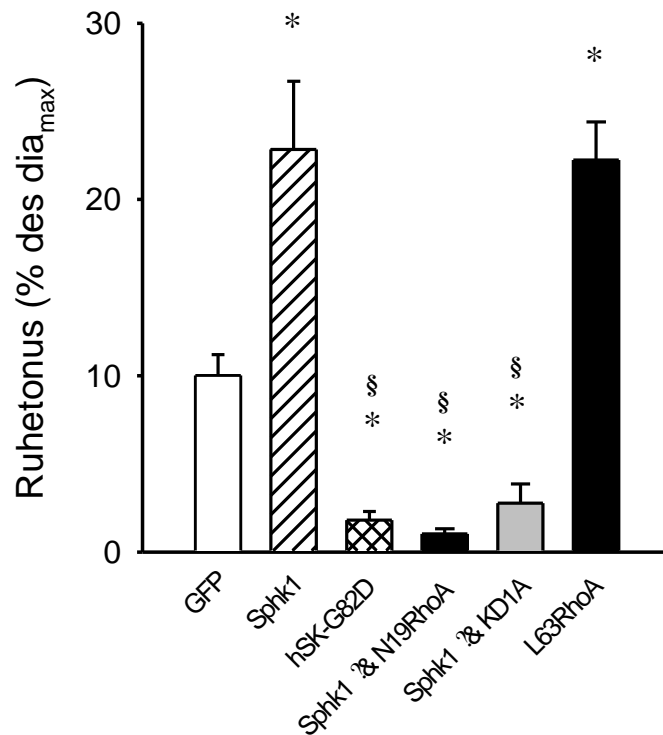


Abb. 01: Darstellung des Basaltonus in Gefäßen, die mit GFP, Sphingosinkinase (Sphk1), der dominant negativen Mutante der Sphingosinkinase (hSk-G82D), der dominant aktiven RhoA-Mutante L63Rho oder mit Sphk1 in Kombination mit entweder der dominant negativen Mutante des RhoA (N19RhoA) oder der Rhokinase (KD1A) transfiziert wurden. (dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der steady state-Antworten nach 7min, * entspricht $p < 0.05$ im Vergleich aller Gruppen mit der GFP-transfizierten Kontrolle; § entspricht $p < 0.05$ im Vergleich mit Sphk1).

4.2 Effekte auf die druckinduzierte myogene Vasokonstriktion (myogene Antwort) in Widerstandsgefäßen

4.2.1 Druckinduzierte myogene Vasokonstriktionen in GFP-transfizierten Widerstandsgefäßen

In dieser Versuchsreihe wurde untersucht, ob die Aktivierung des RhoA/Rhokinasesignalweges durch die Sphk1 ein Mechanismus ist, der wesentlich für das Zustandekommen der druckinduzierten myogenen Vasokonstriktion („myogene Antwort“) ist.

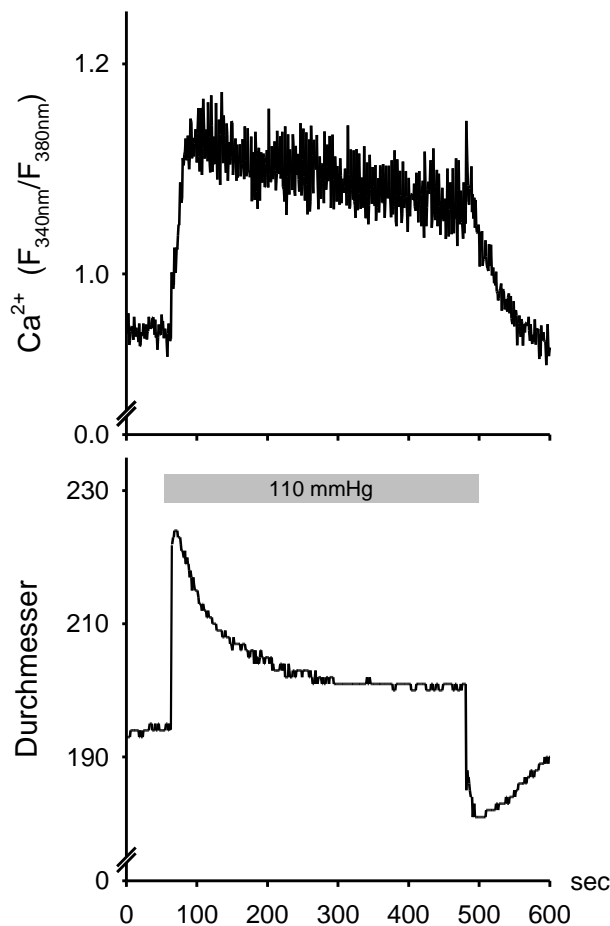


Abb. 02a: Repräsentative Originalregistrierung der druckinduzierten (45 auf 110 mmHg) Änderungen des glattmuskulären Ca^{2+} (oberer Graph) und des Gefäßdurchmessers (unterer Graph) isolierter Widerstandsgefäße des Hamsters.

Abb. 02b zeigt die grafische Auswertung druckinduzierter myogener Vasokonstriktionen in mit GFP transfizierten Gefäßen. Die myogene Antwort wurde durch eine Erhöhung des transmuralen Drucks von 45 mmHg auf 110 mmHg ausgelöst. Gemessen wurde der 7 min nach dem Drucksprung erreichte Durchmesser, der relativ in Prozent Konstriktion der durch den Drucksprung erreichten Aufdehnung des Gefäßes ("reversal of initial distention, RID") angegeben wurde.

In denen als Kontrollgruppe dienenden, mit GFP transfizierten Gefäßen (R_{basal} : 1.13 ± 0.09) wurden $60 \pm 9\%$ der initialen Aufdehnung (von $196 \pm 11 \mu\text{m}$ auf $220 \pm 11 \mu\text{m}$, entsprechend $24 \pm 2 \mu\text{m}$, $n = 9$) durch die myogene Antwort neutralisiert (Durchmesser nach 7 min: $205 \pm 10 \mu\text{m}$).

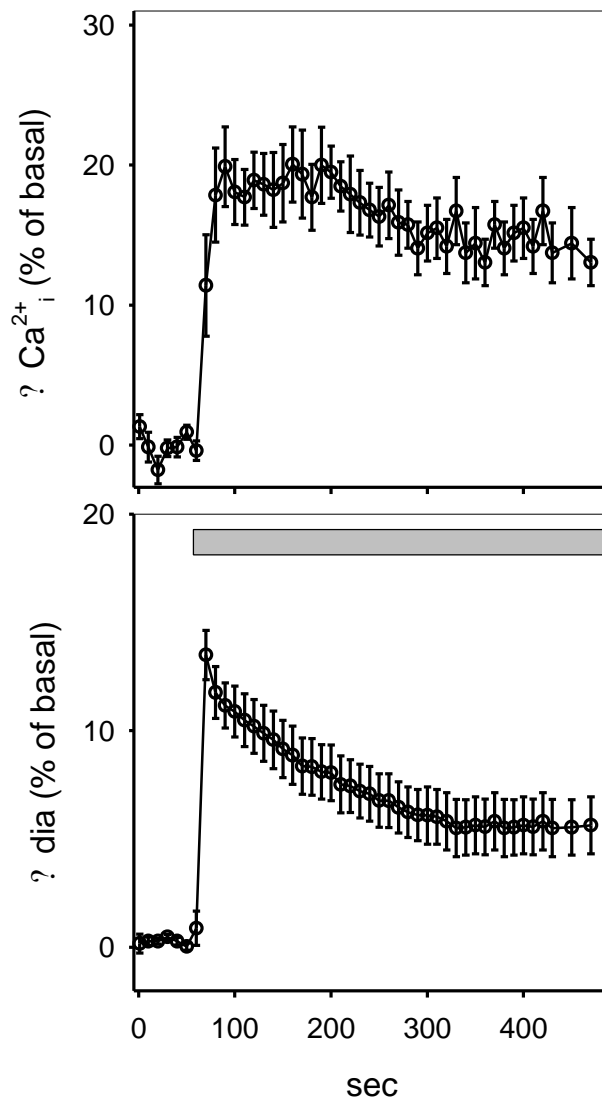


Abb. 02b: Grafische Auswertung druckinduzierter myogener Vasokonstriktionen in GFP-transfizierten Widerstandsgefäßen. Der obere Graph zeigt die druckinduzierten Änderungen der Ca^{2+} -Ratio, der untere die Änderungen des Gefäßdurchmessers (angegeben als prozentuale Änderung des basalen Gefäßdurchmessers, R_{basal} : 1.13 ± 0.09 , dia_{basal} , $196 \pm 11 \mu\text{m}$, $n = 9$). Der graue Balken markiert einen 7minütigen Zeitabschnitt der Druckerhöhung von 45 mmHg auf 110 mmHg. (dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM in Intervallen von 10 sec)

Die Amplitude und der zeitliche Verlauf der myogenen Antwort in GFP-transfizierten Widerstandsgefäßen, wie er in der obigen Abbildung dargestellt ist, entspricht den in frisch isolierten oder kultivierten Gefäßen nachweisbaren myogenen Antworten.

4.2.2 Effekte einer Überexpression einer dominant negativen Mutante des RhoA bzw. der Rhokinase auf die myogene Antwort

Um zu überprüfen, ob der RhoA/Rhokinase-Signalweg in den untersuchten Widerstandsgefäßen eine Rolle spielt, wurden diese mit dominant negativen Mutanten von RhoA (N19RhoA) oder der Rhokinase (KD1A) transfiziert, bevor durch Erhöhung des transmuralen Drucks eine myogene Antwort induziert wurde.

Sowohl in den mit N19RhoA, als auch in den mit KD1A transfizierten Widerstandsgefäßen war die myogene Antwort nach initialer Dehnung (N19RhoA: $237 \pm 5 \mu\text{m}$ auf $256 \pm 4 \mu\text{m}$, entsprechend $19 \pm 2 \mu\text{m}$; KD1A: $241 \pm 14 \mu\text{m}$ auf $258 \pm 13 \mu\text{m}$, entsprechend $18 \pm 4 \mu\text{m}$, $n = 6$) gegenüber den GFP-transfizierten Kontrollen signifikant reduziert ($2 \pm 11\%$ bzw. $4 \pm 5\%$ RID, je $n = 6$). Diese in transfizierten Widerstandsgefäßen erhobenen Befunde konnten in Gefäßen bestätigt werden, die mit dem chemischen Rhokinaseinhibitor Y27632 inkubiert wurden ($1 \mu\text{mol/L}$, 10 min) und in denen die myogene Antwort ebenfalls signifikant reduziert war ($1 \pm 2\%$ RID, $n = 6$).

Parallel zu den Durchmesseränderungen wurden die Änderungen der glattmuskulären Ca^{2+} -Konzentrationen gemessen und untersucht, ob Hemmungen des RhoA bzw. der Rhokinase diese druckinduzierten Änderungen des intrazellulären Ca^{2+} beeinflussten. Verglichen wurden die druckinduzierten Ca^{2+} -Anstiege nach 7 min. Diese betragen in mit GFP transfizierten Gefäßen $20 \pm 3\%$ ($R_{\text{basal}} = 1.08 \pm 0.1$)

In den mit N19RhoA ($R_{\text{basal}} = 1.06 \pm .097$) und KD1A ($R_{\text{basal}} = 0.97 \pm 0.03$) transfizierten bzw. mit $1 \mu\text{mol/L}$ Y27632 vorbehandelten Gefäßen ($R_{\text{basal}} = 1.02 \pm 0.05$) war der Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration mit $16 \pm 3\%$, $17 \pm 2\%$ bzw. $19 \pm 3\%$ nicht signifikant verschieden von dem in der GFP-transfizierten Kontrollgruppe.

4.2.3 Druckinduzierte myogene Vasokonstriktionen in Sphk1- oder hSK-G82D-transfizierten Widerstandsgefäßen

In dieser Versuchsreihe wurden die Effekte einer veränderten Expression der Sphk1 auf die myogene Antwort untersucht.

Hierzu wurden die Widerstandsgefäße entweder mit Sphk1 oder mit der dominant negativen Mutante hSK-G82D transfiziert und anschließend mit einem Drucksprung von 45 mmHg auf 110 mmHg stimuliert. Die Ergebnisse wurden mit den myogenen Antworten in GFP-transfizierten Gefäßen ($59 \pm 9\%$ RID) 7 min nach dem Drucksprung verglichen.

Sphk1-transfizierte Widerstandsgefäße zeigten eine signifikant verstärkte myogene Vasokonstriktion, die die druckinduzierte Aufdehnung (von $185 \pm 8 \mu\text{m}$ auf $213 \pm 9 \mu\text{m}$, entsprechend $28 \pm 7 \mu\text{m}$) nicht nur vollständig wieder aufhob, sondern signifikant darüber hinaus ging ($154 \pm 14\%$ RID, $p < 0.05$, $n = 12$).

Im Gegensatz dazu zeigten Widerstandsgefäße, die mit der dominant negativen Mutante hSK-G82D transfiziert worden waren (druckinduzierte Aufdehnung von $243 \pm 3 \mu\text{m}$ auf $260 \pm 3 \mu\text{m}$, entsprechend $16 \pm 1 \mu\text{m}$, $p < 0.05$ vs Aufdehnung_{Sphk1}, $n = 16$), nur noch residuale myogene Antworten ($15 \pm 5\%$ RID, $p < 0.05$, $n = 16$), die signifikant schwächer als die in GFP-transfizierten Gefäßen gemessenen waren.

4.2.4 Druckinduzierte myogene Vasokonstriktionen in Widerstandsgefäßen, die Sphk1 und N19RhoA koexprimieren

In diesen Widerstandsgefäßen wurden die Sphk1 und die dominant negative RhoA-Mutante N19RhoA koexprimiert, um zu klären, ob eine Hemmung des RhoA-Signalweges die Effekte der Sphk1 auf die myogene Antwort (s.o.) beeinflussen

würde. Dies wäre ein Hinweis darauf, dass auch die Effekte der Sphk1 auf die myogene Antwort durch RhoA vermittelt wären.

Es zeigte sich, dass die gleichzeitige Hemmung von RhoA in Sphk1-überexprimierenden Gefäßen (druckinduzierte Aufdehnung von $240 \pm 7 \mu\text{m}$ auf $254 \pm 10 \mu\text{m}$, entsprechend $14 \pm 3 \mu\text{m}$, $p < 0.05$ vs Aufdehnung_{Sphk1}, $n = 8$) die myogene Antwort vollständig aufhob ($1 \pm 14\%$ RID, $p < 0.05$, $n = 8$).

4.2.5 Druckinduzierte myogene Vasokonstriktionen in Widerstandsgefäßen, die Sphk1 und KD1A koexprimieren

In Analogie zu dem unter 4.2.4 beschriebenen Versuchsansatz wurde in diesen Widerstandsgefäßen die Sphk1 zusammen mit der dominant negativen Rhokinasemutante KD1A exprimiert. Ziel war es, die mögliche Funktion und Rolle der Rhokinase als Hauptzielprotein des RhoA innerhalb des Signalweges distal der Sphk1 zu untersuchen.

Auch in diesen Sphk1- und KD1A-koexprimierenden Widerstandsgefäßen (Sphk1 + KD1A; druckinduzierte Aufdehnung von $229 \pm 3 \mu\text{m}$ auf $246 \pm 4 \mu\text{m}$, entsprechend $16 \pm 3 \mu\text{m}$, $p < 0.05$ vs Aufdehnung_{Sphk1}, $n = 16$) war die myogene Antwort gegenüber der in GFP- und Sphk1-transfizierten Gefäßen mit $9 \pm 4\%$ RID ($p < 0.05$, $n = 8$) signifikant reduziert.

4.2.6 Druckinduzierte myogene Vasokonstriktionen in Widerstandsgefäßen, die die dominant aktive RhoA-Mutante L63RhoA exprimieren

Ziel dieser Versuchsreihe war es, den putativen Signalweg distal der Sphk1 mit der dominant aktiven RhoA-Mutante L63RhoA zu aktivieren und den Effekt auf die myogene Antwort mit dem nach Transfektion mit der Sphk1 zu vergleichen.

Die Expression von L63RhoA führte zu einer signifikanten Verstärkung der myogenen Antwort (initiale Aufdehnung von 175 ± 12 auf $203 \pm 13 \mu\text{m}$, entsprechend $28 \pm 7 \mu\text{m}$; $92 \pm 12\%$ RID, $p < 0.05$, $n = 8$) gegenüber der GFP-Kontrolle. Diese Verstärkung war allerdings signifikant schwächer als in den mit Sphk1 transfizierten Widerstandsgefäßen ($154 \pm 14\%$ RID).

4.2.7 Noradrenalin- und depolarisationsabhängige Vasokonstriktionen in Widerstandsgefäßen

Um zu überprüfen, ob die Transfektion der verschiedenen Mutanten per se die Vasokonstriktion in diesen Widerstandsgefäßen beeinflusste, wurden die durch $0.3 \mu\text{mol/L}$ Noradrenalin oder die durch 120 mmol/L K^+ ausgelösten Vasokonstriktionen in genetisch veränderten Widerstandsgefäßen miteinander verglichen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Tabelle 01 zusammengefasst.

Mutante	Durchmesser _{max} in μm	Noradrenalin (% des dia_{max})	K^+ (% des dia_{max})
GFP	218 ± 7	51 ± 3	43 ± 3
Sphk1	230 ± 6	51 ± 2	46 ± 2
hSk-G82D	247 ± 5	$27 \pm 6^*$	
L63RhoA	223 ± 8	53 ± 1	42 ± 5
N19RhoA	234 ± 5		45 ± 3
Sphk1 + N19RhoA	242 ± 9	51 ± 2	
Sphk1 + KD1A	239 ± 8	38 ± 10	

Noradrenalin-induzierte Vasokonstriktionen waren in den untersuchten, genetisch veränderten Widerstandsgefäßen nicht signifikant verschieden voneinander, wobei die hSK-G82D-überexprimierenden Gefäße, die eine signifikante Reduktion des

noradrenalininduzierten Tonus zeigten (27,6%, $n = 16$, $P < 0.05$), eine Ausnahme bildeten.

Die Tonuserhöhungen nach Depolarisation durch 120 mmol/L K^+ waren in den untersuchten Gruppen nicht statistisch signifikant verschieden voneinander.

4.2.8 Grafische Zusammenfassung der verschiedenen unter 4.2 aufgeführten genetischen Manipulationen auf die druckinduzierte myogene Vasokonstriktion in Widerstandsgefäßen

Die unter 4.2.3 bis 4.2.6 dargelegten Befunde zur Beeinflussung der myogenen Antwort durch die Expression unterschiedlicher Mutanten der Proteine des Sphk1/RhoA/Rhokinase-Signalweges sind in der folgenden Abbildung (Abb. 03) grafisch zusammengefasst.

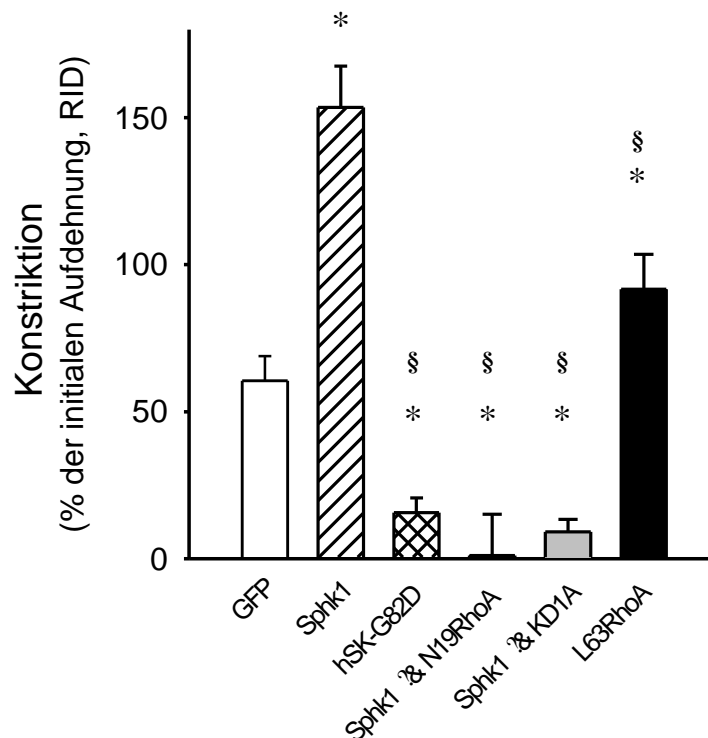


Abb. 03: Darstellung der druckinduzierten myogenen Vasokonstriktionen in Gefäßen, die mit GFP, Sphingosinkinase (Sphk1), der dominant negativen Mutante der Sphingosinkinase (hSk-G82D), der dominant aktiven RhoA-Mutante L63Rho oder mit Sphk1 in Kombination mit entweder der dominant negativen Mutante des RhoA (N19RhoA) oder der Rhokinase (KD1A) transfiziert wurden. (dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der steady state-Antworten nach 7 min. * entspricht $p < 0.05$ im Vergleich aller Gruppen mit der GFP-transfizierten Kontrolle; § entspricht $p < 0.05$ im Vergleich mit Sphk1).

4.2.9 Vergleich der druckinduzierten Ca^{2+} -Anstiege in GFP-, Sphk1-, hSK-G82D- und L63RhoA-transfizierten Widerstandsgefäßen

Der direkte Vergleich der myogenen Antworten in Sphk1- und L63RhoA-transfizierten Widerstandsgefäßen zeigte, dass die Sphk1-überexprimierenden Widerstandsgefäße signifikant stärkere myogene Vasokonstriktionen zeigten als die, in denen RhoA konstitutiv aktiv war (L63RhoA).

Dies war ein Hinweis darauf, dass die Sphk1 einen zweiten Signalweg aktiviert, der ebenfalls zum Entstehen der myogenen Antwort beiträgt.

Wir verglichen deshalb die Ca^{2+} -Anstiege in Kontrollgefäßen (GFP), in Sphk1-, hSk-G82D- und L63RhoA-transfizierten Gefäßen, um festzustellen, ob Unterschiede im druckinduzierten Ca^{2+} -Signal in der Lage wären, die unterschiedlichen Amplituden der myogenen Antworten zu erklären.

Die initialen druckinduzierten Ca^{2+} -Anstiege waren in den mit Sphk1 transfizierten Widerstandsgefäßen signifikant höher als in den mit GFP transfizierten Kontrollgefäßen ($34 \pm 3\%$ versus $20 \pm 3\%$, $p < 0.05$) aber auch signifikant höher als in L63RhoA-transfizierten Widerstandsgefäßen ($22 \pm 3\%$, $p < 0.05$). Passend zu einer vermuteten wesentlichen Rolle der Sphk1 für den initialen druckinduzierten Ca^{2+} -Anstieg waren die Ca^{2+} -Anstiege in hSK-G82D-transfizierten Widerstandsgefäßen signifikant abgeschwächt und verlangsamt ($9 \pm 1\%$).

Bereits 4 min nach Erhöhung des transmuralen Drucks waren die Ca^{2+} -Anstiege in den verschiedenen Gruppen allerdings nicht mehr signifikant voneinander verschieden (GFP: $17 \pm 2\%$, Sphk1: $19 \pm 2\%$, hSk-G82D: $17 \pm 3\%$ und L63RhoA: 19 ± 3 , vgl. auch Abb. 04).

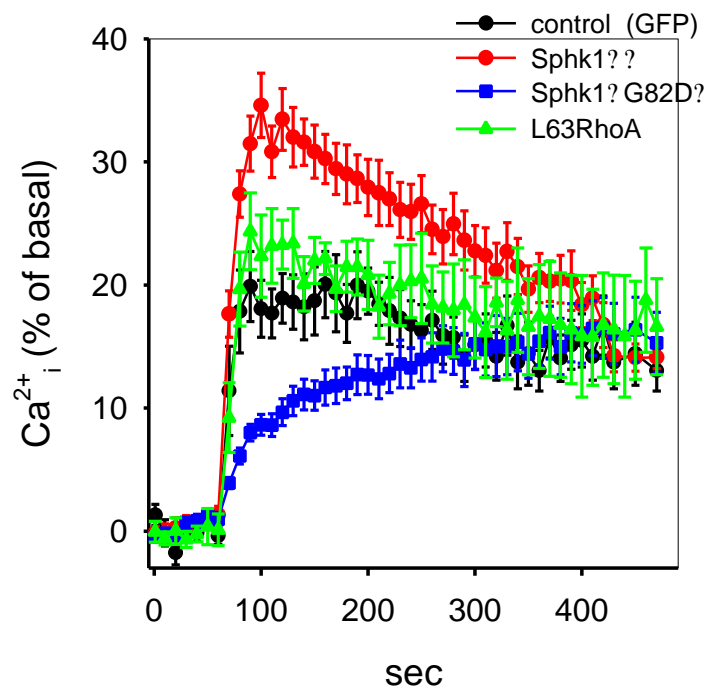


Abb. 04: Darstellung der druckinduzierten Ca^{2+} -Anstiege in Gefäßen, die mit GFP, der Sphingosinkinase (Sphk1), der dominant negativen Mutante der Sphingosinkinase hSk-G82D oder der dominant aktiven RhoA-Mutante L63RhoA transfiziert wurden (dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, Die Werte aller Einzelkurven wurden in 10-Sekunden-Intervallen gemittelt.).

4.3 Erhöhung des Basaltonus in Sphk1-transfizierten Widerstandsgefäßen durch repetitive Auslösung myogener Antworten

Die direkte Messung der Sphk1-Aktivität oder der intramuralen S1P-Spiegel war aufgrund der zu geringen Gewebemengen, die sich aus den isolierten Widerstandsgefäßen gewinnen ließen, nicht möglich.

Unter der Hypothese, dass endogen, durch die Sphk1 produziertes, S1P verzögert abgebaut wird, sollte es sich nach mehrfacher, kurz aufeinander folgender Stimulation der Widerstandsgefäße durch repetitive Erhöhung des transmuralen Druckes in der Wand anreichern. Erhöhungen der S1P-Konzentration sollten dann in einer Erhöhung des Basaltonus dieser Gefäße resultieren.

In 6 Gefäßen wurde 3mal über 5 min der transmurale Druck von 45 mmHg auf 110 mmHg erhöht, was in allen Gefäßen eine „Sphk1-typische“ myogene Antwort auslöste. Die Druckerhöhungen waren durch 20-minütige Ruhephasen unterbrochen.

Abb. 05 zeigt, dass dieses Vorgehen tatsächlich den Basaltonus mit zunehmender Zykluszahl signifikant erhöhte.

Wiederholte Auslösungen myogener Antworten entsprechend dem o.g. Protokoll in nichttransfizierten Widerstandsgefäßen führten zu keiner Zunahme des Basaltonus.

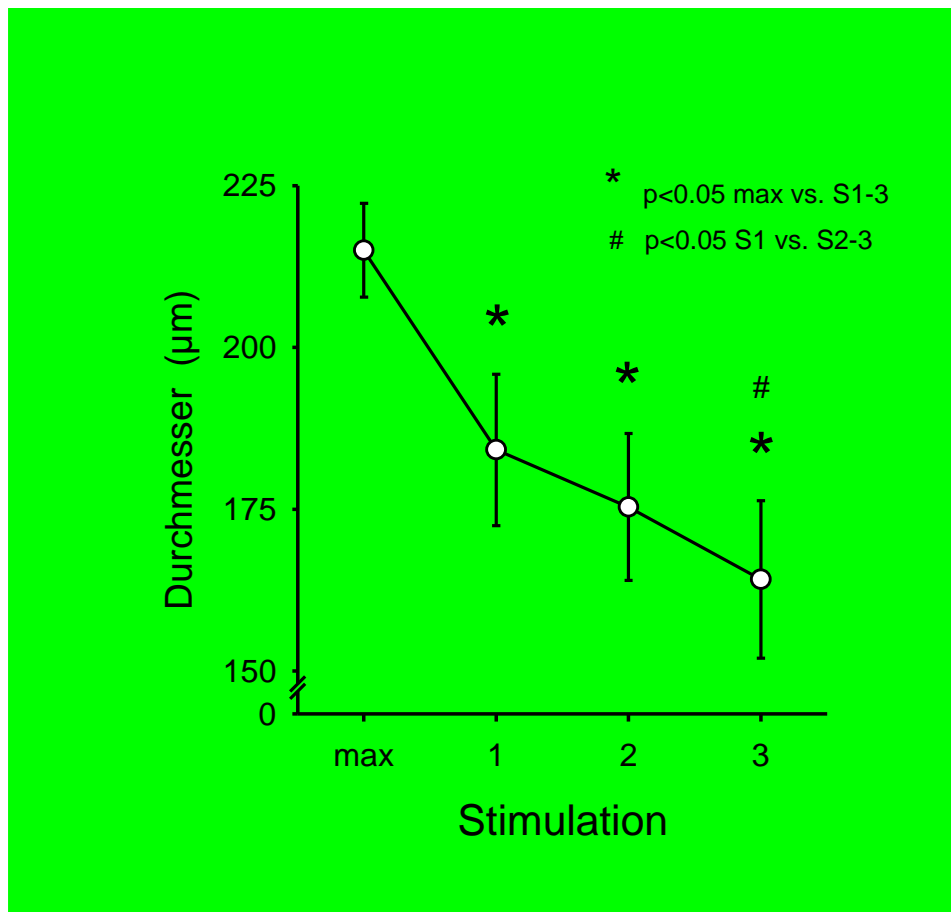


Abb.05: Signifikanter **Anstieg des Basaltonus** nach repetitiver Stimulation von Sphk1-transfizierten Gefäßen durch Drucksprünge von 45 mmHg auf 110 mmHg. (dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM des Basaltonus der Gefäße, * $p < 0.05$ gegen max, # $p < 0.05$ s_1 vs s_3).

4.4 Einfluss des Ruhetonus auf die Amplitude der folgenden myogenen Antwort

Die vorgestellten Ergebnisse belegen signifikant stärkere myogene Antworten in Sphk1- (initiale Aufdehnung $27 \pm 5 \mu\text{m}$) als in GFP (initiale Aufdehnung $24 \pm 2 \mu\text{m}$) - überexprimierenden Widerstandsgefäßen. Zugleich war jedoch in Sphk1- überexprimierenden Arterien der Ruhetonus gegenüber dem in GFP-transfizierenden Gefäßen signifikant erhöht. so dass überprüft werden musste, ob diese beiden Größen tatsächlich unabhängig voneinander waren.

Hierzu wurden GFP-transfizierte Gefäße mit Noradrenalin um $25 \pm 2\%$ des dia_{max} vorkontrahiert ($n = 5$) und Sphk1-transfizierte Gefäße mit ACh dilatiert bis sie einen Ruhetonus von $3 \pm 1\%$ des dia_{max} aufwiesen ($n = 5$), bevor die myogene Antwort induziert wurde (initiale Aufdehnung GFP_{kontrahiert}: $27 \pm 4 \mu\text{m}$; Sphk1_{dilatiert}: $25 \pm 3 \mu\text{m}$). In der Abb. 06 sind zusätzlich die myogenen Antworten in L63RhoA- überexprimierenden Widerstandsgefäßen dargestellt (initiale Aufdehnung $28 \pm 7 \mu\text{m}$). Keine der Manipulationen des Ruhetonus in GFP- bzw. Sphk1-transfizierten Widerstandsgefäßen beeinflusste das Ausmaß der sich anschließenden myogenen Antwort (Abb. 06).

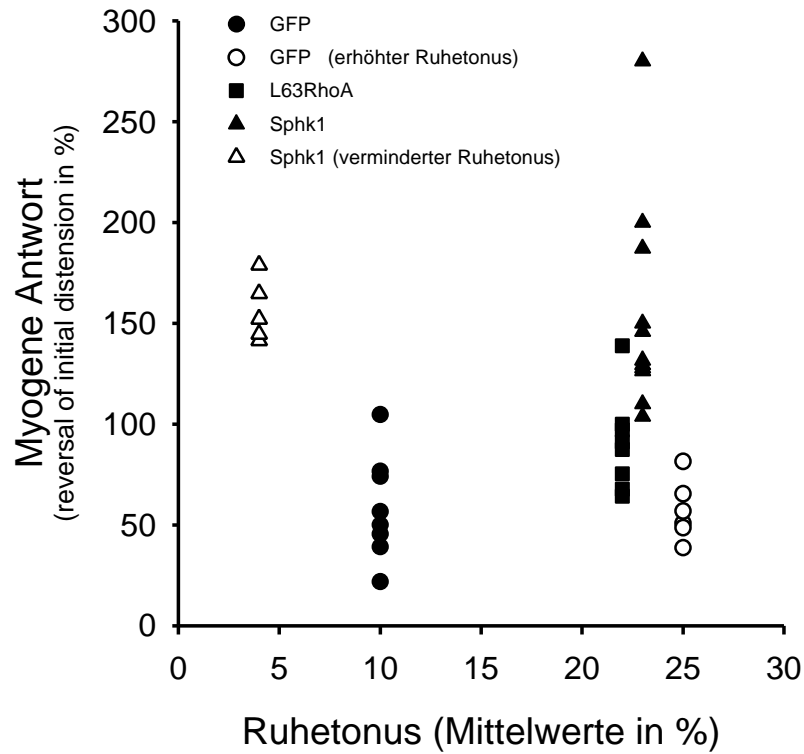


Abb. 06: Amplituden der myogenen Antworten in Abhängigkeit des zugeordneten Ruhetonus in GFP- (Tonus vor Auslösung der MR: 10±1%), noradrenalinvorkontrahierten GFP- (Tonus vor Auslösung der MR: 25±2%), Sphk1- (Tonus vor Auslösung der MR: 23±3%), ACh-dilatierten Sphk1- (Tonus vor Auslösung der MR: 3±1%) und L63RhoA- (Tonus vor Auslösung der MR: 22±2%) transfizierten Widerstandsgefäßen.

4.5. Effekte exogenen Sphingosin-1-phosphats auf den Tonus isolierter Widerstandsgefäße

Zunächst wurde untersucht, ob der Lipidmediator S1P vasokonstriktorische Eigenschaften in isolierten Skelettmuskelwiderstandsgefäßen hat. Die Frage, ob mögliche vasokonstriktorische Wirkungen von S1P durch RhoA/Rhokinase vermittelt waren, haben wir in Widerstandsgefäßen durch Inkubation mit dem bakteriellen RhoA-Inhibitor C3 (Aktories & Hall, 1989) bzw. dem Rhokinasehemmer Y27632 (Narumiya *et al.*, 2000) untersucht. Zusätzlich zu diesen „klassischen“ Hemmern wurden die Widerstandsgefäße mit der dominant negativen RhoA-Mutante N19RhoA (Qiu *et al.*, 1995) bzw. mit der dominant negativen Rhokinase-Mutante KD1A (Itoh *et al.*, 1999) transfiziert, um danach die Effekte exogenen S1Ps zu untersuchen.

Die isolierten Widerstandsgefäße wurden entweder für 19h mit dem RhoA-Inhibitor C3-Transferase in Kombination mit einem Transfektionsreagenz (Trans LT, n = 7) oder mit dem chemischen Rhokinase-Inhibitor Y27632 (1 µmol/L, n = 7) inkubiert. Die so vorbehandelten Gefäße wurden anschließend mit exogenem S1P stimuliert. Als Kontrollgruppe dienten Widerstandsgefäße, die mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) transfiziert wurden und an denen S1P (0.001, 0.01, 0.1 und 1.0 µmol/L) dosisabhängig Konstriktionen induzierte (0.2 ± 0.4, 7.7 ± 2.4, 27.0 ± 3.4, 45.0 ± 2.0 %, n = 8), die nach Auswaschen des S1Ps komplett reversibel waren (Originalregistrierung s. Abb. 07).

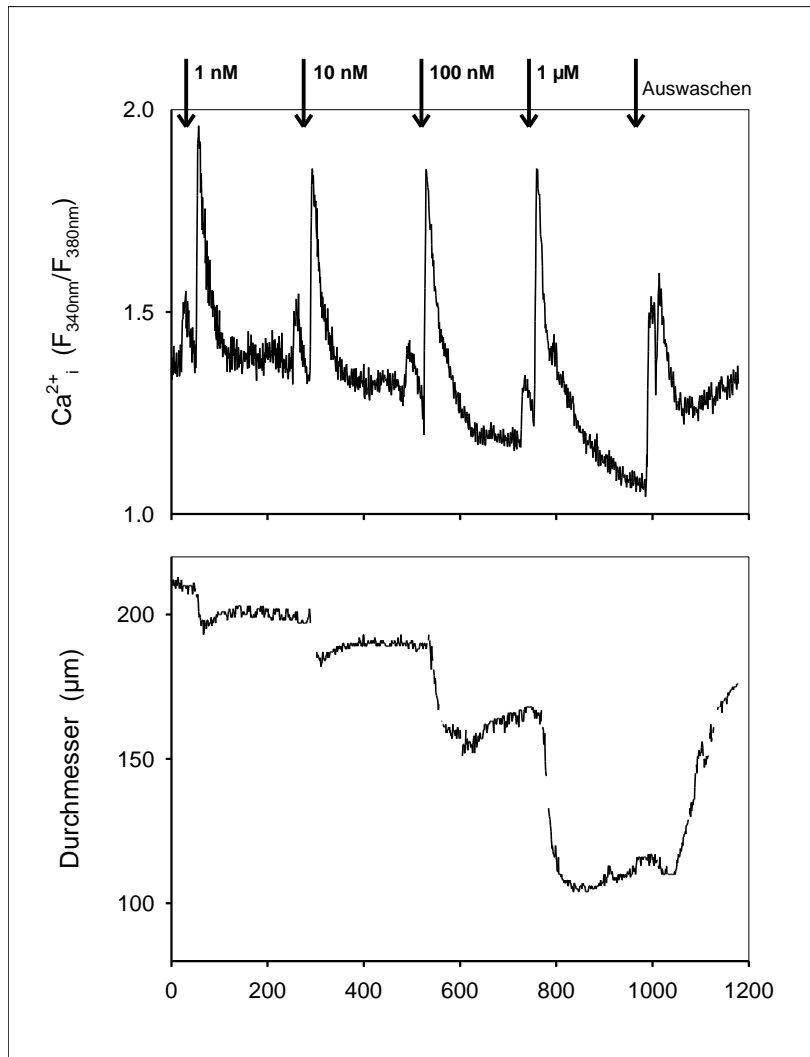


Abb. 07: **Originalregistrierung** S1P-induzierter Vasokonstriktionen in isolierten Widerstandsgefäßen. Die Zeitpunkte der Zugabe des S1P sind durch Pfeile markiert.

Vorbehandlung mit dem Rhokinaseinhibitor Y27632 (Narumiya *et al.*, 2000) reduzierte die S1P-induzierten Konstriktionen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant ($p < 0.05$, Tab. 02)

Eine ähnliche, ebenfalls signifikante Reduktion der S1P-Antworten, wie nach Verwendung des Rhokinaseinhibitors (Y27632), war in Widerstandsgefäßen feststellbar, die mit dem RhoA-Inhibitor C3 transfiziert worden waren ($p < 0.05$, Tab. 02).

Noradrenalininduzierte Vasokonstriktionen in Kontroll- (49 ± 3%, n = 8), Y27632- (46 ± 5%, n = 7) und C3- (50 ± 4%, n = 7) behandelten Widerstandsgefäßen waren nicht signifikant voneinander verschieden.

Die Tabelle 02 fasst die Ergebnisse der Hemmexperimente zusammen.

S1P µmol/L	Kontrolle % von dia _{max}	Y27632 % von dia _{max}	C3-Transferase % von dia _{max}
0.001	0.2 ± 0.4	0.1 ± 0.4	0.7 ± 0.3
0.01	7.7 ± 2.4	0.4 ± 0.2 *	0.5 ± 0.6 *
0.1	27.0 ± 3.4	3.4 ± 1.8 *	2.8 ± 0.7 *
1	45.0 ± 2.0	20.0 ± 7.2 *	18.1 ± 2.9 *

Tab 02: Effekte einer RhoA- (C3-Transferase, n = 7) oder Rhokinase- (Y27632, n = 7) Hemmung auf den jeweils durch S1P-induzierten Tonus.
(aufgeführt sind die Mittelwerte ± SEM des Steady State nach 3 min Stimulation mit S1P, * p < 0.05 Y27632 bzw. C3-Transferase gegen Kontrolle)

4.6 Nachweis des S1PR₂ in der Hamsterlunge mittels RT-PCR

Die durch extrazelluläres S1P induzierten zellulären Effekte werden über eine spezifische Rezeptorgruppe (S1PR_{1,2,3,4,5}) vermittelt. Da die in dieser Arbeit beschriebenen Vasokonstriktionen isolierter Widerstandsgefäße RhoA-abhängig waren, haben uns auf den Nachweis des S1PR₂ konzentriert, für den RhoA-aktivierende Eigenschaften dokumentiert sind (s. auch Einleitung). Da wir zur Optimierung des PCR-Verfahrens große Mengen des zu isolierenden Materials benötigten, haben wir versucht, den S1PR₂-Rezeptor in der Lunge des Hamsters nachzuweisen (Ikeda *et al.*, 2003), was in 5 von 5 Versuchen reproduzierbar gelungen ist (siehe Abb. 08).

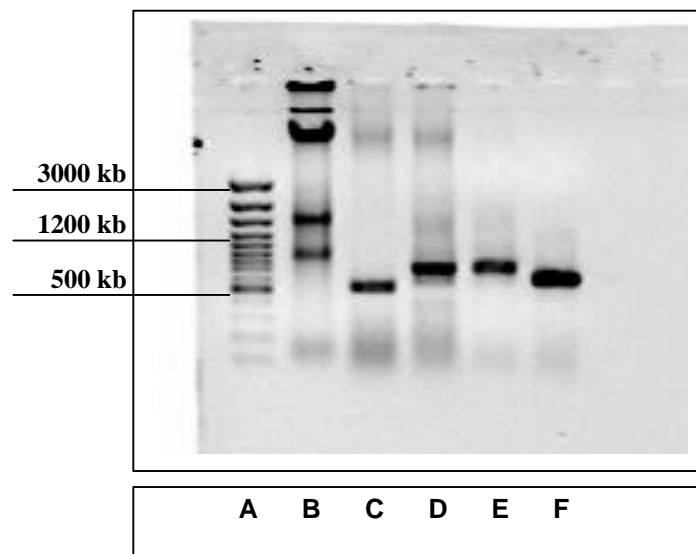


Abb. 08: Nachweis des S1PR₂ in Lungengewebe des Hamsters. Elektrophorese ethidiumbromidgefärbter DNA-Fragmente in einem 1%igen Agarosegel. Die den Bahnen zugeordneten Großbuchstaben entsprechen **A:** Marker (100bp), **B:** RNA aus der Hamsterlunge, **C:** S1PR₂, **D:** GAPDH, **E:** GAPDH 1:10 verdünnt, **F:** HUVEC DNA.

4.7. Nachweis des S1PR₂ in Widerstandsgefäßen mittels RT-PCR

Nachdem die Expression des S1PR₂- Rezeptors in der Hamsterlunge gezeigt werden konnte, galt es zu überprüfen, ob dieser Rezeptorsubtyp auch in Widerstandsgefäßen exprimiert ist. Da es sich um so kleine Mengen isolierten Gewebes handelte, haben wir, alternativ zum klassischen Extraktionsverfahren, das Säulensystem RNeasy Protect Mini Kit² der Firma Qiagen (siehe Material und Methoden) zur RNA-Isolierung benutzt. In dieser Versuchsreihe konnte der Rezeptor in 5 von 10 Versuchen nachgewiesen werden.

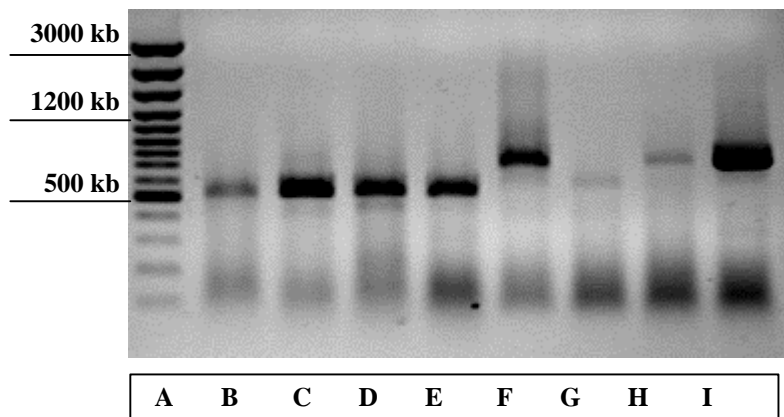


Abb. 09: In dem oben gezeigten 1%igen Agarosegel entsprechen für die unter den einzelnen Spuren angegebenen Großbuchstaben **A:** dem Marker (100bp), **B:** S1PR₂ RNA Widerstandsgefäß, **C:** S1PR₂ RNA Nabelschnur, Qiagen-KIT-Isolation, **D:** S1PR₂ RNA Nabelschnur, TRizol-Isolation, **E:** S1PR₂-RNA Hamsterzellen, **F:** GAPDH RNA Widerstandsgefäß, **G:** GAPDH RNA Nabelschnur, Qiagen-KIT-Isolation, **H:** GAPDH RNA Nabelschnur, TRizol-Isolation, **I:** GAPDH RNA Zellen aus der Aorta des Hamsters. S1PR₂ RNA aus Widerstandsgefäßen konnte bei konstantem Nachweis des „Housekeeping“-Gens GAPDH in 10 Versuchen 5mal nachgewiesen werden.

4.8 Effekte von S1PR₂-Sense und S1PR₂-Antisenseoligonukleotiden auf die durch exogenes S1P induzierten Änderungen des Tonus isolierter Widerstandsgefäße

Nach dem Nachweis der Expression von S1PR₂ in den Widerstandsgefäße mittels RT-PCR wurden die Gefäße mit Antisenseoligonukleotiden gegen den S1PR₂ transfiziert (Sequenzen s. Methodenabschnitt). Als Kontrolle dienten Widerstandsgefäße, die mit einem Senseoligonukleotid transfiziert wurden. Die Cy5-markierten Oligonukleotide wurden mittels konfokaler Mikroskopie in der Gefäßwand nachgewiesen. Noradrenalin (0.3 µmol/L)-induzierte Vasokonstriktionen waren in sense- und antisensebehandelten Gefäßen nicht signifikant unterschiedlich (NA_{Sense}: 29 ± 3 %; NA_{Antisense}: 28 ± 12 %). Die so behandelten Gefäße wurden mit ansteigenden Konzentrationen von S1P (0.3 nmol/L – 30 µmol/L) stimuliert, die dosisabhängigen Zunahmen des Tonus sind für beide Gruppen in Tabelle 03 zusammengefasst.

S1P in µmol/L	S1PR ₂ -Sense % des dia _{max}	S1PR ₂ -As % des dia _{max}
basal	5.0 ± 2.7	0.4 ± 0.3 *
0.0003	7.7 ± 2.9	1.7 ± 0.5 *
0.003	10.1 ± 3.0	2.0 ± 0.3 *
0.03	17.5 ± 3.1	8.4 ± 1.3 *
0.3	31.6 ± 3.5	20.5 ± 2.0 *
3.0	29.8 ± 4.3	17.9 ± 1.4 *

Tab. 03: Vergleich des durch S1P induzierten Tonus in Sense- und Antisenseoligonukleotid-behandelten Widerstandsgefäßen. (dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM des Steady State nach 3 min Stimulation mit S1P, * p < 0.05 für S1PR₂-Sense vs. S1PR₂-As)

Die durch S1P in den mit S1PR₂-Sense bzw. -Antisenseoligonukleotiden transfizierten Widerstandsgefäßen induzierten Änderungen des glattmuskulären Ca²⁺-Spiegels, bestimmt nach 3min Stimulation mit S1P, sind in der Tabelle 04 zusammengefasst.

S1P in $\mu\text{mol/L}$	S1PR₂-Sense Anstieg der Ca ²⁺ - Ratio in %	S1PR₂-AS Anstieg der Ca ²⁺ - Ratio in %
basal	-2.5 ? 1.7	0.7 ? 1.1
0.0003	-5.2 ? 1.5 *	2.2 ? 1.0
0.003	-5.4 ? 2.6 *	4.6 ? 1.2 #
0.03	-5.5 ? 2.7 *	8.1 ? 1.8 #
0.3	-6.3 ? 2.2 * #	8.4 ? 2.1 #
3.0	-4.7 ? *3.5	6.2 ? 0.8 #

Tab. 04: Vergleich der durch S1P induzierten Anstiege der Ca²⁺-Ratio in Sense- und Antisenseoligonukleotid-behandelten Widerstandsgefäßen. (dargestellt sind die Mittelwerte ? SEM des Steady State nach 3 min Stimulation mit S1P, * p < 0.05 S1PR₂-Sense vs S1PR₂-AS; # p < 0.05 dosisabhängige Änderungen der Ca²⁺-Ratio)

5. Diskussion

5.1 Diskussion der erhobenen Befunde

Die myogene Vasokonstriktion, die für die Autoregulation von Blutgefäßen wichtig ist, und damit mittelbare Effekte auf den peripheren Widerstand und folglich den systemischen Blutdruck hat, basiert auf der intrinsischen Eigenschaft glatter Muskelzellen, auf Dehnung ohne weitere äußere Stimulation mit einer anhaltenden Kontraktion zu reagieren (Johnson, 1980). Durch die myogene Autoregulation soll ein konstanter Blutfluss durch das Gewebe, unabhängig von der Höhe des systemischen Blutdrucks, so weit wie möglich garantiert werden. Umgekehrt hat die myogene Vasokonstriktion direkte Auswirkungen auf den systemischen Blutdruck und wirkt bei Anstiegen desselben als Verstärkermechanismus. 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.*, 1989b).

Bei dem bereits 1919 durch Bayliss (Bayliss, 1919) beschriebenen Phänomen der myogenen Antwort ist noch nicht abschließend geklärt, über welche zellulären Mechanismen die druckinduzierte myogene Kontraktion aufrecht erhalten wird, obwohl durch eben diese Konstriktion der initiale Stimulus, die Dehnung, kontinuierlich reduziert wird (Hill *et al.*, 2001).

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die Aktivierung des RhoA-Signalweges zur Auslösung und Erhaltung der myogenen Antwort in Widerstandsgefäßen beiträgt. Es konnte gezeigt werden, dass die Effekte von Änderungen der RhoA/Rhokinase-Expression oder -Aktivität auf die myogene Antwort unabhängig von gleichzeitigen Änderungen des intrazellulären Calciums waren, da die

druckinduzierten Calciumanstiege von jeglicher Manipulation des RhoA/Rhokinase-Signalweges unbeeinflusst blieben.

Jedoch weist die Tatsache, dass Calciumanstiege und die darauf folgenden Konstriktionen durch den L-Typ Calciumkanalblocker Felodipin in diesen Gefäßen vollständig aufgehoben werden konnten (de Wit *et al.*, 1998), darauf hin, dass der druckinduzierte transmembranäre Einstrom extrazellulären Calciums für die Auslösung der myogenen Antwort notwendig ist.

Es ist immer noch unklar, wie die Mechanismen, die die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöhen und diejenigen, die den kontraktilen Apparat für Calcium sensitivieren, koordiniert werden können, damit die glatten Muskelzellen auf einen Druckanstieg reagieren.

Eigene Vorbefunde, die für den Sphingolipidmediator Sphingosin-1-Phosphat (S1P) potente, weitgehend Ca^{2+} -unabhängige, vasokonstriktorische Effekte in Widerstandsgefäßen gezeigt hatten, ließen uns vermuten, dass S1P ein endogener, RhoA-modulierender Stimulus sein könnte. Zudem sind für S1P beispielsweise RhoA-abhängige migrationsfördernde Effekte an pulmonalen glatten Muskelzellen gezeigt worden (Auge *et al.*, 1999). S1P entsteht durch Phosphorylierung von Sphingosin durch das Enzym Sphingosinkinase (Sphk1) (Olivera *et al.*, 1998; Levade *et al.*, 2001). Die membranständige Sphk1 gibt S1P nicht nur in den Extrazellulärraum ab, wo es durch Bindung an spezifische Rezeptoren (S1PR₁₋₅, frühere Nomenklatur EDG_{1,3,5,6,8}) autokrin auf die Zelle zurück oder parakrin auf Nachbarzellen wirken kann, sondern auch in das Cytosol, wo es als second messenger IP₃-unabhängig intrazellulär Ca^{2+} freisetzt (Meyer zu Heringdorf D. *et al.*, 1999; Meyer zu Heringdorf D. *et al.*, 1998).

Transfektion des S1P-generierenden Enzyms Sphk1, dessen Überexpression in verschiedenen Zellmodellen in einer erhöhten S1P-Produktion resultierte (Kohama *et al.*, 1998; Pitson *et al.*, 2000a)), verstärkte die myogene Antwort in

Widerstandsgefäßen signifikant. Die verstärkten myogenen Antworten in mit Sphk1 transfizierten Gefäßen wurden, im Vergleich zu den mit GFP transfizierten Kontrollgefäßen, von signifikant höheren, druckinduzierten zytosolischen Calciumanstiegen begleitet. Die genetische Hemmung der Sphk1 durch die Mutante hSk-G82D, für die bereits gezeigt werden konnte, dass ihre Überexpression die zellulären S1P-Spiegel signifikant senkt (Pitson *et al.*, 2000b), reduzierte diesen Ca^{2+} -Anstieg hingegen signifikant. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Sphk1 auch unter physiologischen Bedingungen einen modulierenden Effekt auf den initialen zytosolischen Calciumanstieg hat. Allerdings waren nach 4 min die Calciumspiegel in den glatten Muskelzellen aller Gruppen nicht mehr signifikant voneinander verschieden. Dennoch war die myogene Antwort nach 4 min in Sphk1-überexprimierenden Gefäßen stärker ausgeprägt als in GFP-transfizierten Widerstandsgefäßen. In beiden wiederum war die myogene Antwort stärker als in den dominant negative Mutante der Sphk1 überexprimierenden Gefäßen. Dies legt nahe, dass, trotz eines Effekts auf den frühen Calciumanstieg, ein zweiter, calciumsensitivierender Mechanismus zur gesamten Antwort beiträgt, und dass dieser Mechanismus in Sphk1 exprimierenden Gefäßen stärker ausgeprägt ist, als in GFP-transfizierten Gefäßen und in hSK-G82D-transfizierten Gefäßen inaktiv ist.

Sphk1-überexprimierende Gefäße, in denen gleichzeitig die dominant negative Mutante von RhoA, N19RhoA, koexprimiert wurde, zeigten eine deutlich verringerte myogene Antwort. Dies weist darauf hin, dass die Sphk1-abhängige, S1P-vermittelte Aktivierung des RhoA-Signalweges ein integraler Bestandteil der myogenen Antwort ist.

Andererseits resultierte die Aktivierung des RhoA-Signalweges alleine, wie an mit der aktiven Mutante von RhoA, L63RhoA, transfizierten Gefäßen gezeigt, in einer myogenen Antwort, die, obwohl größer als in mit GFP transfizierten Gefäßen, deutlich

schwächer als die der mit Sphk1 transfizierten Gefäße war. Dies war ein wesentlicher Unterschied verglichen mit den Befunden bzgl. des Ruhetonus, in denen die Sphk1 und L63RhoA überexprimierende Widerstandsgefäße einen annähernd identischen Anstieg des Tonus zeigten, was wahrscheinlich auf eine Calciumsensitivierung des kontraktilen Apparates zurückzuführen ist. Mit Sphk1 transfizierte und durch Erhöhung des transmuralen Drucks stimulierte Gefäße zeigten eine deutlich stärkere Aktivierung des RhoA-Signalweges und einen verstärkten Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration von glatten Muskelzellen, was sich beides in einer verstärkten Konstriktion widerspiegelte. Diese Befunde deuten darauf hin, dass eine Erhöhung des transmuralen Drucks zu einer Verstärkung der endogenen S1P-Produktion führt. Der zugrunde liegende Mechanismus ist dabei noch unklar. Interessanterweise beeinflusste die Überexpression der Sphk1 auch schnelle Antworten der Zelle, wie z.B. den initialen Ca^{2+} -Anstieg, so dass die Sphk1 unter Umständen direkt auf Veränderungen des transmuralen Drucks hin ihre Konformation ändert, was zu einer verstärkten Bildung von endogenem S1P führen könnte und so die myogene Antwort auslöst. Diese Hypothese zur Erklärung der hier vorgestellten Befunde ist auch deshalb interessant, weil gezeigt werden konnte, dass selbst der Austausch nur einer einzigen Aminosäure in der Gesamtsequenz des Proteins in einer deutlichen Erhöhung der Aktivität der Sphk1 resultiert (Pitson *et al.*, 2001). Weitere Untersuchungen der räumlichen Struktur des membranständigen Proteins bei unterschiedlichen Dehnungszuständen der Zellen werden notwendig sein, um diese reizvolle Hypothese einer molekularen Schalterfunktion der Sphk1 zu überprüfen.

Als alternativer Mechanismus könnte die dehnungsinduzierte Öffnung von „stretch-activated channels“ (SAC (Hill *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 2002)) und der darauf folgende Kationeneinstrom zu einer Depolarisation führen, was nach jüngeren Befunden der Gruppe von Meyer zu Heringdorf ebenfalls zu einem Anstieg der Sphk1-Aktivität führt

(Alemany *et al.*, 2001). Somit wäre durch Druckerhöhung und folgende Öffnung der stretch-activated channels (SACs) und L-Type-Ca²⁺-Kanäle ausgelöste intrazelluläre Ca²⁺-Anstieg nicht primär eine Folge der vermehrten S1P-Produktion, würde durch diese jedoch, wie in dieser Arbeit gezeigt, signifikant verstärkt. Zusätzlich ist die mit ihrer Aktivierung einhergehende Translokation der Sphk1 (Rosenfeldt *et al.*, 2001; Ancellin *et al.*, 2002) selbst calciumabhängig (Young *et al.*, 2003), was zu unserem früheren Befund paßt, dass Vorinkubation der Widerstandsgefäße mit dem L-Typ-Ca²⁺-Kanalblocker Felodipin die myogene Antwort komplett aufhebt (de Wit *et al.*, 1998).

Die vorliegende Arbeit verbindet diese beiden unabhängigen Befunde eines druckinduzierten Ca²⁺-Anstiegs und einer Aktivierung des calciumsensitivierenden RhoA-Signalweges zu einem Konzept, in dem eine depolarisationsabhängige Produktion von S1P durch die Sphk1 den Anstieg des intrazellulären Ca²⁺ und die Aktivierung des RhoA-Signalweges in räumlich und zeitlich exakter Form miteinander kombiniert und damit letztendlich zur Auslösung und Unterhaltung der myogenen Vasokonstriktion führt.

Zur Untermauerung der zentralen These einer druckinduzierten erhöhten S1P-Produktion durch die Sphk1 wäre eine direkte Messung eben dieser S1P-Produktion und/oder der Sphk1-Aktivität wünschenswert. Beide Messverfahren sind allerdings aufgrund der kleinen Gewebsmenge eines isolierten Widerstandsgefäßes nicht anwendbar. Alternativ hierzu konnten wir jedoch belegen, dass wiederholte Anstiege des transmuralen Drucks über 5 min kontinuierlich den Ruhetonus der Widerstandsgefäße erhöhten und die myogene Antwort verstärkten. Dieser Effekt lässt sich als eine intramurale Anhäufung von S1P interpretieren, welches mit jeder Druckerhöhung produziert wurde, und kann, wenn auch nur als indirekter, Hinweis auf eine gesteigerte endogene S1P-Produktion dienen.

Die genetische Hemmung der Sphk1 mittels ihrer dominant negativen Mutante (Pitson *et al.*, 2000b) resultierte in einem signifikant schwächeren und verzögertem Calciumanstieg, sowie einer nur noch schwachen myogenen Vasokonstriktion.

Obwohl alle Sphk- und RhoA/Rhokinase-Mutanten den Grundtonus beeinflussen, waren diese Veränderungen im Widerspruch zu früheren Studien (Liu *et al.*, 1994) für das Ausmaß der myogenen Antwort irrelevant. Dies wurde mittels pharmakologischer Anpassung des initialen Tonus in den unterschiedlichen Gruppen gezeigt. Dabei zeigten GFP-transfizierte Widerstandsgefäße, deren „Ruhetonus“ mit Noradrenalin soweit erhöht wurde, dass er dem in Sphk1-transfizierten Widerstandsgefäßen entsprach, myogene Antworten, die von denen in nicht vorkontrahierten GFP-transfizierten Arterien nicht signifikant verschieden waren. Gleiches galt für Sphk1-überexprimierende Widerstandsgefäße, die vor Erhöhung des transmuralen Drucks auf ein Niveau dilatiert worden waren, das dem Ruhetonus in GFP-transfizierten Gefäßen entsprach. Nicht nur der Basaltonus vor Auslösung der myogenen Antwort ist ein mögliches Kriterium für die Größe der Amplitude dieser Antwort sondern auch das Ausmaß der durch den Drucksprung von 45 mmHg auf 110 mmHg induzierten Dehnung der Gefäße. Ein Vergleich des Ausmaßes dieser Vordehnung zeigte, dass sie weder durch Vorkontraktion (GFP-transfizierte Gefäße) noch durch Dilatation (ACh) signifikant beeinflusst wurde.

Des weiteren könnte die genetische Modulation der RhoA/Rhokinase zu Veränderungen des Zytoskeletts führen (Halayko & Solway, 2001), was wiederum die myogene Antwort beeinflussen könnte. Dies war jedoch in unseren Versuchen nicht der Fall, da die Transfektionen der verschiedenen Mutanten weder den druckinduzierten Calciumanstieg, der innerhalb der Signalsequenz vor der myogenen Konstriktion liegt (Hill & Meininger, 1994) und ein intaktes Zytoskelett voraussetzt (D'Angelo *et al.*, 1997b), noch die kontraktile Antworten auf Noradrenalin- und K^+ , die

in den Gefäßen, die GFP, Sphk1 oder RhoA-Mutanten überexprimieren, beeinflussten. Die genetische Hemmung der Sphk1 durch die hSK-G82D reduzierte allerdings den Noradrenalin-induzierten Tonus, was möglicherweise ein Anzeichen für eine wichtige Rolle des funktionalen Enzyms für die Zellhomöostase und die Erhaltung der strukturellen und funktionellen Integrität der Zelle ist. In diesen hSK-G82D-transfizierten Gefäßen war bei niedrigerem Basaltonus auch die druckinduzierte Vordehnung signifikant schwächer, als in der GFP-überexprimierenden Kontrollgruppe, was zu den zuvor beschriebenen Befunden paßt. Gegen eine wesentliche Bedeutung dieser geringeren Vordehnung für das Ausmaß der anschließenden myogenen Antwort in diesen Gefäßen sprechen zwei hier bereits aufgeführte Befunde. Erstens weisen unsere Befunde in vorkontrahierten GFP- bzw. vordilatierten Sphk1-transfizierten Gefäßen darauf hin, dass die Vordehnung unter unseren Versuchsbedingungen im Gegensatz zu den Befunden von Liu et al. (Liu et al., 1994) keine Rolle für das Ausmaß der myogenen Antwort zu spielen scheint und zweitens sind die residualen myogenen Antworten in der hSK-G82D-Gruppe wiederum signifikant stärker als in den N19RhoA- und KD1A-überexprimierenden Widerstandsgefäßen, deren Vordehnungen nicht verschieden von denen in hSK-G82D-überexprimierenden Gefäßen sind. Hier ist ein möglicher Grund, dass gemäß unseres Modells die Wirkweise der Sphk1 auf den RhoA-Signalweg dieser in hSK-G82D-transfizierten Gefäßen zwar vermindert aktiv, aber, im Gegensatz zu den N19RhoA- bzw. KD1A-transfizierten Gefäßen, nicht komplett gehemmt ist und somit noch residuale myogene Antworten erlaubt.

Es muss zudem an dieser Stelle diskutiert werden, warum die Vasokonstriktionen nach Gabe der strikt calciumabhängigen Stimuli Noradrenalin und K^+ in Sphk1-überexprimierenden Widerstandsgefäßen, die wahrscheinlich mit einer erhöhten Aktivität des RhoA/Rhokinase-Signalweges einher gehen, nicht signifikant verschieden

von denen in GFP-transfizierten Arterien waren. Dazu passend hat unsere Arbeitsgruppe in einer früheren Arbeit zeigen können, dass auch die gleichzeitige Stimulation der Widerstandsgefäße mit exogenem S1P Ca^{2+} -induzierte Vasokonstriktionen in dauerdepolarisierten Arterien (120 mmol/L K^+) nur für mittlere Ca^{2+} -Konzentrationen signifikant verstärkte (Bolz *et al.*, 2003b). In der betreffenden Studie konnte gezeigt werden, dass in den untersuchten Widerstandsarterien die basale Aktivierung des RhoA-Signalweges vermutlich sehr hoch war, da die Inkubation mit C3-Transferase die Dosiswirkungskurve für Ca^{2+} -induzierte Vasokonstriktionen in dauerdepolarisierten Arterien signifikant nach rechts verschob. Eine hohe basale RhoA-Aktivität würde jedoch eine nur geringe Myosinleichtkettenphosphatasenaktivität bedeuten, welche bei entsprechend starker Aktivierung der MLCK funktionell nicht relevant wäre. Somit würde auch eine zusätzliche Aktivierung des RhoA-Signalweges, z.B. durch Sphk1 oder L63RhoA, bei Stimulation der Widerstandsgefäße mit 120 mmol/L K^+ bzw. einer submaximalen Noradrenalinosis funktionell nicht signifikant in Erscheinung treten.

Die Verstärkung der myogenen Antworten unter den o.g. Umständen ist im Gegensatz zu den globalen Stimulationen der Zellen mit Noradrenalin oder K^+ möglicherweise das Ergebnis einer zeitlich und räumlich exakt koordinierten Aktivierungen des Ca^{2+} - und des RhoA-abhängigen Signalweges. Es ist beispielsweise bekannt, dass verschiedene Proteine, die diese Signalwege konstituieren, im Zuge ihrer Aktivierung (RhoA, Sphk1) bzw. Inaktivierung (MLCP) an die Plasmamembran translozieren. Ob diese Komponenten dort, z.B. an den Caveolae in räumlicher Nähe zum sER (intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher) und den beteiligten S1PRs (Igarashi & Michel, 2000), funktionelle Cluster bilden, ist bisher noch nicht bekannt. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Hypothese, dass eine derartige subzelluläre Kompartimentierung der Signalwege die auf den ersten Blick widersprüchlichen

Effekte bedingt, zu verifizieren. Allerdings wäre auch in diesem noch hypothetischen Falle die Sphk1 mit ihrer „Anbindung“ an den RhoA- und Ca^{2+} -Signalweg ein möglicher Kandidat, um die Effekte der verschiedenen Proteine des Clusters sinnvoll zu integrieren.

Unspezifische Effekte des verwendeten Transfektionsmittels Effectene⁷ wurden in einer früheren Arbeit unserer Gruppe ausgeschlossen, indem wir zeigen konnten, dass die Transfektion eines nicht-replizierenden Plasmids mit Effectene⁷ und die kontinuierliche Präsenz dieser Substanzen im Kulturmedium die vaskuläre Reaktivität über 27 Stunden nicht beeinträchtigte (Bolz & Pohl, 2003; Bolz *et al.*, 2003b).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass der Ruhetonus und die myogenen Antworten in Widerstandsgefäßen durch die Veränderung der Expression der Sphk1 moduliert werden und durch dominant negative Mutanten des RhoA/Rhokinase-Signalweges vollkommen gehemmt werden.

Wir leiten daraus die Hypothese ab, dass die Sphk1 ein entscheidender Faktor für den mikrovaskulären Tonus und ein Hauptkandidat für die Steuerung der zwei Hauptkomponenten der myogenen Antwort ist. Die Sphk1 scheint ein integraler Bestandteil des Signalweges zu sein, der mechanische Kräfte, welche auf die Zellen der Gefäßwand wirken, in intrazelluläre Signale überführt. Sie könnte somit in all den Zellen von Bedeutung sein, die mechanische Stimuli in spezifische biochemische Signale überführen müssen. Der vorgeschlagene Mechanismus einer gesteigerten, druckinduzierten S1P-Produktion mit verzögertem Abbau bietet zudem eine mögliche Erklärung für die Frage, wie die myogene Konstriktion aufrecht erhalten werden kann, obwohl die Konstriktion der Arterie an sich den sie auslösenden Dehnungsreiz kontinuierlich reduziert.

In einem weiteren Teil der Arbeit untersuchten wir, über welche S1P-Rezeptoren (S1PR₁₋₅) die vasokonstringierenden Wirkungen des S1P in den untersuchten Widerstandsgefäßen des Hamsters vermittelt werden. Wie ausgeführt, waren die beobachteten Vasokonstriktionen abhängig von einer Aktivierung des RhoA/Rhokinase-Signalweges und einem intrazellulären Anstieg von Ca²⁺. Nach früheren Untersuchungen (Takuwa *et al.*, 2001; Siehler *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2000) kommen für diese Wirkungen vornehmlich der S1PR₂ und/oder der S1PR₃ in Betracht, die im Unterschied zu S1PR₁ prinzipiell über G_{12/13} RhoA aktivieren können (s. Abb. 10).

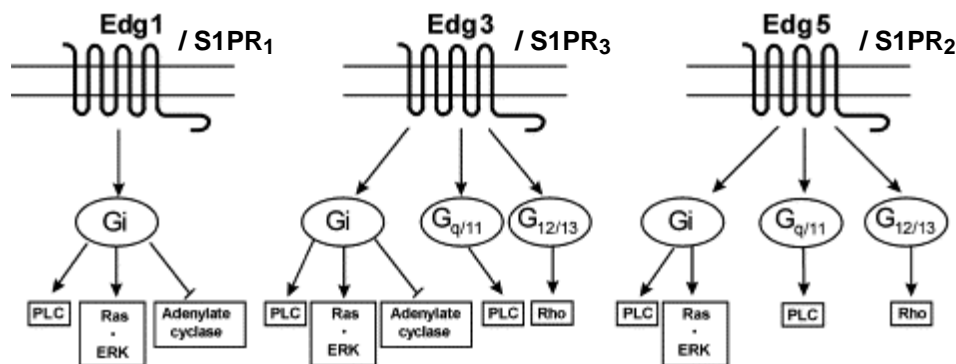


Abb. 10: In der oben gezeigten Abbildung (modifiziert nach Takuwa *et al.*, 2001) zeigt die intrazellulären Signalanbindungen der Rezeptoren S1PR₁ (ehemals Edg1), S1PR₃ (ehemals Edg3) und S1PR₂ (ehemals Edg5)

Zunächst wurde mit der RT-PCR überprüft, welche der S1PR_{1,2,3} in den Widerstandsgefäßen des Hamsters exprimiert werden. Da das Genom des Hamsters nicht vollständig entschlüsselt ist und die benötigten Sequenzen für die S1PRs des Hamsters nicht vorlagen, haben wir versucht, mit menschlichen oder Rattenprimern S1PR_{1,2} oder ₃ -RNA in den Widerstandsgefäßen nachzuweisen. Dabei zeigten sich unter ansonsten gleichen Bedingungen bei Verwendung menschlicher Primer für den S1PR₂ deutlich schärfere Banden als bei Verwendung von Primern, die auf die Sequenzen der Ratten-S1PRs optimiert waren. Allerdings waren diese Ergebnisse

schlecht reproduzierbar, d. h. nur bei zwei von sieben Versuchen ließen sich Transkripte nachweisen. Wahrscheinlich spielte hier die geringe Gewebemenge, die sich aus Widerstandsgefäßen gewinnen lässt, und aus der sehr geringe RNA-Mengen resultieren, eine wichtige Rolle. RT-PCRs mit aus der Hamsterlunge gewonnenen RNA ergaben in 5 von 5 Versuchen reproduzierbare Ergebnisse. Als Konsequenz haben wir die klassischen RNA-Isolationsmethoden durch eine kommerziell erhältlichen Isolierungskit (RNeasy Protect Mini Kit/QIAshredder, Qiagen) der Firma Qiagen[?] ersetzt (Bonham & Danielpour, 1996). Dieser Kit zur Isolierung extrem geringer RNA-Mengen aus Gewebe macht die Schritte des klassischen Isolationsverfahrens mit organischen Lösungsmitteln überflüssig. Als untere Nachweisgrenze für RNA werden dabei 100 Zellen garantiert. Die Ergebnisse zeigten eine deutlich bessere Ausbeute der zu isolierenden RNA, so dass das S1PR₂-Transkript dreimal hintereinander in Widerstandsgefäßen (3 von 3 Versuchen) mittels RT-PCR eindeutig nachgewiesen werden konnte.

Für S1PR₁ und S1PR₃ waren mit den gewählten Primern keine Transkripte nachweisbar. Zu geringe, aus Widerstandsgefäßen gewonnene, RNA-Mengen konnten als Grund für fehlende Ergebnisse für S1PR₁ und S1PR₃ ausgeschlossen werden, da auch mit ausreichend RNA, welche aus der Lunge des Hamsters gewonnen wurde, keine Transkripte nachgewiesen werden konnten. Wir konzentrierten das weitere Vorgehen deshalb auf den S1PR₂, da dieser sowohl über G_{12/13} RhoA, als auch über G_i und G_{q/11} die PhospholipaseC (PLC) aktivieren kann, d.h. prinzipiell zusätzlich zu einer RhoA-Aktivierung über PLC-Aktivierung auch intrazellulär Calcium freisetzen könnte (Takuwa *et al.*, 2001).

Um die Bedeutung des S1PR₂ für die Vasokonstriktion von Widerstandarterien näher zu analysieren, reduzierten wir die Expression dieses Rezeptorsubtyps gezielt mit Antisenseoligonukleotiden. Diese Methode ist in unserem Labor bereits erfolgreich zur

Identifikation der endothelialen Cytochrom P₄₅₀-Isoform angewendet worden, welche den endothelabhängigen hyperpolarisierenden Faktor synthetisiert (Bolz *et al.*, 2000a). Wenn der S1PR₂ wesentliche Funktionen für die S1P-induzierte Vasokonstriktion in diesen Widerstandsgefäßen haben sollte, müsste die Reduktion seiner Expression auch das Ausmaß der Konstriktion der Widerstandsgefäße reduzieren.

Antisenseoligonukleotide sind unmodifizierte oder chemisch modifizierte einzelstrangige DNA-Moleküle mit einer Länge von 13-25 Nucleotiden. Sie verhindern die Translation der mRNA, indem sie sich an diese binden und über die Aktivierung der RNase H die mRNA zerstören. Die Antisenseoligonukleotide bleiben unversehrt und können so an eine weitere mRNA binden, so dass sich der beschriebene Prozess wiederholen kann (siehe Abb. 11), (Tamm *et al.*, 2001). Die Sequenz der Antisenseoligonukleotide wurde so gewählt, dass sie homolog zu mRNA war, die aus dem Bereich transkribiert wurde, an dem die Primer gebunden haben.

Die Widerstandsgefäße wurden über 18h mit den Antisenseoligonukleotiden inkubiert bevor die S1P-induzierte Vasokonstriktion untersucht wurde. Als Kontrollgruppe für die antisensebehandelten Arterien dienten mit Senseoligonukleotiden behandelte Gefäße. Letztere sollten keine Reduktion der Vasokonstriktion zeigen, da die transfizierten DNA-Sequenzen nicht homolog zur Zielsequenz waren. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden die Oligonukleotide mit einem Fluoreszenzrest, Cy5, markiert, der sich konfokal in den glatten Muskelzellen nachweisen ließ. In den untersuchten Gefäßen fand sich eine homogene Verteilung der Cy5-gebundenen Fluoreszenz innerhalb der glatten Muskelzellen der Gefäßwand, die Transfektionseffizienz entsprach dabei der mit plasmidischer DNA erreichten (Bolz & Pohl, 2003; Bolz *et al.*, 2003b).

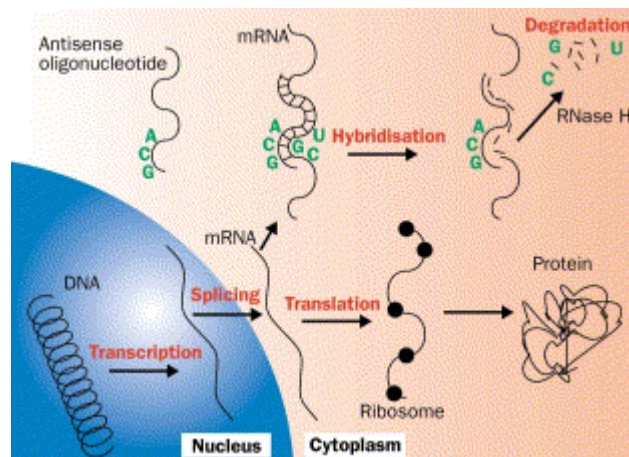


Abb. 11: Darstellung eines möglichen Mechanismus zur Reduktion einer spezifischen mRNA-Sequenz durch Antisenseoligonucleotide (Abbildung übernommen aus (Tamm *et al.*, 2001)).

In mit Antisenseoligonucleotiden behandelten Gefäßen mit reduzierter Expression des S1PR₂ waren die S1P-induzierten Konstriktionen v.a. für niedrige S1P-Konzentrationen aufgehoben, was dafür spricht, dass der S1PR₂ tatsächlich eine wichtige Rolle für die Vermittlung der S1P-Wirkung in diesen Widerstandsgefäßen spielt. Lediglich für die beiden höchsten Konzentrationen von S1P waren auch in der mit Antisense behandelten Gruppe noch Konstriktionen nachweisbar, die allerdings signifikant schwächer waren als in der mit Sense-behandelten Gruppe. Diese reduzierte Hemmung der Konstriktion bei sehr hohen S1P-Konzentrationen kann verschiedene Ursachen haben, die hier kurz dargelegt werden sollen.

Es ist möglich, dass die gewählte Dosis von 2,5 µg/ml S1PR₂-Antisenseoligonucleotiden zu gering war, um eine komplette Reduktion der S1PR₂-Expression und damit eine effektivere Hemmung der Vasokonstriktion zu gewährleisten. Wir haben deshalb in 3 Pilotversuchen die Dosis der Antisenseoligonucleotide auf 10 µg/ml erhöht, ohne dass sich dabei jedoch der hemmende Effekt verstärkt hätte.

Wir konnten des weiteren nicht ausschließen, dass zusätzlich zum S1PR₂ trotz fehlenden RT-PCR-Nachweises noch weitere S1PRs in den untersuchten Widerstandsgefäßen exprimiert sind, die Teile der vasokonstriktiven Wirkung des S1P auch nach Hemmung des S1PR₂ weiterhin vermitteln. Zur Diskussion dieses Punktes kann eine kürzlich publizierte Untersuchung von Salomone et al. (Salomone *et al.*, 2003) an Zerebralarterien der Ratte herangezogen werden, die ähnliche Ergebnisse wie unsere Untersuchungen unter Verwendung von S1PR₂-Antisenseoligonukleotiden zeigte. Allerdings war in den Zerebralgefäßen nicht der S1PR₂ sondern der S1PR₃ maßgeblich für die Vermittlung der S1P-induzierten Vasokonstriktion. Dieser Unterschied kann durch die verschiedenen untersuchten Spezies und Gefäßbetten bedingt sein. Zudem verfügen beide Rezeptoren über sehr ähnliche intrazelluläre Ankopplungen (Takuwa, 2002). Zusätzlich zur Behandlung mit Antisenseoligonukleotiden gegen S1PR₃ wurden die Gefäße in dieser Untersuchung mit Suramin, einem unspezifischen Hemmer aller S1PRs (Kimura *et al.*, 2000; Niedernberg *et al.*, 2002), behandelt. Die Abschwächung der S1P-induzierten Vasokonstriktionen in Suramin-behandelten Gefäßen zeigte ein Bild, welches unseren Ergebnissen nach Hemmung der S1PR₂-Expression entsprach. Während Suramin die Konstriktionen nach Gabe niedriger S1P-Konzentrationen vollständig hemmte, waren die Konstriktionen nach Gabe hoher S1P Konzentrationen lediglich abgeschwächt. Dies legt die Vermutung nahe, dass es für die vasokonstriktive Wirkung von S1P rezeptorunabhängige Wirkungen gibt, die v.a. bei Stimulationen mit hohen S1P-Dosen wirksam werden. Es wird in diesem Zusammenhang seit langem diskutiert, dass S1P, wenn es in hohen Dosen appliziert wird, die Plasmamembran der Zellen permeiert und rezeptorunabhängige, intrazelluläre Wirkungen entfaltet (Spiegel & Milstien, 2000). Dieser Mechanismus wäre in der Lage, unsere inkomplette Hemmung sowie die dargelegten Ergebnisse von Salomone et al. zu erklären.

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich, wie folgt, zusammenfassen (siehe auch Abb. 12):

1. Sphingosin-1-phosphat (S1P) ist ein potenter Vasokonstriktor in Widerstandsgefäßen des Skelettmuskels
2. Endogen durch die Sphingosinkinase (Sphk1) produziertes S1P kann sowohl den RhoA/Rhokinase-Signalweg aktivieren als auch den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel in den glatten Muskelzellen der Widerstandsgefäße erhöhen.
3. Basierend auf den unter 2. genannten Eigenschaften nimmt die Sphk1 eine wichtige Funktion bei der Regulation des mikrovaskulären basalen sowie des druckinduzierten, myogenen Tonus ein.
4. Ein wesentlicher Teil des vasokonstriktiven Effekts des S1P wird über den S1PR_2 vermittelt.

Die aufgeführten Effekte einer gesteigerten Sphk1-Expression und einer damit verbundenen erhöhten Produktion von S1P könnten sich im intakten Organismus in einer Erhöhung des peripheren Widerstandes und damit des systemischen Blutdrucks widerspiegeln.

Diese Hypothese macht aus dem Enzym Sphk1 einen potentiellen Kandidaten als Ursache für verschiedene Formen des genetisch bedingten Bluthochdrucks. Folglich könnte die pharmakologische Steuerung der Enzymaktivität ein vielversprechendes Werkzeug für eine neue Behandlung von Bluthochdruck und den damit verbundenen Krankheiten darstellen.

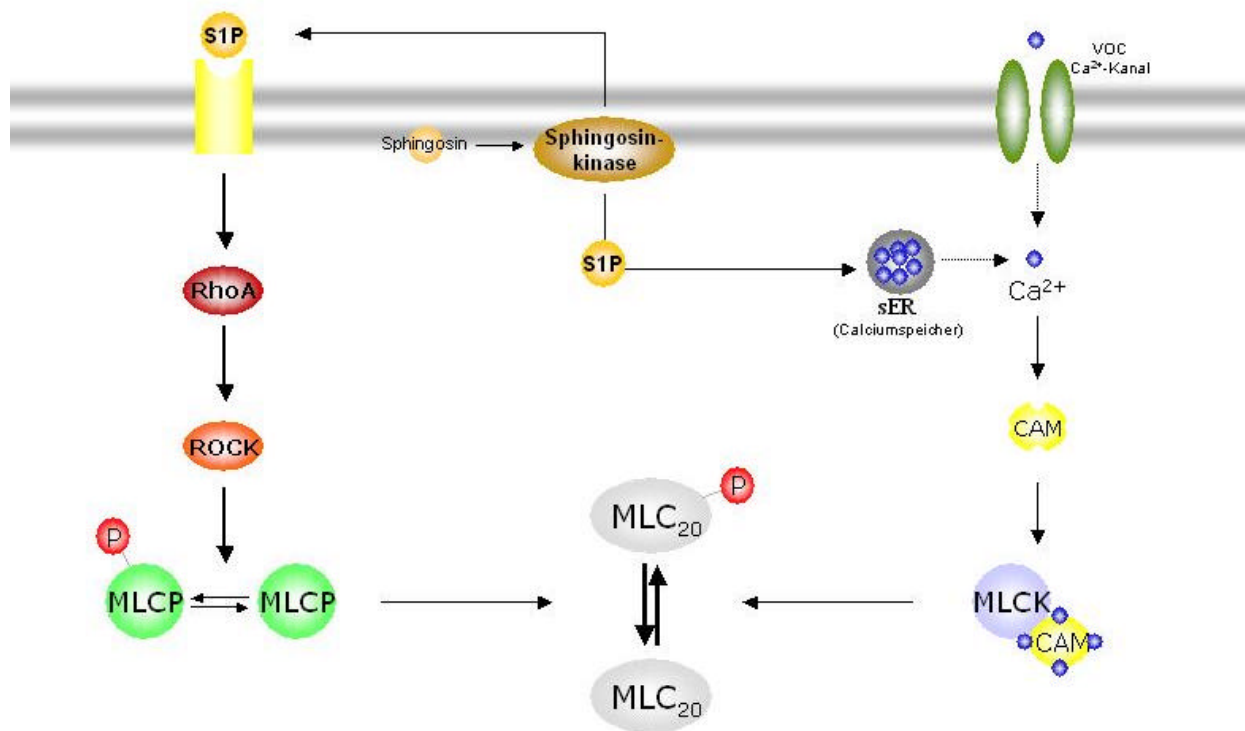


Abb. 12: **Grafische Zusammenfassung** der diskutierten durch Sphingosin-1-Phosphat (S1P) induzierten Kontraktionswege in glatten Muskelzellen. (Abkürzungen wie folgt: CAM = Calmodulin, MLCP = Myosinleichtkettenphosphatase. MLCK = Myosinleichtkettenkinase, MLC₂₀ = leichte Kette des Myosins (20 KD), ROCK = Rhokinase, S1P = Sphingosin-1-Phosphat, sER = glattes endoplasmatisches Retikulum, VOC = engl.: voltage operated Ca²⁺ channel, dtsh.: spannungsgesteuerter Ca²⁺-Kanal).

5.2. Methodenkritik

Die in dieser Arbeit vorgestellten Befunde sind am Modell eines isolierten Widerstandsgefäßes des Hamsters erhoben worden. Dabei folgt die Wahl dieses Versuchsmodells der Erkenntnis, dass diese Gefäße im distalen Teil des Gefäßbaumes den peripheren Widerstand mit regulieren (Joyner *et al.*, 1981) und, dass sich die tonusregulierenden Mechanismen in diesen kleinen Arterien signifikant von denen in bisher vorrangig untersuchten, großen Leitungsgefäßen unterscheiden (Nagao & Vanhoutte, 1993; Nagao *et al.*, 1992; Tang & Joyner, 1992; Tang *et al.*, 1995). Zudem basieren die vorgestellten Ergebnisse auf Weiterentwicklungen des experimentellen Modells des isolierten Widerstandsgefäßes aus dem *M. gracilis* des Hamsters, die zunächst validiert werden mussten.

In den folgenden Absätzen soll zunächst das experimentelle Modell an sich in Relation zu anderen Versuchsmodellen diskutiert werden, um dann die methodischen Erweiterungen kritisch zu würdigen und weiterhin bestehende Einschränkungen zu benennen.

Das Modell des isolierten Widerstandsgefäßes stellt 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. Letzteres kann im Sinne einer Reduktion von Komplexität (Newton) zur Darstellung eines Sachverhaltes von Vorteil sein und bewusst genutzt werden, ist aber auch als Einschränkung hinsichtlich der Tragweite der Interpretation der gewonnenen Daten stets zu beachten. Somit sind Extrapolationen auf die Relevanz eines Befundes im Gesamtorganismus stets als, wenn auch durchaus zulässige, Spekulationen zu

kennzeichnen, die in einem sich anschließenden Schritt im intakten Tier und später im Menschen bestätigt werden muss.

Ein Vergleich der Wertigkeiten von Befunden, die an einem aus dem *M. gracilis* des Hamsters isolierten Skelettmuskelwiderstandsgefäß erhoben wurden und denen, die im intakten Hamster gewonnen wurden, ist sehr schwierig. In unserer eigenen Arbeitsgruppe haben wir Befunde über die Wirkungen und die Bedeutung der endothelialen Faktoren Stickstoffmonoxid (NO), Prostacyclin (PGI_2) und dem endothelabhängigen hyperpolarisierenden Faktor (EDHF) aus dem isolierten Widerstandsgefäß des *M. gracilis* mit *in vivo* Daten aus dem *M. cremaster* verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass im isolierten System weder endogenes, endotheliales noch exogen zugegebenes Prostacyclin (PGI_2) Dilatationen induzierte (Bolz *et al.*, 1999; Bolz *et al.*, 2000a)), was Befunden am *M. cremaster* des intakten narkotisierten Hamsters widersprach, in denen acetylcholininduzierte, NO- und PGI_2 -vermittelte Dilatationen nachgewiesen worden waren (de Wit *et al.*, 1994). Der direkte Vergleich wird jedoch auch hier durch den Umstand erschwert, dass es sich hier zwar um dieselbe Spezies handelte, die untersuchten Gefäßbetten sich jedoch deutlich voneinander unterschieden. In einer weiteren Arbeit unserer Gruppe wurde dann der Einfluss der Narkose auf die Synthese und Wirkung der endothelialen Vasodilatoren systematisch untersucht, weil bekannt war, dass Isoformen des Cytochrom P450, die Kandidaten für die damals noch unbekannte EDHF-Synthase waren, durch das zur Narkose routinemäßig benutzte Pentobarbital gehemmt werden. Tatsächlich zeigte sich in Experimenten an der Rückenhautkammer des *wachen* Hamsters (de Wit *et al.*, 1999), dass ein wesentlicher Anteil der EDHF-Antwort unter *in vivo* Bedingungen tatsächlich durch Pentobarbital gehemmt wurde. Hieraus ließ sich die Hypothese ableiten, dass bisherige *in vivo* Untersuchungen die Bedeutung des EDHF eher fälschlich als zu gering dargestellt haben, während die Prominenz seiner Wirkung im

isolierten System weniger artefaktverzerrt war. Leider existieren aus versuchstechnischen Gründen keine *in vivo* Befunde für Widerstandsgefäße aus dem *M. gracilis* des Hamsters, welche einen detaillierten Vergleich der *in vivo* Ergebnisse mit denen im isolierten Modell zulassen würden.

In Relation zur Zellkultur waren Aussagemöglichkeiten über Vorgänge auf subzellulärer molekularer Ebene im ursprünglichen Modell des isolierten Widerstandsgefäßes, welches nur die Messung von Änderungen des Gefäßdurchmessers erlaubte, deutlich reduziert. Dies änderte sich zunächst signifikant dadurch, dass Fluoreszenzfarbstoffe wie z.B. das Fura 2 (Gryniewicz *et al.*, 1985) entwickelt wurden, die es ermöglichten, die Änderungen von Ionenkonzentrationen in Zellen sichtbar zu machen. Die Einführung dieser Technik für isolierte Widerstandsgefäße durch u.a. Meininger *et al.* (Meininger *et al.*, 1991) stellte einen wesentlichen Fortschritt und eine Erweiterung der Analysemöglichkeiten dar. Unsere eigene Arbeitsgruppe hat schließlich die Möglichkeiten des experimentellen Modells durch die Entwicklung eines Verfahrens erweitert, welches zunächst erlaubte, die Gefäße außerhalb des Körpers für mehr als zwei Tage funktionell und strukturell intakt zu halten (Bolz *et al.*, 2000c). Diese Technik und die sich anschließende Fähigkeit, die Zellen dieser Gefäße mit sehr hoher Effizienz genetisch zu verändern (Bolz & Pohl, 2003) sind eine wichtige Basis der in dieser Arbeit vorgestellten Befunde.

Die Kultivierung der Arterien wird in unserer Arbeitsgruppe mittlerweile routinemäßig betrieben. Nach Entnahme aus dem Muskel werden die Gefäße kanüliert und für die erforderliche Zeit mit einem optimierten Kulturmedium (s. Materialien) per- und superfundiert. Als wesentlicher Faktor für den Erfolg dieser Methode erwies sich dabei neben der Optimierung der Kulturmedien die komplett atraumatische Präparation des Gefäßes, d.h. die Vermeidung jeder mechanischen Irritation des Gewebes während

des Präparationsvorgangs (Dehnung, Verletzung des Muskelmantels mit der Pinzette, usw.). Nach Schädigungen der präparierten Gefäße, die zu einer Verfälschung der erhobenen Befunde geführt hätten und die sich auch bei behutsamem Vorgehen nicht gänzlich ausschließen ließen, wurde vor Versuchsbeginn in allen Gefäßen mit einem „Schnelltest“ zur funktionellen Integrität des Gefäßes gezielt gesucht. Hierzu wurde die Vasokonstriktion nach Gabe von Noradrenalin sowie die Acetylcholin-induzierte Vasodilatation überprüft. Nur nach diesem Test als „intakt“ befundene Gefäße wurden untersucht und in die folgenden Auswertungen aufgenommen. Derselbe Test wurde selbstverständlich in den Gefäßen durchgeführt, die mit Plasmiden transfiziert wurden, um unspezifische Effekte der im Vergleich zur Kulturmethode noch komplexeren Transfektionsmethode auszuschließen.

Die Transfektionseffizienz wurde in den untersuchten Gefäßen nur stichprobenartig mittels Immunfluoreszenz überprüft. Die eingesetzten Mutanten der untersuchten Proteine sind entweder mit dem molekularen Marker c-myc oder FLAG-markiert, welche immunogene Aminosäuresequenzen darstellen, die im nativen „Zellhintergrund“ nicht (FLAG) oder nur in sehr geringer Konzentration vorkommen (c-myc). Sowohl für das RhoA wie auch die Sphk1 haben wir jedoch zusätzlich GFP-Fusionsproteine transfiziert und so die hohe Transfektionseffizienz, die wir bereits mit reinem GFP dokumentiert hatten, auch für diese Proteine bestätigt (s. Abb. 13 (Bolz *et al.*, 2003b; Bolz *et al.*, 2003a)).

Ein weiteres, wenn auch weiches Kriterium war die funktionelle Plausibilität der Befunde im Hinblick auf den erwarteten Effekt der genetischen Manipulation. Interessanterweise waren die Unterschiede in der vaskulären Reaktivität der mit Mutanten des Sphk1/RhoA/Rhokinase-Signalweges transfizierten Widerstandsgefäße im Vergleich zur Kontrollgruppe hochsignifikant, die statistische Streuung in den jeweiligen Gruppen jedoch sehr gering. Diese hohe Stabilität der Effekte kann als

wahrscheinliche Folge einer konstant hohen Transfektionseffizienz interpretiert werden.

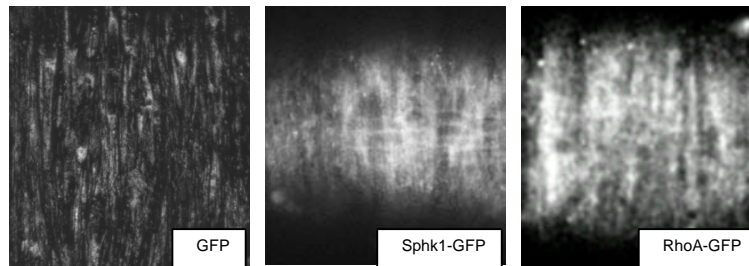


Abb. 13: Expression von reinem GFP und den Fusionsproteinen Sphk1-GFP und RhoA-GFP in den glatten Muskelzellen intakter Widerstandsgefäße. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für jeweils 5 unabhängige Experimente.

Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Interpretation der Befunde war, dass gewährleistet werden konnte, dass entweder nur Endothelzellen (bei luminaler Applikation des Transfektionsmediums) oder nur glatte Muskelzellen (bei adventitieller Applikation) genetisch verändert wurden. Hier konnten wir uns auf Erfahrungen aus früheren Untersuchungen stützen, in denen fluoreszenzmarkierte (FITC) Antisenseoligonukleotide von luminal mit dem Ziel inkubiert wurden, in den Endothelzellen die Expression einer putativen EDHF-Synthase (Cyt P₄₅₀ 2C8) zu reduzieren (Bolz *et al.*, 2000a). In diesen Versuchen erwies sich die Basalmembran zwischen dem einschichtigen Endothel und den darunter liegenden Muskelzellen als sehr dichte Barriere für das Transfektionsmittel (Superfect⁷) und die Oligonukleotide, da bei luminaler Inkubation keine glatten Muskelzellen mit FITC-markierten Oligonukleotiden angefärbt wurden. Eine Aufnahme der FITC-markierten Oligonukleotide in die glatten Muskelzellen wurde bei luminaler Applikation nur erreicht, wenn die Endothelzellschicht vorher mechanisch zerstört wurde. Unsere Versuche mit der Expression von GFP in den glatten Muskelzellen dokumentierten ebenfalls eine Beschränkung der GFP-abhängigen Fluoreszenz auf die glatten

Muskelzellen, in den Endothelzellen war in konfokalen Aufnahmen keine GFP-Fluoreszenz nachweisbar (Bolz & Pohl, 2003).

Ein weiteres Problem mit dem Versuchsmodell ergibt sich aus der geringen Gewebemasse, die ein solches Widerstandsgefäß darstellt und die die Anwendung molekularbiologischer Techniken erheblich erschwert. Wie bereits im Methodenabschnitt dargelegt, musste die Gewinnung von RNA aus dem Gewebe langwierig optimiert werden.

Leider noch immer unmöglich ist die direkte Messung der Sphk1-Aktivität oder von S1P in der Gefäßwand, die zur Unterstützung der in dieser Arbeit dargelegten Schlußfolgerungen wünschenswert gewesen wäre, da die bestehenden Assays (Olivera *et al.*, 2000; Edsall & Spiegel, 1999) für diese Anwendung nicht sensitiv genug sind. Wir haben, wie dargelegt (s. Ergebnisabschnitt), versucht, durch repetitive Drucksprünge das Gefäß wiederholt zu stimulieren und die S1P-Produktion durch die überexprimierte Sphk1 zu verstärken. Basierend auf der Annahme, dass diese Behandlung zu einem Anstieg der S1P-Konzentration in der Gefäßwand führt, erwarteten wir eine Zunahme des Ruhegefäßtonus, welche sich dann auch statistisch signifikant nachweisen ließ. Hier ist deutlich zu machen, dass diese Versuche die direkte Messung natürlich nicht ersetzen können, da nicht auszuschließen ist, dass diese Art der Behandlung auch andere Metaboliten in der Gefäßwand anreichert, die ähnliche Effekte wie S1P haben. Allerdings zeigt sich die Zunahme des Ruhegefäßtonus nur in Gefäßen, die die Sphk1 überexprimieren, nicht aber in nativen oder GFP-exprimierenden Widerstandsgefäßen. Da der wahrscheinlich einzige Unterschied zwischen diesen Gruppen die Expression der Sphk1 ist, lässt sich so zumindest die vermutliche Quelle der/des verantwortlichen Metaboliten eingekreisen.

Zur Untersuchung der Expression von S1P-Rezeptoren (S1PRs) in der Gefäßwand mittels RT-PCR wurden als Primer bereits publizierte Sequenzen des Menschen und

der Ratte verwendet. Dieses Vorgehen war notwendig, da die S1PR₅-Sequenzen des Hamsters (noch) nicht sequenziert sind. Da die S1PRs zwischen den Spezies allerdings einen hohen Grad an Homologien aufweisen, ist die Verwendung von Primersequenzen anderer Spezies möglich. In unserem Ansatz ließ sich so der S1PR₂, nicht aber der S1PR₁ oder S1PR₃, in der Wand des isolierten Widerstandsgefäßes nachweisen. Aufgrund der zuvor beschriebenen und durch uns verfolgten Strategie lässt sich aber nicht mit Sicherheit sagen, dass S1PR₁ oder S1PR₃ in diesen Widerstandsgefäßen nicht exprimiert sind. Aus diesem Grunde beziehen sich auch alle getroffenen Schlußfolgerungen in dieser Arbeit auf die Funktion des S1PR₂. Antisenseoligonukleotide gegen diesen Rezeptorsubtyp reduzierten die durch exogenes S1P induzierten Konstriktionen in einem Ausmaß, welches dem nach Hemmung des RhoA-Signalweges durch C3-Transferase (Protein oder Plasmid), N19RhoA oder Y27632 sehr ähnlich war (s. Ergebnisabschnitt). Dies wiederum lässt darauf schließen, dass entweder keine anderen, prinzipiell an den RhoA-Signalweg gekoppelten S1PRs exprimiert waren, oder diese zumindest nicht den weitgehenden funktionellen Ausfall des S1PR₂ kompensieren konnten.

6. Zusammenfassung

Der RhoA/Rhokinase-Signalweg ist von wesentlicher Bedeutung für die Regulation des mikrovaskulären Gefäßtonus. Allerdings ist unklar, wie und durch welche endogenen Mediatoren dieses System unter physiologischen Bedingungen reguliert wird. Es ist weiterhin noch nicht bekannt, ob dieser Signalweg Bedeutung für pathologische Verstärkungen der Kontraktilität von Widerstandsgefäßen, und damit letztendlich für die Entstehung von Bluthochdruck, hat.

Die der Arbeit zugrundeliegende Hypothese war, dass der Sphingolipidmediator Sphingosin-1-Phosphat (S1P), das Phosphorylierungsprodukt der Sphingosinkinase (Sphk), ein vaskulärer endogener, RhoA-modulierender Stimulus sein könnte. Die membranständige Sphk gibt S1P nicht nur in den Extrazellulärraum ab, wo es durch Bindung an spezifische Rezeptoren (S1PR₁₋₅, frühere Nomenklatur EDG_{1,3,5,6,8}) autokrin auf die Zelle zurück oder parakrin auf Nachbarzellen wirken kann, sondern auch in das Cytosol, wo es als second messenger IP₃-unabhängig intrazellulär Ca²⁺ freisetzt.

Es wurde untersucht, welche Rolle die Sphk, ihr Produkt S1P und der RhoA/Rhokinase-Signalweg für die Regulation des basalen Tonus in Widerstandsgefäßen und für die Regulation der druckinduzierten myogenen Vasokonstriktion spielt, und welche Rezeptorsubtypen an der Vermittlung der vasokonstringierenden Effekte des S1P beteiligt sind.

Die myogene Vasokonstriktion, die für die Autoregulation von Blutgefäßen wichtig ist und damit mittelbare Effekte auf den peripheren Widerstand und folglich den systemischen Blutdruck hat, basiert auf der intrinsischen Eigenschaft glatter Muskelzellen, auf Dehnung, ohne weitere äußere Stimulation, mit einer anhaltenden Kontraktion zu reagieren. Bei diesem bereits 1902 durch Bayliss beschriebenen

Phänomen ist noch nicht abschließend geklärt, über welche zellulären Mechanismen die druckinduzierte myogene Kontraktion ausgelöst und aufrecht erhalten wird, obwohl sie ihren initialen Stimulus, die Dehnung, kontinuierlich reduziert. Endogen freigesetztes S1P mit seinen RhoA-aktivierenden und intrazellulär Ca^{2+} -freisetzenden Eigenschaften ist dabei ein guter Kandidat für einen Stimulus, der die Ca^{2+} - und RhoA-abhängigen, an der myogenen Antwort beteiligten, Kontraktionsmechanismen aufeinander abstimmen könnte.

Stimulation der Arteriensegmente mit *exogenem* S1P (0,003 $\mu\text{mol/L}$ - 3,0 $\mu\text{mol/L}$) induzierte dosisabhängige Konstriktionen, die nach Transfektion der Segmente mit bakterieller C3-Transferase (spezifischer Rho-Inhibitor) oder N19RhoA (dom.-neg. RhoA-Mutante), sowie nach Inkubation mit dem chemischen Rhokinaseinhibitor Y27632 (1 $\mu\text{mol/L}$) signifikant reduziert waren. Mit RT-PCR wurde die Expression von S1PR₂ in diesen Widerstandsgefäßen nachgewiesen. Transfektion der Gefäße mit Antisenseoligonukleotiden gegen S1PR₂ reduzierten die durch S1P induzierten Konstriktionen signifikant.

Um die Rolle der Sphk und des *endogenen* S1P für die Tonusregulation zu charakterisieren, wurden Widerstandsgefäße mit Plasmiden transfiziert, welche für die Sphk oder deren inaktive Mutante hSK-G82D codierten. Dominant aktive oder inaktive RhoA- bzw. Rho-Kinase-Mutanten wurden mit Sphk koexprimiert, um zu untersuchen, ob die durch Sphk initiierte Signalkaskade auf den RhoA/Rho-Kinase-Weg konvergiert. GFP transfizierte Arterien dienten in allen Versuchen als Kontrollgruppe.

Überexpression von Sphk erhöhte den basalen Tonus von Widerstandsgefäßen signifikant, während die dominant negative Sphingosinkinase mutante (hSK-G82D) den Tonus vollständig aufhob. Dominant aktives RhoA (L63RhoA) hatte dieselben Effekte wie Sphk, Koexpression von Sphk mit dominant negativen Mutanten von RhoA (N19RhoA) bzw. Rhokinase (KD1A) verhinderten die Tonuserhöhung.

Myogene Antworten wurden durch Sphk signifikant verstärkt und durch hSK-G82D und Coexpression von Sphk mit dominant negativen RhoA- bzw. Rhokinase-Mutanten aufgehoben. Allerdings waren hier unter durch Dehnung stimulierten Bedingungen die myogenen Antworten in L63RhoA-transfizierten Widerstandsgefäßen, obwohl signifikant stärker als in der Kontrollgruppe, gegenüber der Sphk-Gruppe signifikant schwächer.

Die Sphk-transfizierten Gefäße zeigten zusätzlich zu einer Zunahme der Ca^{2+} -unabhängigen Kontraktionskomponente auch noch eine Verstärkung des initialen Ca^{2+} -Anstieges, so dass es sehr wahrscheinlich ist, dass die stärkere simultane Aktivierung der Myosinleichtkettenkinase die stärkere Kontraktion erklären kann.

Schlussfolgerungen

S1P hat potente, RhoA-abhängige, vasokonstriktorische Effekte in Widerstandsgefäßen, die teilweise über S1PR₂-Rezeptoren vermittelt werden. Die Möglichkeit der endogenen Sphk, über ihr Produkt S1P gleichzeitig die Freisetzung von Ca^{2+} zu initiieren und den RhoA-Signalweg zu aktivieren, weist ihr eine potentiell wichtige Rolle innerhalb der Regulation des mikrovaskulären Ruhetonus und der myogenen Aktivität zu. Die gleichzeitige Beeinflussung der zwei wesentlichen konstriktionsauslösenden Mechanismen erlaubt dabei, v.a. bei der Regulation der myogenen Antwort, eine zeitliche und räumliche Koordination der beiden Konstriktionskomponenten. Eine hervorgehobene Rolle der Sphk für die Regulation der myogenen Antwort als einem wichtigem Faktor der Autoregulation im Gefäßsystem macht die Sphingosinkinase zu einem interessanten Kandidaten für essentielle Hypertonusformen, die mit einer Erhöhung des peripheren Widerstands einhergehen.

7. Literaturverzeichnis

Aktorics, K. & Hall, A. (1989). Botulinum ADP-ribosyltransferase C3: a new tool to study low molecular weight GTP-binding proteins. *Trends.Pharmacol.Sci.* **10**, 415-418.

Aleman, 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.

Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., & Kaibuchi, K. (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Journal of Biological Chemistry* **271**, 20246-20249.

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.

Auge, N., Nikolova-Karakashian, M., Carpentier, S., Parthasarathy, S., Negre-Salvayre, A., Salvayre, R., Merrill, A. H. J., & Levade, T. (1999). Role of sphingosine 1-phosphate in the mitogenesis induced by oxidized low density lipoprotein in smooth muscle cells via activation of sphingomyelinase, ceramidase, and sphingosine kinase. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 21533-21538.

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

Bolz, S. S., de Wit, C., & Pohl, U. (1999). Endothelium-derived hyperpolarizing factor but not NO reduces smooth muscle Ca²⁺ during acetylcholine-induced dilation of microvessels. *British Journal of Pharmacology* **128**, 124-134.

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 Ca²⁺ changes and dilation in isolated resistance arteries. *FASEB Journal* **14**, 255-260.

Bolz, S. S., Galle, J., Derwand, R., de Wit, C., & Pohl, U. (2000b). Oxidized LDL increases the sensitivity of the contractile apparatus in isolated resistance arteries for Ca²⁺ via a rho- and rho kinase- dependent mechanism. *Circulation* **102**, 2402-2410.

Bolz, S. S., Pieperhoff, S., de Wit, C., & Pohl, U. (2000c). 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. Highly effective non-viral gene transfer into VSMCs of cultured resistance arteries demonstrated by genetic inhibition of sphingosine-1-phosphate-induced vasoconstriction. *Journal of Vascular Research* . 2003, in press.

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.

Bonham, M. J. & Danielpour, D. (1996). Improved purification and yields of RNA by RNeasy. *Biotechniques* **21**, 57-60.

Chitale, K., Weber, D., & Webb, R. C. (2001). RhoA/Rho-kinase, vascular changes, and hypertension. *Curr.Hypertens.Rep.* **3**, 139-144.

Chobanian, A. V., Bakris, G. L., Black, H. R., Cushman, W. C., Green, L. A., Izzo, J. L., Jr., Jones, D. W., Materson, B. J., Oparil, S., Wright, J. T., Jr., & Roccella, E. J. (2003). The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA - Journal of the American Medical Association* **289**, 2560-2572.

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.

Cornwell, T. L., Pryzwansky, K. B., Wyatt, T. A., & Lincoln, T. M. (1991). Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Molecular Pharmacology* **40**, 923-931.

Coussin, F., Scott, R. H., Wise, A., & Nixon, G. F. (2002). Comparison of sphingosine 1-phosphate-induced intracellular signaling pathways in vascular smooth muscles: differential role in vasoconstriction. *Circulation Research* **91**, 151-157.

D'Angelo, G., Davis, M. J., & Meininger, G. A. (1997a). Calcium and mechanotransduction of the myogenic response. *American Journal of Physiology* **273**, H175-H182.

D'Angelo, G. & Meininger, G. A. (1994). Transduction mechanisms involved in the regulation of myogenic activity. *Hypertension* **23**, 1096-1105.

D'Angelo, G., Mogford, J. E., Davis, G. E., Davis, M. J., & Meininger, G. A. (1997b). Integrin-mediated reduction in vascular smooth muscle $[Ca^{2+}]_i$ induced by RGD-containing peptide. *American Journal of Physiology* **272**, H2065-H2070.

de Wit, C., Bolz, S. S., Kaas, J., & Pohl, U. (1998). Myogenic effects enhance norepinephrine constriction: Inhibition by nitric oxide and felodipine. *Kidney International* **54 (Suppl. 67)**, 000.

de Wit, C., Esser, N., Lehr, H. A., Bolz, S. S., & Pohl, U. (1999). Pentobarbital-sensitive EDHF mediates ACh-induced arteriolar dilation in the hamster microcirculation. *American Journal of Physiology* **276**, H1527-H1534.

de Wit, C., von Bismarck, P., & Pohl, U. (1994). Synergistic action of vasodilators that increase cGMP and cAMP in the hamster cremaster microcirculation. *Cardiovascular Research* **28**, 1513-1518.

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

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.

Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373-376.

Gong, M. C., Iizuka, K., Nixon, G., Browne, J. P., Hall, A., Eccleston, J. F., Sugai, M., Kobayashi, S., Somlyo, A. V., & Somlyo, A. P. (1996). Role of guanine nucleotide-binding proteins ras-family or trimeric proteins or both in Ca^{2+} sensitization of smooth muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 1340-1345.

Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 3440-3450.

Halayko, A. J. & Solway, J. (2001). Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in smooth muscle cells. *J.Appl.Physiol* **90**, 358-368.

Hill, M. A. & Meininger, G. A. (1994). Calcium entry and myogenic phenomena in skeletal muscle arterioles. *American Journal of Physiology* **267**, H1085-H1092.

Hill, M. A., Zou, H., Potocnik, S. J., Meininger, G. A., & Davis, M. J. (2001). Invited Review: Arteriolar smooth muscle mechanotransduction: Ca(2+) signaling pathways underlying myogenic reactivity. *J.Appl.Physiol* **91**, 973-983.

Hirata, K., Kikuchi, A., Sasaki, T., Kuroda, S., Kaibuchi, K., Matsuura, Y., Seki, H., Saida, K., & Takai, Y. (1992). Involvement of rho p21 in the GTP-enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 8719-8722.

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.

Ikeda, H., Satoh, H., Yanase, M., Inoue, Y., Tomiya, T., Arai, M., Tejima, K., Nagashima, K., Maekawa, H., Yahagi, N., Yatomi, Y., Sakurada, S., Takuwa, Y., Ogata, I., Kimura, S., & Fujiwara, K. (2003). Antiproliferative property of sphingosine 1-phosphate in rat hepatocytes involves activation of Rho via Edg-5. *Gastroenterology* **124**, 459-469.

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.

Itoh, K., Yoshioka, K., Akedo, H., Uehata, M., Ishizaki, T., & Narumiya, S. (1999). An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nature Medicine* **5**, 221-225.

Johnson, P. C. (1980). The myogenic response. In *The Cardiovascular System. Vascular Smooth Muscle*, eds. Bohr, D. F., Somlyo, A. P., & Sparks, H. V., pp. 409-442. Am.Physiol.Soc., Bethesda, Maryland.

Joyner, W. L., Davis, M. J., & Gilmore, J. P. Intravascular pressure distribution and dimensional analysis of microvessels in hamsters with renovascular hypertension. *22*, 190-198. 1981.

Ref Type: Generic

Kimura, T., Sato, K., Malchinkhuu, E., Tomura, H., Tamama, K., Kuwabara, A., Murakami, M., & Okajima, F. (2003). High-Density Lipoprotein Stimulates Endothelial Cell Migration and Survival Through Sphingosine 1-Phosphate and Its Receptors. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*.

Kimura, T., Watanabe, T., Sato, K., Kon, J., Tomura, H., Tamama, K., Kuwabara, A., Kanda, T., Kobayashi, I., Ohta, H., Ui, M., & Okajima, F. (2000). Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3. *Biochemical Journal* **348 Pt 1**, 71-76.

Kitazawa, T., Masuo, M., & Somlyo, A. P. (1991). G-protein-mediated inhibition of myosin light-chain phosphatase in vascular smooth muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 9307-9310.

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.

Levade, T., Auge, N., Veldman, R. J., Cuvillier, O., Negre-Salvayre, A., & Salvayre, R. (2001). Sphingolipid mediators in cardiovascular cell biology and pathology. *Circulation Research* **89**, 957-968.

Licht, T., Tsurulnikov, L., Reuveni, H., Yarnitzky, T., & Ben Sasson, S. A. (2003). Induction of pro-angiogenic signaling by a synthetic peptide derived from the 2nd intracellular loop of S1P3(EDG3). *Blood*.

Lincoln, T. M., Cornwell, T. L., & Taylor, A. E. (1990). CGMP-dependent protein kinase mediates the reduction of Ca²⁺ by cAMP in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology* **258**, C399-C407.

Liu, J., Hill, M. A., & Meininger, G. A. (1994). Mechanisms of myogenic enhancement by norepinephrine. *American Journal of Physiology* **266**, H440-H446.

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., Kostrzewski, K. A., Stein, P. M., Stoos, B. A., & Britton, S. L. (1989a). Quantitative contribution of systemic vascular autoregulation in acute hypertension in conscious dogs. *Journal of Clinical Investigation* **84**, 1900-1905.

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

Meyer zu Heringdorf D., Lass, H., Alemany, R., Laser, K. T., Neumann, E., Zhang, C., Schmidt, M., Rauen, U., Jakobs, K. H., & van Koppen, C. J. (1998). Sphingosine kinase-mediated Ca²⁺ signalling by G-protein-coupled receptors. *EMBO Journal* **17**, 2830-2837.

Meyer zu Heringdorf D., Lass, H., Kuchar, I., Alemany, R., Guo, Y., Schmidt, M., & Jakobs, K. H. (1999). Role of sphingosine kinase in Ca(2+) signalling by epidermal growth factor receptor. *FEBS Letters* **461**, 217-222.

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

Nagao, T., Illiano, S., & Vanhoutte, P. M. (1992). Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to NG-nitro-L-arginine in rats. *American Journal of Physiology* **263**, H1090-H1094.

Nagao, T. & Vanhoutte, P. M. (1993). Endothelium-derived hyperpolarizing factor and endothelium-dependent relaxations. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **8**, 1-6.

Narumiya, S., Ishizaki, T., & Uehata, M. (2000). Use and properties of ROCK-specific inhibitor Y-27632. *Methods in Enzymology* **325**, 273-284.

Niedernberg, A., Scherer, C. R., Busch, A. E., & Kostenis, E. (2002). Comparative analysis of human and rat S1P(5) (edg8): differential expression profiles and sensitivities to antagonists. *Biochemical Pharmacology* **64**, 1243-1250.

Olivera, A., Barlow, K. D., & Spiegel, S. Assaying sphingosine kinase activity. *Methods Enzymol.*2000.;311.:215.-23. **311:215-23**, 215-223.

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.

Pabelick, C. M., Warner, D. O., Perkins, W. J., & Jones, K. A. (2000). S-nitrosoglutathione-induced decrease in calcium sensitivity of airway smooth muscle. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **278**, L521-L527.

Pitson, S. M., D'Andrea, R. J., Vandeleur, L., Moretti, P. A., Xia, P., Gamble, J. R., Vadas, M. A., & Wattenberg, B. W. (2000a). Human sphingosine kinase: purification, molecular cloning and characterization of the native and recombinant enzymes. *Biochemical Journal* **350 Pt 2**, 429-441.

Pitson, S. M., Moretti, P. A., Zebol, J. R., Vadas, M. A., D'Andrea, R. J., & Wattenberg, B. W. (2001). A point mutant of human sphingosine kinase 1 with increased catalytic activity. *FEBS Letters* **509**, 169-173.

Pitson, S. M., Moretti, P. A., Zebol, J. R., Xia, P., Gamble, J. R., Vadas, M. A., D'Andrea, R. J., & Wattenberg, B. W. (2000b). 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.

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.

Pyne, S. & Pyne, N. J. (2002). Sphingosine 1-phosphate signalling and termination at lipid phosphate receptors. *Biochimica et Biophysica Acta* **1582**, 121-131.

Qiu, R. G., Chen, J., McCormick, F., & Symons, M. (1995). A role for Rho in Ras transformation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 11781-11785.

Rosenfeldt, H. M., Hobson, J. P., Maceyka, M., Olivera, A., Nava, V. E., Milstien, S., & Spiegel, S. (2001). EDG-1 links the PDGF receptor to Src and focal adhesion kinase activation leading to lamellipodia formation and cell migration. *FASEB Journal* **15**, 2649-2659.

Roush, W. (1997). Antisense aims for a renaissance. *Science* **276**, 1192-1193.

Sakurada, S., Okamoto, H., Takuwa, N., Sugimoto, N., & Takuwa, Y. (2001). Rho activation in excitatory agonist-stimulated vascular smooth muscle. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **281**, C571-C578.

Salomone, S., Yoshimura, S., Reuter, U., Foley, M., Thomas, S. S., Moskowitz, M. A., & Waeber, C. (2003). S1P(3) receptors mediate the potent constriction of cerebral arteries by sphingosine-1-phosphate. *European Journal of Pharmacology* **469**, 125-134.

Sato, K., Ui, M., & Okajima, F. (2000). Differential roles of Edg-1 and Edg-5, sphingosine 1-phosphate receptors, in the signaling pathways in C6 glioma cells. *Brain Research - Molecular Brain Research* **85**, 151-160.

Sauzeau, V., Le Mellionec, E., Bertoglio, J., Scalbert, E., Pacaud, P., & Loirand, G. (2001). Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase. *Circulation Research* **88**, 1102-1104.

Siehler, S., Wang, Y., Fan, X., Windh, R. T., & Manning, D. R. (2001). Sphingosine 1-phosphate activates nuclear factor-kappa B through Edg receptors. Activation through Edg-3 and Edg-5, but not Edg-1, in human embryonic kidney 293 cells. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 48733-48739.

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. (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* **372**, 231-236.

Somlyo, A. P. & Somlyo, A. V. (2000). Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J.Physiol.(Lond.)* **522**, 177-185.

Spiegel, S. & Milstien, S. (2000). Sphingosine-1-phosphate: signaling inside and out. *FEBS Letters* **476**, 55-57.

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

Takuwa, Y. (2002). Subtype-specific differential regulation of Rho family G proteins and cell migration by the Edg family sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochimica et Biophysica Acta* **1582**, 112-120.

Takuwa, Y., Okamoto, H., Takuwa, N., Gonda, K., Sugimoto, N., & Sakurada, S. (2001). Subtype-specific, differential activities of the EDG family receptors for sphingosine-1-phosphate, a novel lysophospholipid mediator. *Mol.Cell Endocrinol.* **177**, 3-11.

Tamm, I., Dorken, B., & Hartmann, G. (2001). Antisense therapy in oncology: new hope for an old idea? *Lancet* **358**, 489-497.

Tang, T., Connelly, B. A., & Joyner, W. L. (1995). Heterogeneity of endothelial cell function for angiotensin conversion in serial-arranged arterioles. *Journal of Vascular Research* **32**, 129-137.

Tang, T. & Joyner, W. L. (1992). Differential role of endothelial function on vasodilator responses in series-arranged arterioles. *Microvascular Research* **44**, 61-72.

Tran, N. N., Spitzbarth, E., Robert, A., Giummelly, P., Atkinson, J., & Capdeville-Atkinson, C. (1998). Nitric oxide lowers the calcium sensitivity of tension in the rat tail artery. *Journal of Physiology - London* **507**, 163-174.

Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M., & Narumiya, S. (1997a). Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* **389**, 990-994.

Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M., & Narumiya, S. (1997b). Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension [see comments]. *Nature* **389**, 990-994.

Van Bavel, 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.

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

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.

Young, K. W., Willets, J. M., Parkinson, M. J., Bartlett, P., Spiegel, S., Nahorski, S. R., & Challiss, R. A. (2003). Ca(2+)/calmodulin-dependent translocation of sphingosine kinase: role in plasma membrane relocation but not activation. *Cell Calcium* **33**, 119-128.

Zou, H., Lifshitz, L. M., Tuft, R. A., Fogarty, K. E., & Singer, J. J. (2002). Visualization of Ca²⁺ entry through single stretch-activated cation channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 6404-6409.

8. Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Pohl, dafür, dass er es mir ermöglicht hat, an seinem Lehrstuhl zu promovieren. Während der gesamten Dauer der Promotion durfte ich stets eine auf fachlicher und menschlicher Seite außergewöhnliche Betreuung genießen. Professor Pohl verdanke ich eine wunderbare Lernzeit an seinem Institut, die mir noch lange nach Beendigung meiner Dissertation in vielen Bereichen meines Lebens hilfreich sein wird.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Dr. med. Steffen Sebastian Bolz, ohne dessen in jeder Hinsicht umfassende Unterstützung über den gesamten Zeitraum meiner Zeit als Doktorand diese Arbeit nie in dieser Form gelungen wäre. Auch in schwierigen Zeiten konnte ich mir immer seiner vollen Unterstützung sicher sein. Aus dieser so engagierten Betreuung auf fachlicher Ebene hat sich eine mir sehr wertvolle persönliche Freundschaft entwickelt, die ich als sehr wichtige Bereicherung meines Lebens ansehe. Dadurch war und ist er auch bei persönlichen Fragen oder Schwierigkeiten, die weit über den Gegenstand der Doktorarbeit hinausgingen, einer meiner wichtigsten Ansprechpartner.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern Dr. Hermann und Renate Vogel danken. Ohne Ihre selbstlose Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.

9. Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Lukas Vogel
Geburtsdatum/Ort	24.05.1974, München
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

10/2000 – heute	Promotionsstelle bei Prof. Dr. U. Pohl, LMU-München, Physiologisches Institut, Lehrstuhl vegetative Physiologie
07/2000	3. Staatsexamen in Pharmazie und Erlangung der Approbation für Apotheker
06/1999 – 05/2000	Praktisches Jahr (Pflicht) als Zulassungsvoraussetzung zum 3. Staatsexamen, 7 Monate Johannes-Apotheke, Gröbenzell, 4 Monate Shands Hospital Gainesville, University of Florida
05/1994 – 05/1999	Studium der Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
07/1993	Abitur am Käthe-Kollwitz-Gymnasium in München

Auslandsaufenthalte sowie sonstige Tätigkeiten und Kenntnisse

??	Studienaufenthalt in Oxford zur Erlangung des Oxford International Business English Certificate (01/1994 – 04/1994)
??	Praktika in der Metro-Apotheke, München (04/1995 – 05/1995, 10/1996 – 11/1996)
??	Praktika am Shands Hospital Gainesville, Florida (01/2000 – 04/2000 s.o., 10/1998 – 11/1998)
??	Organisation eines Promotion-Events im Auftrag von Toyota (12/1998)
??	Sprachen: Englisch sehr gut, Französisch gut
??	Hobbies: Reisen, Sport (Jogging, Tennis, Golf, Motorsport)
??	Computerkenntnisse: Allgemeine Anwenderkenntnisse, MS Office

Berufserfahrungen

08/2000 – 09/2000	Kranich-Apotheke, München, Angestellter Apotheker (Teilzeit)
02/2000 – 07/2000	Bären-Apotheke, Olching, Angestellter Apotheker (Teilzeit)