

Aus dem Institut für Physiologie der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. R. Köhling

**Bedeutung des Zytoskeletts für die Reaktion kleiner
Arterien auf pulsatilen Druck**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

Vorgelegt von

Ramon Kral

Geboren am 03.12.1982 in Kyritz.

Rostock, den 15.11.2011

Dekan: Prof. Dr. Emil Christian Reisinger

Gutachter

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Rudolf Schubert,
(Institut für kardiovaskuläre Physiologie)
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Patzak
(Institut für vegetative Physiologie)
3. Gutachter: PD Dr. med. Timo Kirschstein
(Institut für Neurophysiologie)

Datum der Verteidigung: 19.06.2012

Abkürzungen	0
1 Einleitung	1
1.1 Grundlagen	1
1.1.1 Autoregulation des Blutflusses.....	1
1.1.2 Morphologie des glatten Muskels	1
1.1.3 Kontraktion des glatten Muskels.....	2
1.1.4 Myogene Reaktion	3
1.1.4.1 Ionenkanäle	4
1.1.4.2 Myogene Reaktion unter oszillatorischem Druck.....	7
1.1.5 Zytoskelett.....	7
1.1.5.1 Aktin	8
1.1.5.2 Myosin	9
1.1.5.3 Intermediärfilament.....	10
1.1.5.4 Rolle des Zytoskeletts für die myogene Reaktion	10
1.2 Rolle des Ca ²⁺ bei der Kopplung von Erregung und Kontraktion.....	12
1.2.1 Kopplung von Erregung und Kontraktion.....	12
1.2.1.1 Pharmakomechanische Kopplung.....	12
1.2.1.2 Elektromechanische Kopplung	13
1.2.1.3 Ca ²⁺ -abhängige Phosphorylierung des Myosins	14
1.3 Modulation der Ca ²⁺ -Sensitivität des Kontraktionszyklus	14
1.3.1 Typ 1: Verhältnis MLCK/MLCP	15
1.3.1.1 Beeinflussung der MLCK-Aktivität	15
1.3.1.2 Beeinflussung der MLCP-Aktivität	16
1.3.2 Typ 2: Verhältnis Phosphorylierung/Kontraktionskraft.....	17
1.3.2.1 Calponin.....	18
1.3.2.2 Caldesmon.....	18
1.4 Aufgabenstellung.....	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Material.....	21
2.1.1 Versuchstiere	21
2.1.2 Lösungen	21
2.1.3 Spezielle Chemikalien.....	21
2.2 Methoden.....	22
2.2.1 Präparation der A. Gracilis.....	22

2.2.2	Präparation der A. Cerebellaris superior	23
2.2.3	Einspannen des Präparates in die Messkammer	24
2.2.4	Durchführung der Messung	24
2.2.5	Versuchsablauf	25
2.2.6	Statistik	27
3	Ergebnisse	28
3.1	Myogene Reaktivität kleiner Arterien bei statischem und pulsatilem Druck	28
3.2	Reaktion der Arteria Cerebellaris superior auf pulsatilen Druck unter Beeinflussung des Zytoskeletts	34
3.3	Reaktion der Arteria Gracilis auf pulsatilen Druck unter Beeinflussung des Zytoskeletts	38
4	Diskussion	42
4.1	Diskussion der Methodik	42
4.1.1	Wahl des Untersuchungsmodells	42
4.1.2	Güte der Präparate und Ausschlusskriterien	43
4.1.3	Erfassung der Messwerte	44
4.1.4	Wahl der Druckdarbietungsform, konstanter versus pulsatiler Druck	44
4.2	Zytoskelett und myogene Reaktion unter pulsatilem Druck	45
4.2.1	Myogene Reaktivität der Arteria Cerebellaris superior bei statischem und pulsatilem Druck	45
4.2.2	Reaktion kleiner Arterien auf pulsatilen Druck unter Beeinflussung des Zytoskeletts	46
4.2.3	Extrazelluläre Modulation der myogenen Reaktion	49
4.2.4	Physiologische und pathophysiologische Bedeutung	50
5	Zusammenfassung	52
6	Thesen	54
7	Literaturverzeichnis	56
8	Selbständigkeitserklärung	67
10	Danksagung	68

Abkürzungen

ADP	Adenosin-Di-Phosphat
AMP	Adenosin-Mono-Phosphat
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
Ca ²⁺	Calcium-Ion
Ca ²⁺ /CaM	[Ca ²⁺] ₄ -CaM-Komplex
CaM	Calmodulin
CaM-KII	Ca ²⁺ /CaM-abhängige Proteinkinase II
CDK1	Cyclin-abhängige Kinase I
Cyto	Cytochalasin D
DAG	1,2-Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetylsäure
ENaC	epithelialer Natriumkanal (epithelial sodium channel)
F-Aktin	filamentöses Aktin
G-Aktin	globuläres Aktin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Ethansulfonsäure
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
Jaspa	Jasplakinolide
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MLC	leichte Kette des Myosins
mRNA	messenger RNA (Boten-Ribonukleinsäure)
NAD	Nicotinamiddinucleotid
P _i	freies Phosphat
PIP ₂	Phosphatidyl-4,5-bisphosphat
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
r-MLC	regulatorische, leichte Kette des Myosins
ROK	Rhokinase
TRP-Kanäle	„transient receptor potential“ - Kanal

1 Einleitung

1.1 Grundlagen

1.1.1 Autoregulation des Blutflusses

Eine große Bedeutung in der Regulation von Blutdruck und Blutfluss und somit Schluss endlich der Blutperfusion von Organen, kommt den kleinen Arterien und Arteriolen zu. Dementsprechend existiert auch eine Vielzahl von dilatierenden und konstringierenden Einflüssen, die auf diese Gefäße wirken. Da sind der Blutdruck und der Blutfluss selbst zu nennen, die Innervation der Gefäße durch das vegetative Nervensystem, humorale und endotheliale Faktoren und Metabolite aus dem umliegenden Gewebe. Die kleinen Gefäße dienen also auch als Sensor und Regulator und können so adäquat auf Veränderungen der Stoffwechsellistung der zu versorgenden Gewebe und des Perfusionsdrucks reagieren. Dafür stehen den Gefäßen verschiedene Mechanismen zur Verfügung. Auf der systemischen Seite ist es der Tonus der sympathischen Innervation und vasoaktive Hormone. Lokal ist es die Autoregulation, an der Mechanismen, wie die myogene Aktivität und die metabolische Kontrolle, beteiligt sind.

Die myogene Aktivität wird bestimmt durch den basalen Tonus der Gefäße, die spontane vasomotorische Aktivität und die myogene Reaktion. Das bedeutet, dass der Gefäßmuskel auf veränderte Druckverhältnisse mit konsekutiver Veränderung des Gefäßdurchmessers reagiert und somit den Blutfluss an die neue Lage anpasst. Dies ist der eigentliche Autoregulationsmechanismus der Gefäße.

Die metabolische Kontrolle ist die Reaktion der Gefäße auf Ionenkonzentrationsverschiebungen, Veränderungen der Partialdrücke der Atemgase und die Freisetzung von Metaboliten aus den die Gefäße umgebenden Geweben. So wirken ein azidotisches Milieu, eine leicht erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration, ein erhöhter CO₂-Partialdruck und ein erniedrigter O₂-Partialdruck oder auch Adenosin dilatierend und gegenteilige Veränderungen bewirken dementsprechend eine Kontraktion.

1.1.2 Morphologie des glatten Muskels

„Die Gruppe der Muskelzellen wird in quergestreifte bzw. Skelettmuskulatur, Herzmuskulatur und in glatte bzw. vegetative Muskulatur unterteilt. Für diese Arbeit interessiert uns nur die glatte Muskulatur. Daher wird in diesem Abschnitt auch primär auf diese eingegangen. Die glatte Muskulatur kommt hauptsächlich in den inneren Organen, wie dem Gefäßsystem, dem

Verdauungstrakt und dem Uterus vor. Der glatte Muskel ist schon lichtmikroskopisch gut vom Skelettmuskel abzugrenzen. Er wirkt wenig strukturiert und homogen, was ihm auch seinen Beinamen „glatt“ eingebracht hat. Die spindelförmigen Zellen des glatten Muskels sind 2-6µm breit und können 100-500 µm lang sein. Im Gegensatz dazu steht die Skelettmuskulatur, die mit 10-100 µm Breite und mehreren Zentimetern Länge ganz andere Dimensionen erreicht. Das der zu untersuchende Muskeltyp so homogen wirkt, liegt am inneren Aufbau der Myofilamente. Während sich die Myofibrillen im Skelettmuskel gleichmäßig längs in Bündeln anordnen und durch ihren regelmäßigen inneren Aufbau eine optische Querstreifung ausbilden, sind im glatten Muskel die Myofilamente unregelmäßig in einem eher diagonal ausgebildeten Netzwerk angeordnet. Der Nukleus des glatten Muskels liegt eher solitär und zentral, während im Skelettmuskel, durch die Fusion der Myoblasten, viele Zellkerne am Rand unter der Zellmembran liegen. Auch der intrazelluläre Calciumspeicher, das sarkoplasmatische Retikulum, ist mit 2-7,5 % des Zellvolumens, je nach Gewebeherkunft, viel geringer ausgeprägt als im Skelettmuskel, welcher zusätzlich auch noch über ein transversales Tubulussystem verfügt. Die Besonderheiten dieses Muskels zeigen sich auch in seiner Steuerung. Der Skelettmuskel kann nur neural über die motorischen Endplatten gesteuert werden, während der glatte Muskel vegetativ innerviert wird, sowie parakrin und hormonell kontrolliert werden kann.“ (Deetjen *et al.*, 2005) Als letzte morphologische Besonderheit in diesem Abschnitt sei erwähnt, dass der glatte Muskel nicht nur kontraktile, sondern auch synthetische Eigenschaften hat. In der Media großer Arterien ist dies der einzig vorkommende Zelltyp, dennoch existieren dort Bindegewebsstrukturen, wie zum Beispiel Elastin und Kollagen. Diese werden vom glatten Muskel synthetisiert (Chamley-Campbell *et al.*, 1979; Drummond *et al.*, 2008; Bayliss, 1902). Es wurde nachgewiesen, dass ein glatter Muskel in Zellkultur vom kontraktilen Typ in den synthetischen Typ wechseln kann (Chamley-Campbell & Campbell, 1981).

1.1.3 Kontraktion des glatten Muskels

„Die Grundlage einer jeden Kontraktion bildet der ATP abhängige Querbrückenzyklus. Dieser ist eine zyklische Interaktion der Myofilamente. Im Ausgangszustand ist an die Köpfe des Myosins kein ATP und auch keines seiner Abbauprodukte gebunden. Dabei sind die Myosinköpfchen fest an das Aktin angelagert, welches an den Dens bodies bzw. Dens plaques befestigt ist. Über diese Verbindung können sich dann die Verkürzungen der Myofilamente auf die gesamte Muskelzelle auswirken. Wird nun ATP freigesetzt, lagert sich dieses an den Myosinkopf an und spaltet sich später hydrolytisch auf, zu ADP und P_i (freies Phosphat). Die dabei frei werdende Energie ermöglicht die Konformationsänderung des Myosins. Nach der

Lösung der Bindung von Myosin und Aktin in Folge der ATP-Bindung lagert sich der Myosinkopf an eine neue Stelle an. Erst ist die neue Verbindung lose, dann werden ADP und P_i sequentiell freigesetzt, wodurch die Bindung stabilisiert wird. Die Kraft generierenden Querbrücken führen dabei eine Konformationsänderung durch. Das führt zu einer Verkürzung der Myofilamente und damit gleichzeitig zu einer Verkürzung der gesamten Muskelzelle. Dieser Prozess ist in allen Muskelzellen gleich, egal ob Skelettmuskel oder glatter Muskel. Doch gibt es bezüglich der Kontraktion quantitative Unterschiede. Im glatten Muskel sind viele Abläufe und Eigenschaften geringer ausgeprägt, wie z.B. die ATPase-Aktivität, die Freisetzungsgeschwindigkeit der Spaltprodukte, der Myosin Gehalt, die Frequenz des Querbrückenzyklus und die Sarkomerlänge ist größer. Aus Letzterem resultiert länger andauernde Kraft bei gleichem Energieverbrauch, oder anders formuliert, bei niedrigerem Energieverbrauch kann ein hoher Krafttonus entwickelt werden. Der glatte Muskel wird auch als langsamer Muskel bezeichnet, da beim Skelettmuskel, durch die höhere Frequenz des Querbrückenzyklus, die Verkürzung viel schneller als beim glatten Muskel abläuft.“ (Deetjen *et al.*, 2005)

1.1.4 Myogene Reaktion

Die myogene Reaktion ist erstmals von Bayliss beschrieben worden und somit ist diese auch unter dem Synonym Bayliss-Effekt bekannt geworden. Er beschrieb sie folgendermaßen. Es ist eine Kontraktion von Gefäßen, als Reaktion auf eine Erhöhung des transmuralen Drucks, beziehungsweise ihre Dilatation, als Reaktion auf eine Drucksenkung, in deren Folge die Perfusion des jeweiligen Versorgungsgebietes weitgehend konstant gehalten werden kann (Bayliss, 1902).

Der vermeintliche Auslöser der Reaktion ist erst 87 Jahre später beschrieben worden. Als dieser wird die Erhöhung der Wandspannung vermutet (für Übersicht siehe (Schubert & Mulvany, 1999)). Der Sensor für die Veränderung der Wandspannung ist und bleibt aber auch 100 Jahre später unbekannt (Davis & Hill, 1999).

Die myogene Reaktion ist ein Phänomen mit unterschiedlicher Ausprägung in verschiedenen Gefäßen und Gefäßbetten. Venen haben nur schwache Reaktionen im Vergleich zu Arteriolen und kleinen Arterien (Dornyei *et al.*, 1996; Kuo *et al.*, 1993). Subendokardiale Arterien des Schweins reagieren schwächer als subepikardiale Gefäße (Kuo *et al.*, 1988); Hirnarterien reagieren besser als Mesenterialarterien gleicher Größe bei verschiedenen Spezies (Osol *et al.*, 1991; Coombes *et al.*, 1999). Auch der Durchmesser ist entscheidend für die Stärke der myogenen Reaktion. Arterien mit einem Durchmesser von 50 bis 300 μm reagieren stärker als

Arterien mit einem Durchmesser unter bzw. über diesen Marken (Thorin-Trescases *et al.*, 1997; Davis, 1993).

In der Gefäßwand kann man drei Hauptzellverbände ausmachen, das Endothel, Nervenendigungen und die glatte Gefäßmuskulatur. Für das Endothel gibt es unterschiedliche Aussagen über die Relevanz und Beteiligung an der myogenen Reaktion, welche jedoch hauptsächlich auf die Methode der Endothelentfernung zurückzuführen sind. Bei der chemischen Entfernung des Endothels wurden signifikante Veränderungen, bei der mechanischen Entfernung aber keine Änderungen der myogenen Reaktion beobachtet. Letztlich wurde der Konsens erzielt, dass das Endothel an der myogenen Antwort nicht beteiligt ist (McCarron *et al.*, 1989; Kuo *et al.*, 1990; Meininger & Davis, 1992).

Die Nervenendigungen sind nach einhelliger Meinung auch nicht an der myogenen Reaktion beteiligt. Um dies zu beweisen, wurde ihre Aktivität durch verschiedene Substanzen oder Kombinationen von diesen gehemmt. Hierfür wurden Tetrodotoxin, Phentolamin, Phenoxybenzamin, Propanol und Atropin verwendet (Anschutz & Schubert, 2005; Osol & Halpern, 1985).

Bleibt noch die glatte Gefäßmuskulatur, welche mit druckinduzierbaren Mechanismen, wie der Membrandepolarisation, ausgestattet ist. Über diese kommt es zum Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und anderer Botenstoffe, was zu einer Kontraktion führt. Somit ist ausschließlich der Gefäßmuskel für die myogene Reaktion verantwortlich (Schubert & Mulvany, 1999). Die Erhöhung des transmuralen Drucks setzt die myogene Reaktion in Gang, was zu einer Kontraktion des Gefäßes führt. Dieser Prozess geht immer mit einer Membrandepolarisation einher (Knot & Nelson, 1995; Knot *et al.*, 1998; Jaggar, 2001; Gokina & Osol, 2002).

Wie erwähnt, sind an der myogenen Reaktion druckinduzierbare Mechanismen beteiligt, insbesondere Änderungen des Membranpotentials. Hierfür sind Ionenkanäle von immenser Bedeutung, die daher hier kurz vorgestellt werden.

1.1.4.1 Ionenkanäle

Zur besseren Übersicht sollen die Kanäle in vier Kategorien eingeteilt werden, die im Folgenden genauer betrachtet werden.

1.1.4.1.1 Nicht selektive Kationen-Kanäle

Eine Aktivitätssteigerung dieser Kanäle führt zu einem vermehrten Einstrom von Kationen, wodurch das Innere der Zelle im Vergleich zum Ruhezustand positiver wird; dies führt dann konsequenter Weise zur Depolarisation der Plasmamembran. Der Beweis für die Beteiligung

dieses Mechanismus an der myogenen Reaktion wurde durch die Reduzierung funktioneller TRPC-6 Kanäle, mit Hilfe von Oligonucleotiden, an Hirnarterien der Ratte erbracht. Dies verhinderte einen myogenen Tonus und verminderte Ionenströme an isolierten Myozyten (Welch *et al.*, 2002). Gegen eine Beteiligung bei der Kontraktion des glatten Gefäßmuskels spricht allerdings, dass Natrium das Hauption ist, welches durch den Kanal fließt (Setoguchi *et al.*, 1997). Da extrazelluläres Natrium aber nicht essentiell für die myogene Antwort ist, ist die exakte Rolle dieses Kanals weiterhin ungeklärt (Nelson *et al.*, 1988; Watanabe *et al.*, 1996).

Es soll hier noch kurz auf zwei weitere nicht selektive Kationenkanäle eingegangen werden, den epithelialen Natriumkanal, kurz ENaC, und den TRPM 4.

Der epitheliale Natriumkanal ist ein membranständiger Ionenkanal, der neben Lithiumionen und Protonen vor allem für Natriumionen durchlässig ist. Er ist im Grundzustand geöffnet, man spricht von einem konstitutiv aktiven Kanal. Diese Kanäle befinden sich vor allem in der Niere, der Lunge und dem Colon. Er ist in den transepithelialen Transport von Na^+ -Ionen involviert, welchen er gemeinsam mit der Na^+/K^+ -ATPase bewerkstelligt. Er spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Na^+ und K^+ -Konzentrationen in Blut, Epithelien, sowie extraepithelialen Flüssigkeiten, indem er Na^+ -Ionen aus Primärharn und Darmlumen rückresorbiert. Die ENaC-Aktivität in Niere und Colon wird dabei durch Aldosteron moduliert und kann durch Amilorid blockiert werden. (Drummond *et al.*, 2008) konnten zeigen, dass diese ENaC eine essentielle Rolle in der myogenen Reaktion der Nierengefäße spielen.

Die TRP-Kanäle sind eine sehr umfangreiche Familie von Ionenkanälen, die man in sieben Unterfamilien aufteilen kann. Die Verwandtschaft dieser Kanäle ist nur sehr gering ausgeprägt, aber alle besitzen eine Durchlässigkeit für Kationen. Für die Gruppe der Melastatin-verwandten TRP-Kanäle (TRPM) konnte man eine Relevanz für die Kontraktion in elektrisch erregbaren Zellen nachweisen.

TRPM4_b ist nicht permeabel für Ca^{2+} , er zählt zu den unspezifischen Kationenkanälen. Er wird nicht konstitutiv geöffnet, sondern durch Ca^{2+} moduliert (Launay *et al.*, 2002). In der gleichen Arbeit wurde der Mechanismus dann folgendermaßen beschrieben. Der TRPM4_b ist Teil eines regulatorischen Systems, das den Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran kontrolliert. Es kommt infolge Rezeptor vermittelter Ca^{2+} -Freisetzung zum Einstrom von Ca^{2+} . Die Erhöhung der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration aktiviert TRPM4_b. Die durch TRPM4_b hervorgerufene Depolarisation der Plasmamembran setzt einerseits den

elektrochemischen Antrieb für Ca^{2+} herab und begrenzt so den Ca^{2+} -Einstrom, aktiviert aber andererseits spannungsabhängige Kalziumkanäle und erhöht so den Ca^{2+} -Einstrom.

Durch Verringerung der Expression von TPRM4_b , mittels Antisense-Oligonukleotiden, konnten (Earley *et al.*, 2004) zeigen, dass TPRM4_b an der druckinduzierten Depolarisation und der myogenen Konstriktion der Arterien beteiligt ist.

1.1.4.1.2 Spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanal

Wird diese Kanalart aktiviert, kommt es zum Einstrom von positiven Ladungen in die Zelle und dies kann eine Depolarisation verursachen. Eine Blockade dieser Kanäle wurde an Hirnarterien von Ratten und Kaninchen untersucht. Dabei wurde die myogene Kontraktion verhindert, aber es kam dennoch zu einer Membrandepolarisation (Knot & Nelson, 1995; Knot *et al.*, 1998). Diese Befunde zeigen, dass diese Kanäle nicht ursächlich an der Entwicklung der myogenen Depolarisation beteiligt, aber essentiell für die myogene Kontraktion der glatten Muskulatur sind.

1.1.4.1.3 Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle

Diese Kanäle sind abhängig von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und der Membranspannung. Öffnen die Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanäle, strömt Kalium aus der Zelle, was zu einer Hyperpolarisation der Membran führt. Das bedeutet, diese Kanäle haben eine Hemmfunktion bei der myogenen Reaktion, indem sie durch die Hyperpolarisation aktive Ca^{2+} -Kanäle schließen und somit einen negativen Rückkopplungs-Mechanismus bilden und den Ca^{2+} -Einstrom kontrollieren (Knot & Nelson, 1998; Brayden & Nelson, 1992).

In Abhängigkeit von den untersuchten Gefäßen, gibt es auch hier gegensätzliche Resultate. An Ratten wurden mehrere Inhibitoren dieser Kanäle untersucht. Charybdotoxin vermindert die Membrandepolarisation und auch die myogene Reaktion. Iberiotoxin in Hirnarterien macht eher das Gegenteil (Knot & Nelson, 1998) und Tetraethylammonium hat gar keinen Effekt gezeigt (Watanabe *et al.*, 1996). Diese widersprüchlichen Resultate lassen leider zurzeit keine allgemeine Aussage über die Bedeutung dieser Kanalart für die myogene Kontraktion zu.

1.1.4.1.4 Chloridkanäle

Aktiviert man diese Kanäle, so kann Chlorid aus der Zelle ausströmen, was zu einer Depolarisation führt und somit zu einer Kontraktion. An Hirnarterien von Ratten haben Chlorid-Kanal-Blocker bei hohen Drücken, jedoch nicht bei niedrigen Drücken, zu

Veränderungen des Membranpotentials und der Gefäßdurchmesser geführt, was auf eine druckabhängige Aktivierung dieser Kanäle hinweist (Nelson *et al.*, 1997).

Später wurde dann bei der Entwicklung des myogenen Tonus der Chlorid-Ausstrom gemessen, welcher mit Erhöhung des Drucks zunahm und nach Gabe eines Chlorid-Kanal-Blockers sistierte (Doughty & Langton, 2001). Solange man aber keine spezifischen Blocker für Chlorid-Kanäle hat, kann man auch keine definitive Aussage zu ihrer Bedeutung, bei der myogenen Kontraktion, treffen (Schubert & Mulvany, 1999).

1.1.4.2 Myogene Reaktion unter oszillatorischem Druck

In vivo deformiert jede Pulswelle vaskuläre glatte Muskelzellen, welche Bestandteil der Zellwand, der Arterien sind. Durch jede Pulswelle wird die Arterienwand um 5-10 % gedehnt; eine Dehnung bis zu 25% ist während physiologischer Anpassung möglich (Osol, 1995). So sind vaskuläre glatte Muskelzellen in situ einer konstanten zyklischen mechanischen Dehnung ausgesetzt. Die Endothelzellen erfahren dabei durch den Flüssigkeitsstrom bedingte Scherkräfte, vaskuläre glatte Muskelzellen werden elongiert. Somit sind vaskuläre, glatte Muskelzellen mit einer dynamischen, mechanischen Umgebung konfrontiert, welche ihrerseits durch pulsatilen Druck und oszillierende Scherkräfte moduliert wird.

Der oszillatorische Reiz aktiviert zwei unabhängige, aber parallel verlaufende, intrazelluläre Signalwege. Der eine aktiviert die Myosin-Leichtketten-Reaktion und damit den Querbrückenzyklus. Der andere Signalweg hingegen die Aktinpolymerisation mit zytoskelettalem Remodelling, welches zum Aufbau einer erhöhten Zytoskelettstabilisation führt. Beide zusammen erzeugen die Spannung der Muskelzellen und somit das Ausmaß der myogenen Reaktion (Tang & Gunst, 2004; Tang *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2005).

1.1.5 Zytoskelett

Die Myofibrillen im glatten Muskel bilden ein diagonales Netzwerk unter Einschluss von Dens plaques und Dens bodies, welche den Fibrillen als Verankerungspunkte dienen. Die Dens plaques und bodies enthalten α -Aktin und Vinculin und entsprechen damit den Z-Scheiben der Skelettmuskulatur. Die Myofilamente werden in 3 Typen unterschieden, welche man gut durch Größe, Lage und Proteinzusammensetzung differenzieren kann. Es sind die dünnen Aktinfilamente, die dicken Myosinfilamente und die Intermediärfilamente, welche gemeinsam an der Bildung des Zytoskeletts beteiligt sind. Das Zytoskelett ist verantwortlich für die mechanische Stabilisierung der Zelle und ihre äußere Form, für Transport und Bewegungen in der Zelle und für die Bewegung der Zelle als Ganzes. Alle drei Klassen der

oben genannten Myofilamente tragen zu diesen Funktionen bei. Der weitaus größere Anteil dieser Myofilamente ist aber an der Bildung der kontraktile Elemente beteiligt.

1.1.5.1 Aktin

Das Aktin wird, mit einem Durchmesser von 50-80 Å, als dünnes Filament bezeichnet. Es macht den größten Bestandteil des Zytoskeletts aus und ist der Bestandteil, welcher sich direkt mit den Dens bodies und Dens plaques verbindet und über den die anderen Teile des Zytoskeletts mit diesen Aufhängungen verknüpft sind. Es ist dem Myosin 13:1 im Vorkommen überlegen. Aus diesem Grund ordnen sich auch 10-15 Aktinfilamente um einen Myosinstrang an (Somlyo & Somlyo, 1994).

Ein Aktinfilament besteht aus F-Aktin (filamentöses Aktin) und aus Tropomyosin. Das F-Aktin wiederum ist eine Zusammensetzung aus vielen G-Aktin Molekülen (globuläres Aktin) welche in einer physiologischen Salzlösung polymerisieren und somit durch eine hydrophobe Wechselwirkung F-Aktin ausbilden. Das G-Aktin kommt in 6 Isoformen im Organismus von Vertebraten vor (Vandekerckhove & Weber, 1978). Es existieren drei α , eine β und zwei γ -Unterformen des globulären Aktins. Da jede Isoform einzeln auf einem eigenen Gen codiert wird, ist die Expression auch gewebespezifisch. So kommt in Gefäßen am häufigsten die α -Form vor (Fatigati & Murphy, 1984), während die γ -Form eher in viszeralen, glatten Muskelzellen zu finden ist. Nur die β -Form taucht in allen Zellen als Bestandteil des Zytoskeletts auf (North *et al.*, 1994). Wie bereits erwähnt, ist auch das Tropomyosin an der Bildung des Aktinstranges beteiligt. Es besteht im glatten Muskel genau wie im Skelettmuskel aus 2 Polypeptidketten von 36 und 39 kDa, die eine α -Helix bilden und sich spiralförmig um das polymerisierte G-Aktin anordnen. Das Tropomyosin hat wichtige Bedeutungen für die Kontraktion des glatten Muskels. Zum Einen beeinflusst es die Interaktion von Myosin und Aktin. Es führt eine kooperative Konformationsänderung am Aktin durch und ermöglicht so den Zugang an die Bindungsstelle für das phosphorylierte Myosinköpfchen. Zum Anderen ist es ausgesprochen wichtig für das Erreichen des vollen Umfanges der ATPase inhibierenden Wirkung des Caldesmon (siehe unten) (Übersicht bei Morgan & Gangopadhyay, 2001). Die essentielle Beteiligung des Aktinzytoskeletts an der myogenen Reaktion konnte kürzlich gezeigt werden. Bei der Kontraktion kommt es zu einer Umstrukturierung des Zytoskeletts im Sinne einer Aktinpolymerisation (Cipolla *et al.*, 2002; Mehta & Gunst, 1999; Gokina & Osol, 2002) als Antwort auf die erhöhte Wandspannung. Eine Hemmung der Polymerisation durch Cytochalasin D dagegen verhinderte die Ausbildung der myogenen Reaktion (Gokina & Osol, 2002; Cipolla *et al.*, 2002). Wie schon erwähnt setzt sich das F-Aktin aus den globulären G-Aktinmolekülen zusammen. An jedes G-Aktinmolekül ist Ca^{2+} und ein ATP Molekül

gebunden. Am Anfang eines F-Aktins finden sich 2 G-Aktinmonomere zusammen und lagern sich, unter Hydrolyse von ATP zu ADP und P^+ , zu einem Dimer zusammen, daraus wird ein Trimer usw.. Diesen Vorgang nennt man Nukleation (Korn, 1982;Pollard, 1986). Die Verlängerung des F-Aktin-Fadens erfolgt nun mit zunehmender Geschwindigkeit, bis ein Polymerisationsplateau erreicht ist (Korn, 1982;Brenner & Korn, 1980). Das F-Aktin weist eine strukturelle Polarität auf. Daher haben beide Enden auch eine unterschiedliche Polymerisationskinetik. Ein Ende ist das „barbed end“ auch Plus-Ende. Hier polymerisieren die G-Aktinmonomere bei hohen G-Aktin-Konzentrationen. Das andere Ende ist das „pointed end“ oder auch Minus-Ende. An diesem erfolgt die Abdissoziation der G-Aktinmonomere bei niedrigen G-Aktin-Konzentrationen (Brenner & Korn, 1980). Konzentrationsgesteuert erfolgt die Einstellung eines Fließgleichgewichts, das heißt, es werden gleich viele G-Aktinmonomere angelagert wie abgespalten. Dies entspricht einem Nettowachstum von Null und wird als „Treadmilling“ bezeichnet (Korn, 1982;Pollard & Cooper, 1986;Brenner & Korn, 1980).

1.1.5.2 Myosin

Das Myosin ist das dicke Filament mit einem Durchmesser von 120-180 Å und einem Molekulargewicht von 470 kDa. Auch bei diesem Bestandteil des Zytoskeletts finden sich wieder mehrere Untereinheiten, auf die näher eingegangen werden soll.

1. Die schweren Ketten. Diese kommen paarig vor und haben ein Molekulargewicht von 200 kDa. Sie bestehen aus einem C-Terminus, der den etwa 150 nm langen, α -helikal gewundenen, Schwanzbereich bildet und einem N-Terminus, der die globuläre Kopfstruktur ausbildet, in welcher die Aktinbindungsstelle und das aktive Zentrum zu finden sind, mit der Mg^{2+} -abhängigen, Aktin aktivierten, Myosin-ATPase. Diese schweren Ketten existieren in zwei Isoformen, SM1 bzw. SM2 (Nagai *et al.*, 1989;Babij & Periasamy, 1989). Außerdem kann in der Kopfreion durch alternatives Splicing, in der Nähe der Aktinbindungsstelle, eine Sequenz von sieben Aminosäuren eingefügt werden (Kelley *et al.*, 1993;Babij, 1993;White *et al.*, 1993), was die Querbrückenkinetik im Kontraktionsprozess verändert (Rovner *et al.*, 1997). Im Mausmodell wurde später bewiesen, dass ohne diese Insertion die Maximalkräfte und die Verkürzungsgeschwindigkeiten der glatten Muskelzellen deutlich geringer sind (Babu *et al.*, 2001).
2. Die regulatorischen, leichten Ketten (r-MLC). Auch diese kommen im Paar vor, sind am Kopf assoziiert und bilden den phosphorylierbaren Anteil des Myosins, womit sie

an der Regulation der Kontraktion beteiligt sind. Sie besitzen nur ein Molekulargewicht von 20 kDa.

3. Die essentiellen leichten Ketten (MLC_{17}) haben ein Molekulargewicht von 17 kDa, daher auch die Abkürzung MLC_{17} . Sie regulieren wahrscheinlich die Aktivität der Myosin-ATPase-Aktivität. Auch diese gibt es im Organismus wieder in 2 Isoformen die sich allerdings im isoelektrischen Punkt und nicht im Molekulargewicht unterscheiden, daher der Name MLC_{17a} und MLC_{17b} . Beide Isoformen kommen in jedem Gewebe vor, nur ihr Verhältnis zueinander verschiebt sich gewebespezifisch.

1.1.5.3 Intermediärfilament

Das Intermediärfilament liegt mit einem Molekulargewicht von etwa 100 kDa zwischen den anderen beiden und trägt daher den Beinamen Intermediär. Dies ist eine nicht kontraktile Komponente des Zytoskeletts und hat somit nichts mit der Verkürzung oder Kraftentwicklung der glatten Muskelzelle zu tun. Die Intermediärfilamente bestehen aus Desmin und Vimentin und verankern das Zytoskelett in den Dens plaques und den Dens bodies, zusammen mit den Integrinen der Plasmamembran. Somit bildet es die strukturelle Grundlage für die Kontraktion (Pavalko *et al.*, 1995; Sjuve *et al.*, 1998).

1.1.5.4 Rolle des Zytoskeletts für die myogene Reaktion

Die genaue Signaltransduktion, welche in glatten Muskelzellen, über das Zytoskelett, durch Erhöhung des transmuralen Druckes zu einer Kraftsteigerung führt, ist noch nicht bekannt. Aber es gibt mittlerweile ausreichend Hinweise, dass das Zytoskelett eine entscheidende Rolle bei der Kontraktion von glatter Muskulatur spielt. In Nichtmuskelzellen, wie Fibroblasten und Endothelzellen, erfolgt durch eine Umlagerung des Aktinzytoskeletts die Bildung von kontraktile Stressfasern (Cooper, 1991).

Warum kann man das System der Skelettmuskelzellen nicht einfach Eins zu Eins auf die glatten Muskeln übertragen?

- In glatten Muskelzellen ist die Ausrichtung der Myofibrillen eher chaotisch
- das Gleichgewicht von F-Aktin und G-Aktin ist eher 1:1 bzw. 2:1 in glatten Muskelzellen und 8:1 in quergestreiften Muskelzellen
- Die biochemische Regulation der Kontraktion in glatten Muskelzellen, die durch Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexbildung und Aktivierung der MLCK ausgelöst wird, unterscheidet sich deutlich von der, der Herz- oder Skelettmuskelzellen, aber ist ähnlich wie die, der kontraktile Stressfasern in Nichtmuskelzellen.

- Die gleichen Signalwege und Botenstoffe, die erwiesenermaßen die Dynamik der Aktin-Polymerisation und der Stressfaserbildung in Nichtmuskelzellen als Reaktion auf mechanische Reize regulieren, dienen der Mechanotransduktion und myogenen Reaktivität in glatten Muskelzellen (z.B. Phospholipid-Hydrolyse, Tyrosinkinase- und PKC-Aktivität, G-Protein-Aktivierung, Rho A, Calcium).

Die Erkenntnisse der letzten Jahre zeigen, dass eine Erhöhung des F : G-Aktin-Verhältnisses mit einer erhöhten Kraftproduktion in glatten Muskelzellen während der myogenen Reaktion einhergeht (Flavahan *et al.*, 2005;Gokina & Osol, 2002;Korn, 1982) .

Dies legt nahe, dass der Prozess der Aktin-Polymerisation notwendig ist für die myogene Kontraktion. Es ist wahrscheinlich, dass die Filamentneubildung wichtig für eine verstärkte Kraftproduktion, als Reaktion auf zunehmenden Druck, ist.

Daraus leiten sich folgende Erkenntnisse für das Zytoskelett im glatten Muskel ab.

Eine Erhöhung der Wandspannung führt zur Mechanotransduktion über die Zellmembran der glatten Muskelzellen. Diese hat eine Aktivierung von Signalwegen (z.B. Rho-A, PLC, PKC, Ca²⁺ etc.) zur Folge. Die Stimulation der Aktin-Polymerisation ist das Ergebnis (Erhöhtes F:G-Verhältnis) und so kommt es zur Bildung von kontraktile Stressfasern. Diese Aktinfilament- und kontraktile Stressfaserbildung erhöhen die Kraftproduktion der glatten Muskelzellen und dies führt in der Gesamtheit zu einer Abnahme des Durchmessers der Arterie und einem regulierten Blutfluss (Cipolla *et al.*, 2002).

Zusätzlich hat sich das Modell etabliert, nachdem aus dem Aktinpool ein großer Teil des Aktins submembranös polymersiert. Dies hat zur Folge, dass durch die Polymerisationsprozesse direkt unter der Zellmembran ein Netzwerk entsteht, welches zur Rigidität der Zellmembran beiträgt. Über dieses Netzwerk, wird die Kraft der kontraktile Elemente, welche am Querbrückenzyklus beteiligt sind besser auf die gesamte Oberfläche der Zelle übertragen (Tang *et al.*, 2005;Gunst & Fredberg, 2003;Zhang *et al.*, 2007;Tang *et al.*, 2005).

Kommt also ein oszillatorischer Reiz, aktiviert dies einen G-Protein gekoppelte Rezeptor in der Zellmembran, welcher eine Signalkaskade auslöst. Diese steuert die Anordnung des Aktingerüsts in der Zelle und die Ankopplung des Aktins an die extrazelluläre Matrix (Zhang & Gunst, 2006;Fultz *et al.*, 2000).

1.2 Rolle des Ca^{2+} bei der Kopplung von Erregung und Kontraktion

Im Skelettmuskel ist die Kopplung von Erregung und Kontraktion durch den Troponinkomplex geregelt. Dieser registriert die Änderung der Ca^{2+} -Konzentration und setzt die Aktin-Myosin Interaktion in Gang.

Im glatten Muskel ist die Kopplung etwas komplizierter, denn hier existiert eine indirekte Steuerung über mehrere Faktoren. Das Calmodulin (CaM), die Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK) und die regulatorischen leichten Ketten des Myosins (rMLC) interagieren hier miteinander.

1.2.1 Kopplung von Erregung und Kontraktion

Es existieren zwei Mechanismen die im glatten Muskel Erregung und Kontraktion koppeln, die elektromechanische, als auch die pharmakomechanische Kopplung. Beide Kopplungsarten sind an jeder Muskelkontraktion beteiligt, wenn auch nicht immer im gleichen Umfang.

1.2.1.1 Pharmakomechanische Kopplung

Unter diesem Begriff sind die Mechanismen zusammengefasst, die ohne eine Veränderung des Membranpotentials in der Lage sind, eine Kontraktion auszulösen. Hierfür stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Es können intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher geöffnet werden oder für einen Einstrom extrazellulären Ca^{2+} gesorgt werden.

Die intrazellulären Speicher werden über Agonisten aktiviert. Diese können z.B. an muskarinen Rezeptoren (M_1 , M_3 , M_5) oder an α_1 -adrenergen Rezeptoren andocken. Ist dies geschehen, wird eine G-Protein-Kaskade initialisiert, was zur Aktivierung der Phospholipase C führt. Diese greift am membranständigen Phosphatidyl-4,5-bisphosphat (PIP_2) an und spaltet dieses zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und 1,2-Diacylglycerol (DAG). Das IP_3 bindet dann an spezifische Rezeptoren in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums, was zu einer Öffnung von Ca^{2+} -Kanälen führt. Diese bleiben allerdings stets nur kurz geöffnet, da ihre Aktivität von zwei Faktoren begrenzt wird: zum Einen der zytosolischen Konzentration der Ca^{2+} -Ionen, die die Kanäle schließen, wenn eine Konzentration von ca. 500 nM erreicht wird, zum Anderen von der Zeit, die die Phosphatasen der Muskelzelle benötigen, um IP_3 zu dephosphorylieren.

Das DAG ändert nicht die Ca^{2+} -Konzentration und wird daher erst später genauer beschrieben. Kurz gesagt, es ist über die Proteinkinase C entscheidend an der Ca^{2+} -Sensitivierung der glatten Muskulatur beteiligt.

Für den Einstrom von extrazellulären Ca^{2+} -Ionen ohne eine Depolarisation werden ebenfalls Agonisten benötigt. Ein Beispiel ist Noradrenalin, welches über ein G-Protein und

Phosphorylierungskaskaden die Öffnungswahrscheinlichkeit von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen beeinflusst, so dass es sogar beim Ruhemembranpotential zu einem Ca^{2+} -Influx kommt (Übersicht bei Brown & Birnbaumer, 1990).

1.2.1.2 Elektromechanische Kopplung

Grundlage dieser Kopplung ist, wie es der Name schon verrät, ein elektrischer Reiz in Form einer Depolarisation. Hierbei ändert sich die elektrische Spannung der Zellmembran vom Ruhemembranpotential im Bereich von -70 bis -40 mV hin zu positiven Werten (Somlyo & Somlyo, 1994). Diese Depolarisation wird *in vivo* ausgelöst durch Agonisten wie zum Beispiel Carbachol oder Noradrenalin, welche an Rezeptoren der Membran der glatten Muskelzellen binden. In Experimenten ist es auch gelungen, eine Depolarisation auszulösen, indem man die extrazelluläre Kaliumkonzentration erhöhte. Die Reaktion, also die Kontraktion, fällt allerdings nicht so stark aus wie bei der Depolarisation durch Agonisten. Was den Verdacht auslöste, dass beim Agonisten-aktivierten Weg auch eine pharmakomechanische Komponente eine Rolle spielen könnte (Nelson *et al.*, 1988). Wie schon vorher beschrieben, sind üblicherweise bei jeder Kontraktion *in vivo* beide Kopplungswege beteiligt. Wird die Depolarisation ausgelöst, ganz gleich auf welche Weise, werden spannungsabhängige L- und T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle aktiviert und es kommt zum Einstrom von Ca^{2+} -Ionen (Ganitkevich & Isenberg, 1991). Dieser Einstrom führt dann zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und dies wiederum führt zur Kontraktion der Muskelzelle.

Auf Grund neuester Erkenntnisse und der Vollständigkeit halber sei hier noch ein weiterer Mechanismus der elektromechanischen Kopplung erwähnt. Es gibt die Cajal- bzw. Schrittmacherzellen. Diese kommen nicht in allen glattmuskulären Geweben des Körpers vor. Bislang wurden sie hauptsächlich in Hohlorganen des Intestinaltraktes beobachtet. Neuerdings fand man nun heraus, dass diese auch in der Gefäßmuskulatur auftreten (Harhun *et al.*, 2004; Pucovsky *et al.*, 2002). In diese Zellen strömen Kationen ein, bis die dadurch entstehende Depolarisation eine Schwelle überschreitet und ein Aktionspotential auslöst. Diese Erregung der Cajal-Zellen wird über noch weitgehend unbekannte Wege an das Muskelgewebe weitergeleitet. Dank der dort vorhandenen gap junctions erfolgt eine synchrone Kontraktion. Die Frequenz der Kontraktion kann auf Grund der Nachbarschaft der Schrittmacherzellen zu den vegetativen Nervenzellen, durch das vegetative Nervensystem moduliert werden.

1.2.1.3 Ca^{2+} -abhängige Phosphorylierung des Myosins

Bei der Kontraktion des glatten Muskels steigt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von ca. 100 nM auf 600-800 nM an (Somlyo & Himpens, 1989). Die intrazellulären freien Ca^{2+} -Ionen werden von Calmodulin (CaM) gebunden. Calmodulin ist ein 17 kDa schweres Protein mit zwei hochaffinen und zwei niederaffinen Ca^{2+} -Bindungsstellen. Nach der Bindung des freien Ca^{2+} bildet sich der $[\text{Ca}^{2+}]_4\text{-CaM}$ -Komplex ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) aus. Dieser aktiviert seinerseits die MLCK, welche das Myosin durch Phosphorylierung aktiviert, womit erst die Interaktion von Myosin und Aktin ermöglicht wird. Diese Stimulation des Querbrückenzyklus führt dann zur Kontraktion der glatten Muskulatur. Die Relaxation wird über den gleichen Mechanismus vermittelt. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration sinkt und das $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -MLCK-Holoenzym dissoziiert, wodurch die MLCK inaktiviert wird. Damit gewinnt die MLCP die Oberhand im Gleichgewicht von MLCK/MLCP, so dass r-MLC dephosphoryliert wird und der glatte Muskel entspannt.

Die r-MLC wird normaler Weise am Serinrest 19 phosphoryliert, aber unter besonderen Umständen kann dies zusätzlich am Threonin 18 geschehen. Unter diesen Umständen entstehen z.B. hohe Aktivierungszustände oder kurzfristige Stimulationen mit Rezeptoragonisten (Ikebe & Hartshorne, 1985; Ikebe *et al.*, 1986; Park & Rasmussen, 1986).

1.3 Modulation der Ca^{2+} -Sensitivität des Kontraktionszyklus

Auffällig ist bei verschiedenen Kontraktionen, dass die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration nicht in einem linearen Zusammenhang zur Phosphorylierung von r-MLC und zur Kontraktionskraft steht. Es gibt Substanzen wie das Thromboxanalogon U-46619, welches eine Kraftentwicklung bei geringer oder ohne Änderungen der Konzentration der freien intrazellulären Ca^{2+} -Ionen induziert (Bradley & Morgan, 1987; Himpens *et al.*, 1990). Dieses Beispiel verdeutlicht das Phänomen der Ca^{2+} -Sensitivierung (Übersicht bei Pfitzer *et al.*, 2001).

Es gibt zwei Hauptwege der Ca^{2+} -Sensitivierung. Der erste Typ hat eine Verschiebung des Aktivitätsgleichgewichts von MLCK/MLCP zur Grundlage. Das Verhältnis von Phosphorylierung der r-MCL und Kontraktion bleibt dabei gleich. Der zweite Weg funktioniert über Calponin und Caldesmon, die regulatorischen Proteine des Aktins. Hier kommt es im Gegensatz zum ersten Weg zu einer Veränderung des Verhältnisses von r-MLC-Phosphorylierung und Kraft der Kontraktion.

1.3.1 Typ 1: Verhältnis MLCK/MLCP

Der Phosphoryierungsgrad von r-MLC wird durch das Gleichgewicht von MLCK/MLCP geregelt. Verschiebt man es zu Gunsten der MLCK, erhält man bei gleichbleibender, intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration eine Verstärkung der Kontraktion. Umgekehrt gilt natürlich das Selbe. Überwiegt die MLCP wird die Kontraktion abgeschwächt, bei gleichbleibender intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration.

1.3.1.1 Beeinflussung der MLCK-Aktivität

Die MLCK ist primär abhängig von der Ca^{2+} -Konzentration, kann aber zusätzlich von Phosphorylierungsereignissen reguliert werden. Hauptsächlich wird die MLCK inhibitorisch reguliert.

Die MLCK kann durch die cAMP-abhängige Kinase (PKA) (Conti & Adelstein, 1981), die Proteinkinase C (PKC) (Nishikawa *et al.*, 1985) und die Ca^{2+} /CaM-abhängige Proteinkinase II (CaM-KII) (Hashimoto & Soderling, 1990; Ikebe & Reardon, 1990) beeinflusst werden. Eine Phosphorylierung an der so genannten Position A, an einem in der Nähe der CaM-Bindungsstelle liegenden Serinrest, führt zu verminderter Affinität der Kinase zu Ca^{2+} /CaM. So erfolgt eine Desensitivierung; bei konstanter Ca^{2+} -Konzentration wird eine kleinere Kontraktionskraft erzeugt. *In vitro* funktioniert dieses Prinzip mit allen drei erwähnten Kinasen. *In vivo* existiert zurzeit noch eine widersprüchliche Datenlage zur PKA. Nach Miller (Miller *et al.*, 1983) führt eine Stimulierung mit β -adrenergen Agonisten zur Erhöhung des cAMP-Spiegels, jedoch konnte er keine vermehrte Phosphorylierung der MLCK feststellen. Im Gegensatz dazu steht die Arbeit von de Lanerolle *et al.* (Lanerolle, 1984), welche die cAMP-Synthese stimulierten und eine Inkorporation von radioaktiv markiertem Phosphat in der MLCK registrierten.

Die Phosphorylierung der MLCK durch CaM-KII ist *in vitro* und *in vivo* mit physiologischer Relevanz belegt (Übersicht bei Gallagher *et al.*, 1997).

Weiterhin wurde gefunden, dass die mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK) und die Cyclin-abhängige Kinase I (CDK1) *in vitro* die MLCK an einem anderen Aminosäurerest, außerhalb der Ca^{2+} /CaM-Bindungsstelle, phosphorylieren. Dort erhöhen sie die ATPase-Aktivität der MLCK (Morrison *et al.*, 1996).

Die MLCK besitzt zwar noch weitere Phosphorylierungsstellen, welche aber keinen Einfluss auf die Bindungsaffinität der MLCK zu Ca^{2+} /CaM haben. Die physiologische Bedeutung dieser Bindungsoptionen ist noch nicht geklärt.

1.3.1.2 Beeinflussung der MLCP-Aktivität

Es gibt drei Wege, die MLCP zu inhibieren und so die Sensitivität für Ca^{2+} -Ionen zu steigern.

- 1.) Die Rhokinase (ROK) ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase und kann durch die GTPase RhoA aktiviert werden. Sie scheint entscheidend an der Regulation der MLCP-Aktivität beteiligt zu sein. Seit 1992 ist bekannt, dass das nicht hydrolysierbare GTP-Analogon $\text{GTP}\gamma\text{S}$ im glatten Muskel, durch Hemmung der MLCP zu einer Erhöhung der Ca^{2+} -Sensitivität führt (Kubota *et al.*, 1992). Der durch $\text{GTP}\gamma\text{S}$ ausgelöste Effekt, über eine subsequente Aktivierung von RhoA und ROK, wurde *in vitro* (Kimura *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1999a; Pfitzer & Arner, 1998) und an permeabilisierten, glatten Muskelpräparaten (Otto *et al.*, 1996; Kureishi *et al.*, 1997) nachgewiesen. Jüngere Studien zeigen, dass die Phosphorylierung der MYPT1 durch die ROK zu einer Dissoziation der katalytischen Untereinheit der MLCP führt (Shin *et al.*, 2002). Dies bedeutet eine geringere Aktivität der MLCP. Der Dissoziation geht die Translokation der MLCP von der Membran voraus. Ihr folgt der Anstieg der r-MLC-Phosphorylierung. Das bewirkt stärkere Kontraktionen bei gleicher intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration. MYPT1 ist eine von 3 Untereinheiten der MLCP, welche mittels spezifischer Bindungsstellen für die Lokalisierung des Holoenzym an der MLCP sorgt.
- 2.) Beim Arachidonsäure-Typ der Sensitivierung handelt es sich um einen ähnlichen Weg wie beim ROK-Typ. Arachidonsäure wird durch G-Protein-vermittelte Aktivierung der Phospholipase A_2 in der Zellmembran synthetisiert und gilt nicht nur im Muskel als Botenstoff. Die Inhibierung der MLCP erfolgt durch Bindung der Arachidonsäure an die MYPT1 und die damit verbundene Dissoziation des Holoenzym. Außerdem aktiviert sie die ROK (Feng *et al.*, 1999b) und somit den schon beschriebenen ersten Weg. Diese Prozesse führen wieder zu einer vermehrten Phosphorylierung der r-MLC und dies wiederum zu einer verstärkten Kontraktion (Gong *et al.*, 1992). Agonisten dieses Signalwegs, z.B. Phenylephrin, steigern die Arachidonsäurekonzentration und erhöhen somit auch die Sensibilität der kontraktilen Proteine für freie Ca^{2+} -Ionen (Gong *et al.*, 1995).
- 3.) Der dritte Weg, der Weg der Proteinkinase C, wird durch Phorbolster (PDBu) und Diacylglycerin (DAG) aktiviert, welcher auch zu einer Erhöhung der Phosphorylierung der r-MLC führt und somit zur verstärkten Kontraktion (Itoh *et al.*, 1993). An Nierenarterien des Hundes konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung des transmuralen Drucks zu einer Konzentrationserhöhung des Diacylglycerins führte

(Narayanan *et al.*, 1994). Die Arachidonsäure kann auch diesen Weg, über eine atypische Isoform der PKC, aktivieren (Gailly *et al.*, 1997). Das wichtige Substrat der PKC ist CPI-17. Für dieses Protein hat sich gezeigt, dass es in seiner phosphorylierten, aktivierten Form Proteinphosphatasen vom Typ I inhibiert, wozu auch die MLCP zählt (Eto *et al.*, 1995). Diese Daten wurden von Kitazawa (Kitazawa *et al.*, 1999) für den glatten Muskel bestätigt. Auch hier ist wieder der Zusammenhang zu den anderen Wegen zu sehen, denn ROK-Inhibitoren und PKC-Inhibitoren sorgen beide für eine Hemmung der Phosphorylierung der CPI-17.

Auch der gegenteilige Effekt, eine Desensibilisierung für Ca^{2+} -Ionen, ist an der MLCP möglich. Durch cGMP und die Proteinkinase G (PKG) konnte dieser Effekt im glatten Muskel gezeigt werden (Pfitzer *et al.*, 1986; Nishimura & van, 1989; Savineau & Marthan, 1994). Für Gefäße wurde von Lee *et al.* (Lee *et al.*, 1997) der cGMP regulierte PKG-Weg nachgewiesen. Die PKG könnte RhoA hemmen und so der RhoA-vermittelten Ca^{2+} -Sensitivierung entgegen wirken (Sauzeau *et al.*, 2000). Diese Signalkaskade ist jedoch in ihren Details noch nicht zweifelsfrei aufgeklärt.

1.3.2 Typ 2: Verhältnis Phosphorylierung/Kontraktionskraft

Unter verschiedenen Bedingungen kann es zu einer Dissoziation von Phosphorylierung der r-MLC und Kontraktionskraft kommen. Die Folge ist, dass sich trotz niedriger Phosphorylierung hohe Kraft entwickelt (Übersicht bei Kamm & Stull, 1985). Zum Beispiel bleibt bei lang anhaltender Aktivierung des glatten Muskels die Kraft erhalten, obwohl die r-MLC-Phosphorylierung mit der Zeit auf fast basale Werte absinkt.

Um dieses Phänomen zu erklären, existieren zwei Modelle. Das Erste ist von Hai und Murphy (Hai & Murphy, 1989). Danach erfolgt zunächst die normale Ca^{2+} -induzierte, MLCK-abhängige Anheftung von phosphorylierten, Kraft generierenden Querbrücken. In der Folge kommt es zu einer Dephosphorylierung von r-MLC durch die MLCP, was zu einer Dissoziation der dephosphorylierten Querbrücken führt. Dieser Prozess läuft aber so langsam ab, dass die dephosphorylierten Querbrücken die noch phosphorylierten weiter unterstützen. Dieser Zustand wurde als „latch-Zustand“ oder Sperrzustand definiert.

Das andere Modell ist von Himpens (Himpens *et al.*, 1988). Er nannte es das Kooperativitätsmodell. Er geht davon aus, dass die phosphorylierten Querbrücken sich an das Aktin binden und dabei auch eine Bindung der dephosphorylierten Querbrücken ermöglichen. Das bedeutet, die Gesamtkraft wird aus allen Querbrücken generiert. Als eventuelle Regulatoren kommen Calponin (Malmqvist *et al.*, 1997) und Caldesmon (Albrecht *et al.*, 1997) in Frage.

1.3.2.1 Calponin

Es wurde 1988, als ein dem Troponin T verwandtes Protein, in der Gefäßmuskulatur entdeckt (Takahashi *et al.*, 1988). Dieses 32 kDa schwere Protein bindet an skelettales Troponin C, aber auch an Aktin, Tropomyosin, Myosin und Calmodulin des glatten Muskels. Durch die hohe Anzahl an Bindungspartnern ist es gut als ein Regulator der Kontraktion des glatten Muskels geeignet. *In vitro* konnte 1990 eine inhibierende Wirkung des Calponin auf die Aktin-aktivierte Myosin-ATPase-Aktivität gezeigt werden (Winder & Walsh, 1990). Wird Calponin phosphoryliert, führt dies zur Inhibierung der Anlagerung des Calponin an F-Aktin und wirkt damit inhibierend auf die Kontraktion des glatten Muskels. Als Kinasen kommen dabei verschiedenste Kandidaten in Frage: die PKC, CaM-KII (Winder & Walsh, 1990) und ROK (Kaneko *et al.*, 2000). *In vitro* wurde diese Phosphorylierung jedoch nicht in allen glattmuskulären Geweben nachgewiesen. Diese Diskrepanz ist bisher noch ungeklärt. Vermutungen gehen in die Richtung der variablen zellulären Lokalisation in den einzelnen Geweben; während der Stimulation des Muskels findet eine Translokation des Calponins vom kontraktilen in den zytoskelettären Bereich statt (Parker *et al.*, 1994). Am Beginn der Agonistenstimulation transloziert Calponin an die Plasmamembran und ist dort co-lokalisiert mit der extrazellulär-regulierten Proteinkinase und der PKC (Menice *et al.*, 1997). Trotz all dieser Indizien bleibt der genaue Mechanismus der Wirkung des Calponins bei der Regulation der Kontraktion des glatten Muskels weiterhin ungeklärt.

1.3.2.2 Caldesmon

Dieses 93 kDa schwere Protein wurde 1981 entdeckt und bindet an Myosin, Aktin, Tropomyosin und Ca^{2+} /CaM. Der Name Caldesmon leitet sich vom Calmodulin ab, an welches es bei der Entdeckung gebunden war, und dem griechischen Wort Desmos = binden (Sobue *et al.*, 1981). Caldesmon kann über die Bindung an Aktin die Interaktion mit dem Myosin hemmen, die Aktin-aktivierte Myosin-ATPase-Aktivität senken und somit die Kontraktion des glatten Muskels inhibieren. Bei Inkubation der Muskulatur eines Hühnerkaumagens mit Caldesmon kam es zur Relaxation (Szpacenko *et al.*, 1985). Caldesmon inhibiert somit die Kraft bei gleichbleibender Phosphorylierung von r-MLC (Pfitzer *et al.*, 1993).

Einen weiteren Hinweis für die These, dass Caldesmon ein Regulator der Kontraktion des glatten Muskels ist, lieferte folgendes Experiment. Die Arteria Carotis des Schweins, welche durch spezielle Behandlung reversibel permeabilisiert wurde, ist mit Antisense-Oligodesoxynucleotiden gegen die Startregion der mRNA für Caldesmon beladen worden.

Dadurch sank der Caldesmonspiegel und der basale Tonus des Gefäßes stieg (Earley *et al.*, 1998).

Der hemmende Effekt des Caldesmons kann Ca^{2+} -abhängig und durch Phosphorylierung aufgehoben werden. Die Ca^{2+} -abhängige Bindung des Calmodulins über $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ an das Caldesmon führt zu einer verringerten Affinität des Caldesmons zu Aktin; so kann es zu der Konformationsänderungen kommen, die die Aktin-Myosin-Interaktion ermöglicht. Auch die Aktivität der Aktin-aktivierten Myosin-ATPase sinkt dann nicht ab. Ob *in vivo* aber so hohe Konzentrationen von Ca^{2+} wirklich erreicht werden, wie in den Versuchen nötig, bleibt fraglich.

Die Phosphorylierung des Caldesmons kann *in vitro* durch eine große Zahl an Kinasen erfolgen: die $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ abhängige Proteinkinase II (Ikebe & Reardon, 1990), die Proteinkinase C (Vorotnikov, 1997), die cdc2-Kinase (Yamashiro *et al.*, 1990; Yamashiro *et al.*, 1991), die p21-aktivierte Proteinkinase 3 (Foster *et al.*, 2000) und die mitogen-aktivierte Proteinkinase (Childs *et al.*, 1992). *In vivo* wurde bisher aber nur die MAPK ernsthaft diskutiert. Nach Agonisten-induzierter Stimulation der ERK-Signalkaskade wird Caldesmon an den gleichen Stellen phosphoryliert, wie bei den *in vitro* Experimenten gezeigt (Adam & Hathaway, 1993). Jedoch konnten keine Effekte bei der Inkubation eines permeabilisierten Muskels mit Caldesmon gefunden werden (Gerthoffer *et al.*, 1996; Nixon *et al.*, 1995).

Es gibt also viele Hinweise aber keine eindeutigen Beweise für die regulatorischen Eigenschaften von Caldesmon beim Kontraktionszyklus der glatten Muskulatur.

1.4 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit soll die Hypothese untersucht werden, dass das Zytoskelett einen Einfluss auf den myogenen Tonus der Gefäße unter pulsatilem Drücken hat. Hierfür wurden folgende Punkte untersucht.

- Reaktion der zu untersuchenden Gefäße auf Druckschwankungen und Erarbeiten eines Versuchprotokolls
- Vergleich der Auswirkungen der verschiedenen Druckdarbietungsformen (statisch / pulsatil)
- Bestimmung einer Beteiligung des Zytoskeletts an der Entwicklung des myogenen Tonus
 - Durch Hemmung des Zytoskeletts (mittels Cytochalasin D)
 - Durch Verstärkung des Zytoskeletts (mittels Jasplakinolide)
- Untersuchung der Reversibilität der Cytochalasinwirkung durch Jasplakinolide
- Vergleich der Ergebnisse von der Arteria Cerebellaris superior mit der Arteria Gracilis.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Für die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden Ratten als Versuchstiere ausgewählt. Um gleiche Bedingungen zu gewährleisten, wurden ausschließlich Ratten des Wistar Stamms genutzt. Des Weiteren waren alle Ratten männlich, um Einflüsse zu vermeiden, die eventuell durch den Hormonzyklus weiblicher Ratten entstünden. Die verwendeten Ratten waren zwischen 16 und 25 Wochen alt und wogen zwischen 350 g und 400 g. Auch die Haltung der Ratten wurde so gut wie möglich normiert, indem bestimmte Rahmenbedingungen festgelegt wurden. So lebten die Tiere in einem Raum, der mit einem elektronisch geregelten 12-Stunden Tag-Nachtzyklus ausgestattet war. Dort herrschte eine konstante Temperatur von 22°C. Alle Versuchstiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser in ihren 50 x 30 cm großen Käfigen, die sie mit 1 bis 2 weiteren Tieren teilten. Die Tötung wurde standardisiert, um möglichst gleiche Rahmenbedingungen zu schaffen. Hierfür wurden die Ratten mechanisch mit einer Metallstange, oder chemisch mit Hilfe von Diethyl-Ether betäubt. Im Anschluss folgte die Enthauptung des Tieres unter Zuhilfenahme einer Ratten-Guillotine. Dann wurde mit der Präparation begonnen.

2.1.2 Lösungen

Präparierlösung: 145 mM NaCl; 4,5 mM KCl; 1,2 mM NaH₂PO₄; 1,0 mM MgSO₄;
0,1 mM CaCl₂; 0,025 mM (Na)EDTA und 5 mM HEPES, pH =7,4

Versuchslösung: 120 mM NaCl; 4,5 mM KCl; 1,2 mM NaH₂PO₄; 1,0 mM MgSO₄;
1,6 mM CaCl₂; 0,025 mM (Na)EDTA; 5,5 mM Glukose; 26 mM
NaHCO₃ und 5 mM HEPES, pH = 7.4

Lösung III: 120 mM NaCl; 4,5 mM KCl; 1,2 mM NaH₂PO₄; 1,0 mM MgSO₄;
0,025 mM (Na)EDTA; 5,5 mM Glukose; 26 mM NaHCO₃ und 5 mM
HEPES, pH = 7.4

2.1.3 Spezielle Chemikalien

Cytochalasin D: Calbiochem

Jasplakinolide: Calbiochem

Noradrenalin: Sigma

Acetylcholin: Sigma,

Serotonin: Sigma

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation der A. Gracilis

Für diese Arbeit wurde die Arteria Gracilis genutzt. Um an dieses Gefäß zu kommen, musste nach der Tötung des Tieres das Fell über der Leistengegend mit einer Schere entfernt werden. Daraufhin wurde in diesem Gebiet, entlang der Beinmuskeln, in die Tiefe präpariert, bis das Leistenband sichtbar wurde. Anschließend konnte das Bein direkt am Hüftgelenk mit einer Schere abgesetzt werden, wobei darauf zu achten war, dass die Arteria Gracilis nicht in die Schnittebene geriet. Das so erhaltene Bein wurde in eine Präparationskammer mit Gelboden gelegt, wo es mit 3 Präparationsnadeln im Gelboden der Präparationskammer fixiert wurde. Die Kammer enthielt die Präparierlösung, welche in der Zusammensetzung im Punkt Lösungen bereits beschrieben wurde. Nachdem die Kammer unter ein Mikroskop mit Kaltlichtquelle gebracht wurde, konnte mit dem eigentlichen Präparieren begonnen werden. Hierfür standen eine Irisschere und zwei feine Pinzetten (Dumont Nr. 5) zur Verfügung. Unter dem Mikroskop wurde die Arteria Gracilis aufgesucht, welche bei kompletter Relaxation einen Innendurchmesser von 175-275 μm aufweist. Zum Auffinden des Gefäßes verfolgt man die gut sichtbare Arteria Femoralis vom Hüftgelenk abwärts und findet als ersten Abgang die Arteria Gracilis. Anfangs verläuft diese noch oberflächlich und verschwindet später unter der Muskelfaszie des Musculus Gracilis. An dieser Stelle wurde mit der Präparation begonnen, indem der Muskel etwas oberhalb und unterhalb des Verlaufes der Gefäße aufgeschnitten und die Gefäßnervenstraße freigelegt wurde. Um die Gefäße unter dem Musculus Gracilis verwenden zu können, musste das Bindegewebe und Teile des Nervus Gracilis abgetragen werden. Auf diese Art und Weise ließen sich die Arterie und Vene gut darstellen. Die Vene wurde entfernt und dabei auch die restlichen Bindegewebeanteile von der Arteria Gracilis. Bei der gesamten Präparation musste man äußerste Vorsicht walten lassen, da schon kleinste Berührungen mit den Präparationsinstrumenten die kontraktile Eigenschaften des Gefäßes beeinflussen können. Besonders Kräfte, die in longitudinaler Richtung wirken, sind prädisponiert dafür, einen negativen Effekt auf die Funktionsfähigkeit der Arterie auszuüben. Um die Dichtigkeit der Arteria Gracilis zu gewährleisten musste während der Präparation gesondert auf Abgänge geachtet werden. Als Letztes wurde die freiliegende Arterie proximal und distal abgesetzt, wobei die Gefäße sich bis auf 50 % der Ausgangslänge verkürzten.

Anschließend wurde die Arterie in eine vorbereitete Messkammer umgesiedelt und es konnte mit dem Einspannen des Gefäßes in die Messkammer begonnen werden.

2.2.2 Präparation der A. Cerebellaris superior

Um an das Gehirn zu kommen, musste am abgetrennten Kopf des getöteten Versuchstieres die Schädeldecke freigelegt werden, in dem mit einer Schere das Fell am Schädeldach entfernt wurde. Die Schädeldecke wurde zunächst einmal quer, von Auge zu Auge und dann zweimal längs, von den Anfangs- und Endpunkten des Querschnitts nach hinten, aufgeschnitten. Mit einer Pinzette wurde der herausgeschnittene Knochen entfernt. Durch weitere Schnitte ist die Öffnung soweit vergrößert worden, bis das Gehirn vollständig frei lag. Ein Spatel wurde unter den anterioren Anteil des Gehirns geschoben und das Gehirn so nach oben geklappt. Dabei wurden Stück für Stück die Gehirnnerven gekappt. Nachdem das Gehirn komplett den Schädel verlassen hatte und nur noch über den Hirnstamm mit dem Kopf verbunden war, wurde dieser mit einer Schere möglichst distal durchtrennt und das Gehirn in ein Becherglas mit Präparierlösung gegeben. Die bis hierhin beschriebenen Schritte mussten unter äußerster Vorsicht erfolgen, da die Gefäße im Gehirn nicht von Bindegewebe umgeben sind und direkt mit Hirnhäuten verklebt sind. Daher sind die Gefäße beim Präparieren des Gehirns auch besonders leicht zu überdehnen.

Das freie Gehirn konnte jetzt in eine Präparierkammer mit Gelboden überführt werden. Zum Befestigen wurden zwei Präpariernadeln genutzt, die in den Gelboden gesteckt werden konnten. Die Kammer wurde unter ein Mikroskop mit Kaltlichtquelle verbracht und dort auch alle weiteren Schritte durchgeführt. Auch hier wurde mit den zwei Pinzetten (Dumont Nr. 5) und der Irisschere gearbeitet. Um die Arteria Cerebellaris Superior zu präparieren, konnte die Arteria Basilaris aufgesucht und bis zum Circulus arteriosus cerebri (Willis) verfolgt werden, dort gingen die beiden Arteriae Cerebellaris Superiores ab. Zum frei Präparieren war nur die Hirnhaut von der Arterie abzulösen und die zahlreichen Abgänge zu durchtrennen. Auch diese Schritte mussten wieder unter Vorsicht erfolgen, um das Gefäß nicht zu überdehnen, oder das Gefäß mit den Präparationsinstrumenten nicht zu berühren, da schon kleinste Berührungen die kontraktile Eigenschaften des Gefäßes beeinflussen. Der letzte Schritt beinhaltete nur noch das Absetzen der Arterie am proximalen und distalen Ende. Hierbei verkürzt sich auch dieses Gefäß bis auf 50 % der Ausgangslänge. Mit dem Umsiedeln der Arteria Cerebellaris Superior in die Messkammer war dieser Teil des Versuchs abgeschlossen und es konnte mit dem Einspannen des Gefäßes in die Messkammer begonnen werden.

2.2.3 Einspannen des Präparates in die Messkammer

Die Messkammer wurde mit kalter Versuchslösung gefüllt und dadurch entsprechend gekühlt. Beim Befüllen war darauf zu achten, dass die Glaspipetten luftfrei aufgefüllt waren. Zum Herstellen der Glaspipetten wurden Borosilikatkapillaren (WPI) von 2mm Durchmesser in ein Ziehgerät (Narishige) eingespannt, im mittleren Bereich erhitzt und in die Länge gezogen. Dadurch entstanden 2 Pipetten mit sich verjüngenden Enden, von etwa 180 µm Durchmesser. Nun wurde die so entstandene Glaspipette über einer Glühwendel an der Spitze rund geschmolzen, damit die scharfe Bruchstelle nicht die Arterie während des Auffädels durchstößt. Der Aufbau der Messkammer verlangte, die Pipetten circa 10 mm hinter der Spitze über einer offenen Flamme zu erwärmen und um 90° zu biegen, wobei ihre Durchgängigkeit erhalten bleiben musste. In die vorbereitete Messkammer konnten die Arterien aus dem Präparationsgefäß überführt werden. Unter dem Mikroskop wurde die Arterie mit Hilfe zweier Pinzetten auf eine der beiden Glaspipetten geschoben. War dies erfolgt, konnte die Arterie mit zwei ophthalmologischen Fäden (Prolene, Ethicon 10-0) befestigt werden. Durch das Abschneiden des Gefäßes trafen die Enden der Arterie aufeinander und verklebten. Daher musste das zweite Ende der Arterie mit den beiden Pinzetten vorsichtig wieder eröffnet werden, bevor man über die erste Glaspipette die Arterie mit Versuchslösung durchspülen konnte. Dieser Vorgang diente dazu, das Gefäß von Blutresten zu reinigen. Als nächster Schritt wurde das freie Ende der Arterie auf die verbleibende Glaspipette aufgezogen und mit zwei weiteren ophthalmologischen Fäden befestigt. Die Messkammer war somit vollständig vorbereitet und konnte auf dem Mikroskoptisch angebracht werden, der für das Experiment benutzt wurde.

2.2.4 Durchführung der Messung

Für diese Arbeit war der Innendurchmesser der Arterie der Messparameter zur Charakterisierung der kontraktile Reaktionen des Gefäßes. Die Arterie wurde unter einem Mikroskop betrachtet, wobei das Bild durch eine Digitalkamera (Watec Wat-502B) und eine Framegrabber-Karte auf den PC übertragen wurde. Hier ermittelte dann ein spezielles Programm (HaSoTec) an Hand der Kontrastunterschiede zwischen Lumen, Gefäßwand und Lösung den inneren und äußeren Durchmesser. Um eine korrekte Messung zu garantieren, wurde das System mit einem Mikroskopmikrometer kalibriert, wobei eine Messgenauigkeit von 2 µm pro Pixel erreicht wurde. Auch die Frequenz der Datenaufzeichnung ist individuell an den Versuchsablauf angepasst worden. Die Daten sind dank des speziellen Computerprogramms zeitgleich erfasst und als ASCII File gespeichert wurden. Diese Daten

konnten mit einem im Institut erstellten Makro, in EXCEL-Dateien umgewandelt und dargestellt werden, um schließlich den Versuch durch einen Ausdruck dokumentieren zu können.

2.2.5 Versuchsablauf

Nachdem die Messkammer auf dem Mikroskoptisch befestigt war, konnte diese an eine Peristaltikpumpe angeschlossen werden, so dass das Gefäß fortwährend von frischer Versuchslösung umströmt wurde. Durch dieses System wurden 2 ml Versuchslösung pro Minute durch die Messkammer gepumpt. An die Zuleitung war eine Spritzenpumpe angeschlossen, über die Substanzen in die Versuchslösung appliziert werden konnten. Durch Einstellung einer konstanten Pumpgeschwindigkeit entstand eine berechenbare Verdünnung. Bei einer Geschwindigkeit von 2 ml pro Minute durch die Peristaltikpumpe und 20 µl pro Minute durch die Spritzpumpe, ergab sich ein Verhältnis von 1/100, also eine Verdünnung von 10^{-2} . Eine der Glaspipetten wurde an ein Schlauchsystem angeschlossen, welches zu einem Ventil führte. Dieses Ventil verwaltete 2 Flüssigkeitsreservoirs mit 60 mmHg Druck-Differenz. Das Ventil konnte in einer vorgegebenen Frequenz zwischen beiden Reservoirs umschalten, um den physiologisch schwankenden Blutdruck zu simulieren. Der transmurale Druck der Arterie wurde durch die Höhenniveaus der Flüssigkeitssäulen über dem Gefäß reguliert. Die zweite Pipette wurde durch ein blindes Schlauchstück verschlossen und der Druck anschließend auf 80 mmHg gesetzt. Zur Überprüfung der Dichtigkeit der Arterie befand sich noch eine waagerechte Pipette im Schlauchsystem, in die eine Luftblase eingebracht wurde. Ein Wandern der Luftblase würde somit einen möglichen Fluss aufzeigen und war ein Abbruchkriterium für die Versuche. Die Erhöhung des Drucks auf 80 mmHg führte zu einer Ausdehnung der Arterie, sowohl longitudinal als auch radial. Deshalb musste die Arterie mittels einer Mikrometerschraube in Längsrichtung gespannt werden. Allerdings sollte sie dabei nicht überdehnt werden. Hierbei nahm das Gefäß in etwa wieder die Länge ein, die es inne hatte, bevor es in situ durchtrennt wurde. Als Letztes musste die Messkammer nur noch an ein Heizsystem angeschlossen werden. Es wurde ein möglichst optimaler Kontrast mit der Fokusstellschraube am Mikroskop gewählt. Ebenso ist der Messbereich festgelegt wurden und die Aufzeichnung konnte gestartet werden. Daraufhin wurden eine Temperatursonde und eine pH-Elektrode in die Messkammer zur Überwachung eingebracht und die Heizung aktiviert. Hierbei wurde eine Abweichung der Temperatur um 0,5 °C in beide Richtungen, von 37 °C ausgehend, toleriert. Sollte der pH-Wert während der Messung von 7,4 um mehr als 0,05 abweichen, konnte durch tropfenweise Applikation von 1M HCl bzw. 1 M NaOH in den Vorratsbehälter, dieser wieder korrigiert werden. Nach 20 Minuten

war das Gefäß an die Umgebung gewöhnt und es konnte mit der Überprüfung der Gefäßvitalität begonnen werden. Das erste Kriterium war der myogene Tonus.

Der myogene Tonus beschreibt die momentane, relative Konstriktion des Gefäßes während des Experimentes, bezogen auf den absolut passiven Zustand in Ca^{2+} freier Versuchslösung bei gleichen Druckverhältnissen und sonst identischen Versuchsverhältnissen.

Der myogene Tonus ist mathematisch wie folgt definiert:

$$\text{Myogener Tonus} = 1 - \text{dia}_{\text{akt}} / \text{dia}_{\text{max}}$$

$\text{dia}_{\text{max}} \hat{=} \text{maximaler Gefäßdurchmesser in } \text{Ca}^{2+}\text{-freier Lösung bei gleichem Druck wie zum Zeitpunkt des Experiments,}$

$\text{dia}_{\text{akt}} \hat{=} \text{aktueller Gefäßdurchmesser zu einem gegebenen Zeitpunkt des Experimentes}$

Hierbei sollte sich der Durchmesser auf 85 % des maximalen Durchmessers verringern. Am Ende des Versuches wurde das Gefäß mit kalziumfreier Lösung (Lösung III) umspült, um so den exakten maximalen Durchmesser, relativ zu den im Experiment verwendeten Drücken, zu ermitteln. Zur weiteren Überprüfung der Vitalität ist durch die Spritzenpumpe 10^{-7} M Noradrenalin bzw. Serotonin dem Gefäß zugeführt worden. Auf diese Weise ließ sich die Gefäßkontraktilität testen. Dabei sollte sich der Gefäßdurchmesser um nicht weniger als 12 % verringern. Nach zwanzigminütigem Auswaschen wurde Acetylcholin in einer Konzentration von 10^{-6} M über die Spritzpumpe zugeführt, um auch die Endothelfunktion zu prüfen. Hierbei sollte eine vollständige Dilatation erfolgen. Zum Schluss wurde noch die myogene Reaktion mittels einer Druckreihe von 40, 80, und 120 mmHg für jeweils 5 Minuten getestet. Anschließend wurde sooft eine Druckreihe mit oszillierendem Druck durchgeführt, bis sich annähernd gleiche Durchmesserplateaus eingestellt haben. Damit wurde gewährleistet, dass über den Versuchsverlauf möglichst geringe Abweichungen in den zu untersuchenden Reaktionen auftreten. Waren alle Bedingungen zur Zufriedenheit erfüllt, konnte mit dem nächsten Versuchsteil begonnen werden.

Es wurde der myogene Index verwendet, um die myogenen Antworten der einzelnen Versuche untereinander zu vergleichen. Dieser beschreibt den Anstieg der Druck- / Durchmesserkurve bei Änderung des Drucks von 40 auf 80 mmHg und von 80 auf 120 mmHg. Ist der Anstieg positiv, ist es auch der myogene Index. Das bedeutet, wenn die Arterien sich aufdehnten, als Reaktion auf den Druckanstieg, verhalten sie sich passiv. Bei

Kontraktion als Reaktion auf den Druckanstieg ist der myogene Index negativ. Als mathematische Formel ausgedrückt ergibt sich folgender Terminus:

$$\text{Myogener Index}_{40 \rightarrow 80} = (\text{dia}_{80} / \text{dia}_{40} - 1) / \Delta P_{40 \rightarrow 80}$$

2.2.6 Statistik

Alle angegebenen Daten verstehen sich als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM). Pro Ratte wurde jeweils nur ein Gefäß verwendet, so dass n der Anzahl der Ratten entspricht. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe von SPSS 15.0 für Windows erstellt. In Abhängigkeit vom Versuchsdesign ist der T-Test oder eine ANOVA mit Messwiederholung angewendet worden. Zur Bestimmung der Signifikanzgrenze wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,05$ zugrunde gelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Myogene Reaktivität kleiner Arterien bei statischem und pulsatilem Druck

Die Untersuchung der myogenen Reaktivität kleiner Arterien erfolgte auf zwei Weisen (Abb. 1). Einerseits wurde der Druck stufenweise von 40 über 80 auf 120 mmHg verändert, wobei der Druck für 5 Minuten auf jedem Niveau belassen wurde (statischer Druck), dies ist die Zeit, die notwendig war, um einen neuen stabilen Gefäßdurchmesser zu erhalten. Andererseits wurde pulsatile Druck mit einer Amplitude von 60mmHg appliziert, dessen Mittelwert stufenweise von 40 über 80 auf 120 mmHg verändert wurde.

Abb.1

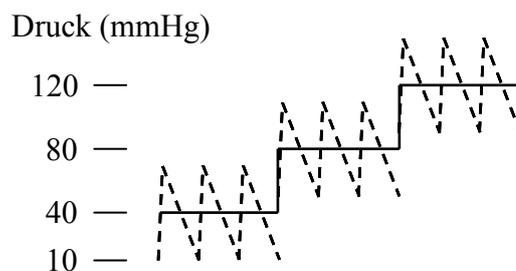


Abbildung 1: Schema der Protokolle der Applikation des transmuralen Drucks als statische Druckreihen bzw. als pulsatile Druckreihen, die im Mittelwert den statischen Druckreihen entsprechen.

In Abbildung 2 ist die Reaktion der Arteria Cerebellaris superior auf Veränderungen des statischen Drucks gezeigt. Nach der Absenkung des Drucks von 80 auf 40 mmHg verringert sich der Gefäßdurchmesser zunächst. Diese Reaktion tritt auf, da das Gefäß noch eine Kraft entwickelt, um einem Druck von 80 mmHg zu widerstehen, wobei der Druck aber nur noch 40 mmHg beträgt. Anschließend nimmt die Kontraktionskraft auf Grund des reduzierten Stimulus, des Drucks bei 40 mmHg, ab, wodurch es zu einer Gefäßdilatation kommt. Nun erfolgte ein Drucksprung von 40 auf 80 mmHg. Zuerst kam es zu einer Vergrößerung des Durchmessers, da das Gefäß dem erhöhten Druck zunächst keine entsprechende Kraft entgensetzen konnte. Dann aber führt der erhöhte Druck zur Entwicklung eines myogenen Tonus, was in einer Abnahme des Durchmessers zu sehen ist. Nach 3 bis 5 Minuten wurde ein stabiler Durchmesser erreicht, der in den folgenden Druck-Durchmesser Grafiken dargestellt ist. In diesem Beispiel reagierte das Gefäß sofort mit einer starken Erhöhung des myogenen

Tonus, was sich an Hand der schnellen Durchmesser-Verkleinerung, kurz nach der Druckänderung, darstellt. Danach passte sich das Gefäß langsamer, aber immer noch weiter, an den höheren Druck an, bis eine Art Plateau erreicht wurde. Erfolgt nun der nächste Drucksprung ist der Grundtonus der Arterie schon erhöht und so wird das Gefäß durch die Druckerhöhung nicht mehr so stark aufgedehnt. Daraufhin folgten wieder die beiden Phasen der Druckanpassung und die Ausbildung eines neuen, dem Druck angepassten, Plateaus.

Abb.2

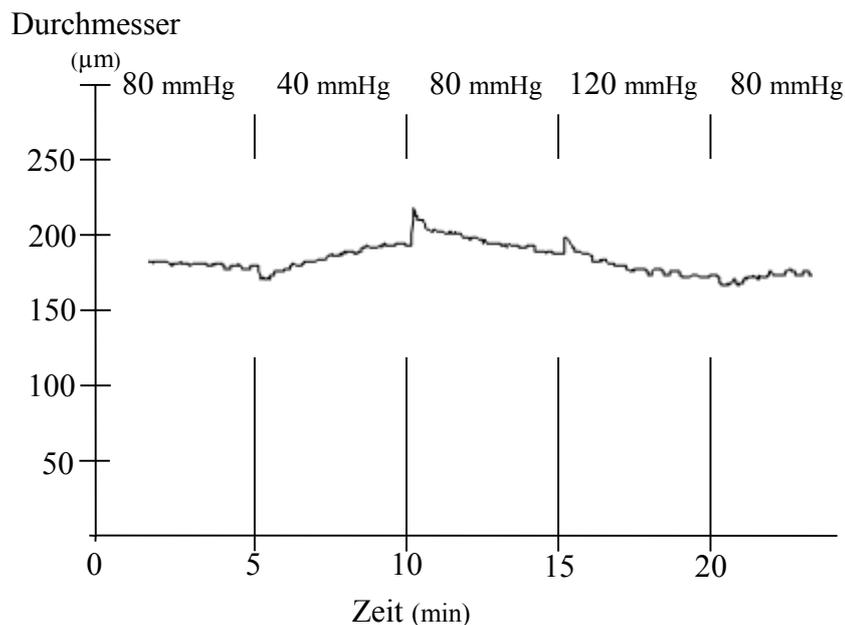


Abbildung 2: Beispiel für die Reaktion der Arteria Cerebellaris superior auf Veränderungen des statischen Drucks.

Die Abbildung 3 zeigt die Reaktion der Arteria Cerebellaris superior auf pulsatilem Druck. Von einem Ausgangsniveau mit statischem Druck von 80 mmHg wurde auf einen mit 1Hz, zwischen 10 und 70 mmHg oszillierenden Druck übergegangen. Hierbei dehnt sich der Gefäßdurchmesser langsam auf, die Arterie reagiert mit immer größeren Durchmesseränderungen. Dieser Effekt entsteht, da die Arterie, nach Absenkung des Mitteldrucks auf 40 mmHg, ihren bei 80 mmHg vorherrschenden, stärkeren Tonus verlässt und einen deutlich geringeren, dem abgesenkten Druck angepassten, Tonus entwickelt. So entsteht eine Dilatation und eine erhöhte Schwankungsbreite der Durchmessermaxima und Durchmesserminima unter pulsatilem Druck. Nach 5 Minuten erfolgte eine Erhöhung des Druckes auf Werte zwischen 50 – 110 mmHg, was anfangs zu einer Erhöhung des Durchmessers führt. Das Gefäß kann zunächst dem erhöhten Druck, im Mittel 80 mmHg,

nicht genügend Kraft entgegensetzen und wird dilatiert. Jedoch kommt es schnell zu einer Tonusanpassung an die neuen Druckverhältnisse. Die Auslenkungen der Durchmesser wird kleiner, da das Gefäß sich mehr spannt und sekundär stellt sich über den gesamten Zeitraum dieser Druckphase ein niedrigeres Plateau der Durchmesseränderung ein. Dieses Plateau entsteht in der Regel in 3 – 5 Minuten, ähnlich wie bei statischem Druck. Als Nächstes ist eine weitere Erhöhung des Mitteldrucks um 40 mmHg zu sehen, was pulsatil 90 – 150 mmHg entspricht. Hierbei ist der Ausgangstonus des Gefäßes schon höher, als bei der Erhöhung von 10 – 70 mmHg auf 50 – 110 mmHg. Daher ist auch die erste Aufdehnung der Arterie geringer, obwohl der Drucksprung das gleiche Ausmaß von 40 mmHg besitzt. Das Gefäß erhöht den Tonus weiter, was wiederum zu kleineren Auslenkungen des Durchmessers führt und der neuen Einstellung des Plateaus, welches sich noch niedriger ausbildet als das Vorherige. In der letzten Phase dieser Druckkurve wird der pulsatile Druck wieder auf statischen umgestellt und auf 80 mmHg abgesenkt. Hier stellt sich nun wieder ein niedriger Tonus ein, das Gefäß entspannt sich, dilatiert langsam auf ein Ruheplateau.

Abb.3

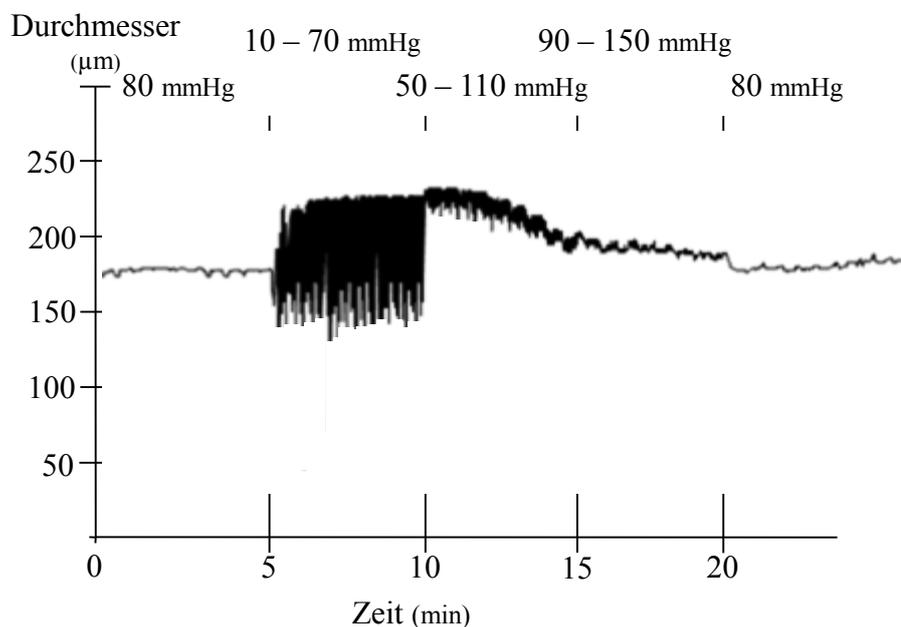


Abbildung 3: Beispiel für die Reaktion der Arteria Cerebellaris superior auf pulsatilen Druck.

In Bild 4 ist die Reaktion einer Arterie auf Veränderungen des statischen Drucks in modifizierter, Ca^{2+} -freier Lösung dargestellt. Da dem Gefäß das Ca^{2+} fehlt, kann es nicht kontrahieren und somit keinen Tonus entwickeln. Die Kurve stellt also einzig die elastischen

Eigenschaften eines voll relaxierten Gefäßes dar. Der Druck wurde, ausgehend von 40 mmHg um 40 mmHg auf 80 mmHg erhöht. Das Gefäß hat keinen Tonus und ist relaxiert, der Druck dehnt das Gefäß auf und erreicht ziemlich zügig ein Durchmesserplateau, welches auch als maximaler Durchmesser bei diesem Druck beschrieben werden kann. Es erfolgt eine weitere Druckerhöhung um noch einmal 40 mmHg. Auch hier wird das Gefäß wieder elastisch aufgedehnt. Ein Tonus kann sich nicht entwickeln und so wurde auch für 120 mmHg der Maximaldurchmesser ermittelt. Zu Letzt wird der Druck wieder auf 80 mmHg abgesenkt und es zeigt sich ein Absenken des Durchmesserplateaus auf den Maximalwert bei 80 mmHg.

Abb.4

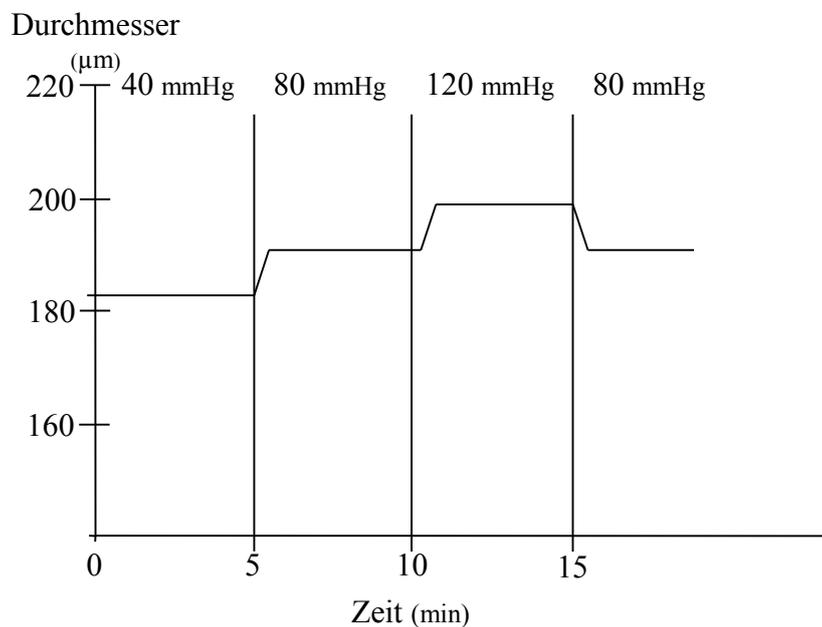


Abbildung 4: Eine Druckkurve unter statischem Druck in Ca^{2+} -freier Lösung.

In der ersten Versuchsserie wurde die Reaktion der Gefäße auf statischen und pulsatilem Druck verglichen. Bei Erhöhung des Drucks, wie oben beschrieben, kommt es bei beiden Druckprotokollen zu einer Verringerung des (mittleren) Durchmessers ($n=6$; $p<0,05$) (Abb. 5). Allerdings sind bei pulsatilem Druck die Gefäßdurchmesser bei allen getesteten Drücken größer, als bei statischem Druck ($n=6$; $p<0,001$) (Abb. 5). Dies ist in Abbildung 6 hervorgehoben, indem durch geeignete Normalisierung, Unterschiede im Ausgangstonus der einzelnen Gefäße, berücksichtigt wurden ($n=6$; $p<0,001$). Als Referenz für die Normalisierung dient hier der Durchmesser, bei 80 mmHg vor den Druckänderungen. Es wird also, bei pulsatilem Druck, ein geringerer myogener Tonus, als bei statischem Druck erreicht ($n=6$; $p<0,001$) (Abb. 7) [Definition des myogenen Tonus siehe Methodenabschnitt]. Im

Gegensatz dazu ist die myogene Reaktion, d.h. das Ausmaß der Reaktion des Gefäßdurchmessers auf eine Druckveränderung, bei beiden Druckprotokollen identisch, wie der Vergleich des myogenen Index, für die getesteten Drucksprünge, in Abb. 8 zeigt (n=6; p=0,90). Man kann sehen, dass sich mit einer Druckerhöhung auch der Tonus des Gefäßes erhöht und somit sich der Innendurchmesser verringert. Diese Reaktion ist bei beiden Druckdarreichungsformen gleich, während sich in Lösung III, in der das Gefäß komplett relaxiert, der Innendurchmesser mit steigendem Druck vergrößert. Die Kernaussage dieses Versuchsteils ist also, dass beide Druckformen, statisch bzw. pulsatil, zu einer zunehmenden Tonusentwicklung der Arteria Cerebellaris superior führen, wobei diese Reaktion bei statischem Druck stärker ausgeprägt ist.

Abb. 5

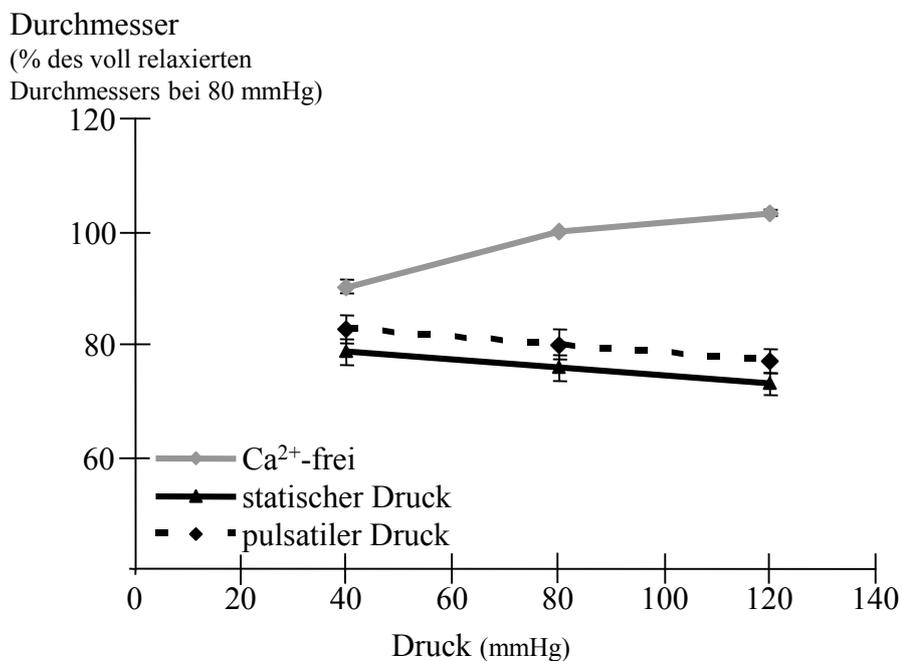


Abbildung 5: Durchmesser der Arteria Cerebellaris superior unter statischem und pulsatilem Druck. Die Angaben für den pulsatilen Druck beziehen sich auf seinen Mittelwert.

Abb. 6

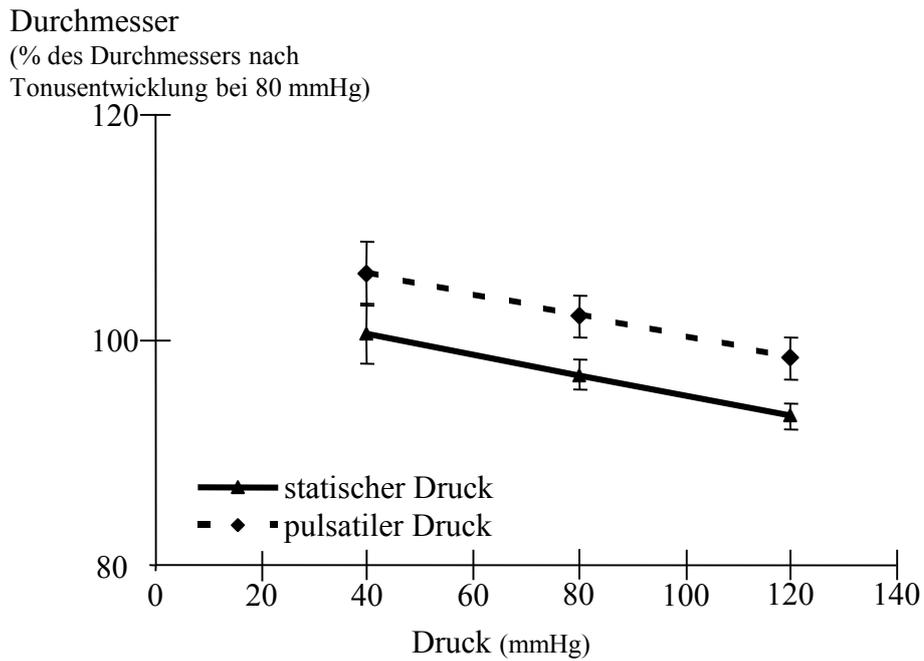


Abbildung 6: Durchmesser der Arteria Cerebellaris superior unter statischem und pulsatilem Druck, normalisiert auf den Durchmesser bei 80 mmHg in Versuchslösung.

Abb. 7

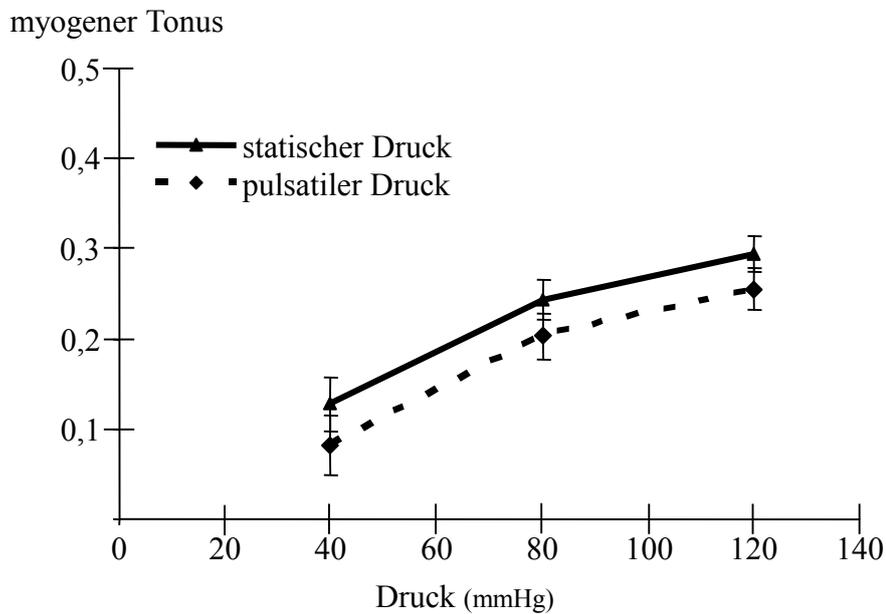


Abbildung 7: Myogener Tonus der Arteria Cerebellaris superior unter statischem und pulsatilem Druck

Abb.8

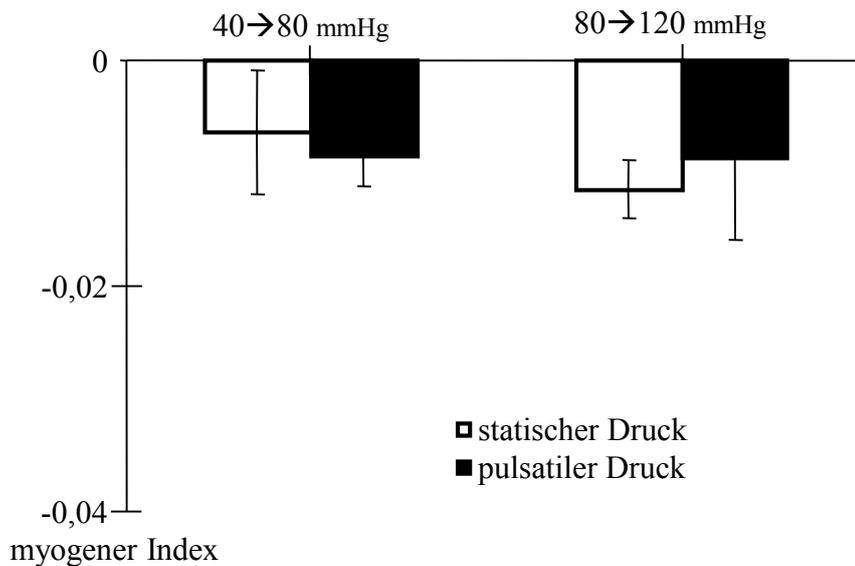


Abbildung 8: Myogener Index für Sprünge des mittleren Drucks von 40 auf 80 mmHg und 80 auf 120 mmHg der Arteria Cerebellaris superior, unter statischem und pulsatilem Druck

3.2 Reaktion der Arteria Cerebellaris superior auf pulsatilen Druck unter Beeinflussung des Zytoskeletts

In der zweiten Versuchsserie wurde die Rolle des Zytoskeletts für die Reaktion der Gefäße auf pulsatilen Druck untersucht. Dabei wurde das Zytoskelett mit 2 Substanzen beeinflusst. Hierfür standen uns Cytochalasin D, welches die Bindung des Aktinzytoskeletts hemmt und Jasplakinolide, welches neue Bindungen im Zytoskelett knüpft, zur Verfügung. Cytochalasin D ist ein Pilzmetabolit der Gruppe der Cytochalasine. Es wurde mit Erfolg zur Erforschung des Zytoskeletts eingesetzt. Cytochalasin-Moleküle binden mit hoher Affinität an das „barbed-end“ der Aktinfilamente und hemmen, sowohl die Polymerisation, als auch die Depolymerisation des Proteins. Am entgegengesetzten „pointed-end“ wird Cytochalasin D nicht gebunden. Darüber hinaus führt Cytochalasin D reversibel zu einer passiven Zellretraktion und Zerteilung von Mikrofilamenten in kürzere Abschnitte (Cooper, 1987; Brenner & Korn, 1980).

Jasplakinolide ist ein zyklisches Peptid, welches aus einem marinen Schwamm isoliert wurde, Jaspis Johnstoni. Jasplakinolide bindet kompetitiv an Aktin und unterstützt somit die Veränderungen der zellulären Architektur. Es bewirkt eine Verschiebung des Gleichgewichts im F:G-Aktinpool zugunsten des F-Aktins, was eine größere Kraftentwicklung des Gefäßes

zur Folge hat, da quantitativ mehr Aktinstränge zur Verfügung stehen (Cipolla *et al.*, 2002; Bubb *et al.*, 2000)

Zunächst wurde pulsatile Druck appliziert und eine myogene Reaktion, wie weiter oben beschrieben, erhalten (Abb. 9). Anschließend wurde, bei 80 mmHg, Cytochalasin D in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-7}$ M verabreicht und in Anwesenheit der Substanz die Reaktion des Gefäßes auf pulsatilem Druck erneut getestet. Hierbei wird deutlich, dass in Anwesenheit der Substanz der myogene Tonus stark abgeschwächt ist ($n=5$; $p<0,01$). Diese Wirkung ist in höheren Druckbereichen stärker ausgeprägt. Bei einem pulsatilem Druck von 90-150 mmHg hat der Durchmesser schon fast den relaxierten Durchmesser wie in modifizierter, Ca^{2+} -freier Lösung bei statischem Druck erreicht, während bei pulsatilen Drücken von 10 – 70 mmHg die Durchmesser noch beinahe den Durchmessern bei einem statischen Druck von 40 mmHg entsprechen.

Abb. 9

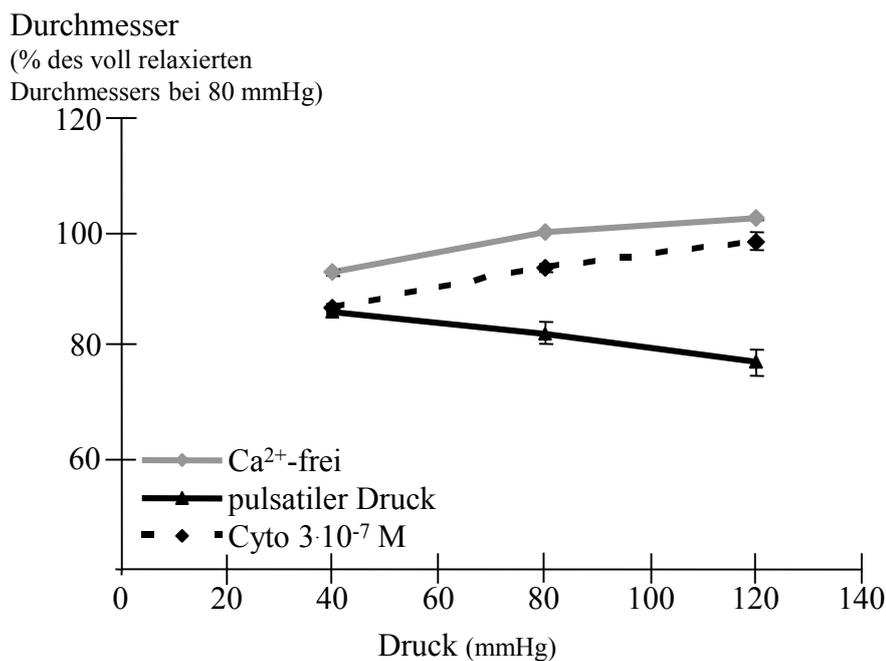


Abbildung 9: Durchmesser der Arteria Cerebellaris superior unter pulsatilem Druck in Versuchslösung und unter Cytochalasin D in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-7}$ M.

Da sich der Effekt von Cytochalasin D als nicht auswaschbar herausstellte, musste geprüft werden, inwieweit die Reaktionen der Gefäße auf pulsatilem Druck entsprechend des Versuchsprotokolls reproduzierbar sind. Dazu wurde die Reaktion der Gefäße auf pulsatilem Druck getestet (#1 in Abbildung 10) und anschließend dem Gefäß eine Phase bei 80 mmHg gegeben, die der Applikationszeit von Cytochalasin entsprach. Dann erfolgte die

Untersuchung der Gefäße auf die gleichen pulsatilen Drücke noch einmal (#2 in Abbildung 10). Die Abbildung zeigt, dass sich die Durchmesser-Druck-Kurven beider Versuche nicht unterscheiden ($n=5$; $p=0,69$). Dieser Sachverhalt wurde für jedes Gefäß geprüft, an dem Substanzen zur Beeinflussung des Zytoskeletts untersucht werden sollten. Nur so ließ sich gewährleisten, dass eine auftretende Veränderung des Tonus auch von der zu testenden Substanz verursacht ist. Dieser Teil der Arbeit zeigt, dass eine Hemmung des Druck-induzierten Aufbaus des Zytoskeletts zu einer sehr starken Schwächung der myogenen Reaktionen der Arterien auf pulsatilen Druck führt.

Abb. 10

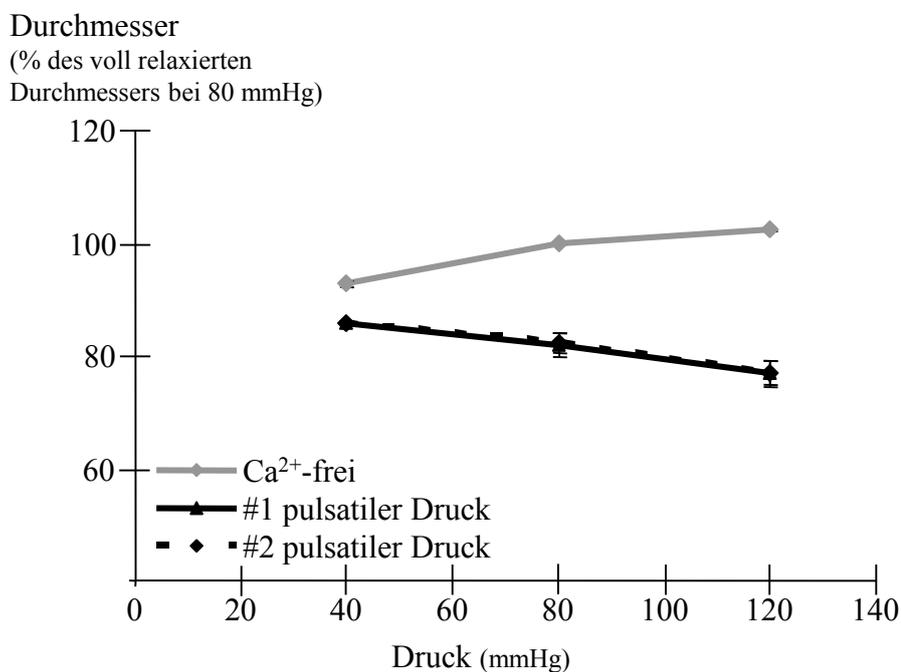


Abbildung 10: Durchmesser der Arteria Cerebellaris superior unter pulsatilem Druck bei zwei aufeinanderfolgenden Applikationen von Druckreihen mit pulsatilem Druck.

Da der Effekt von Cytochalasin nicht auswaschbar war, sollte geprüft werden, ob seine Wirkung durch Jasplakinolide aufgehoben oder zumindest abgeschwächt werden kann. Hierbei erfolgte nach Gabe von $3 \cdot 10^{-7}$ M Cytochalasin D und Applikation von pulsatilen Drücken, wie oben beschrieben, eine 30 minütige Auswaschphase bei 80 mmHg. Nach der Auswaschphase wurden erneut pulsatile Drücke appliziert, wobei sich bestätigte, dass Cytochalasin D nicht auswaschbar ist (Abb. 11). Anschließend wurde Jasplakinolide in einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-7}$ M gegeben und in seiner Anwesenheit die Überprüfung der

Wirkung, der pulsatile Drücke, wiederholt. Dabei konnte keine, die Druck-induzierte Kontraktion verbessernde Wirkung erreicht werden ($n=5$; $p=0,64$) (Abb. 11).

Abb. 11

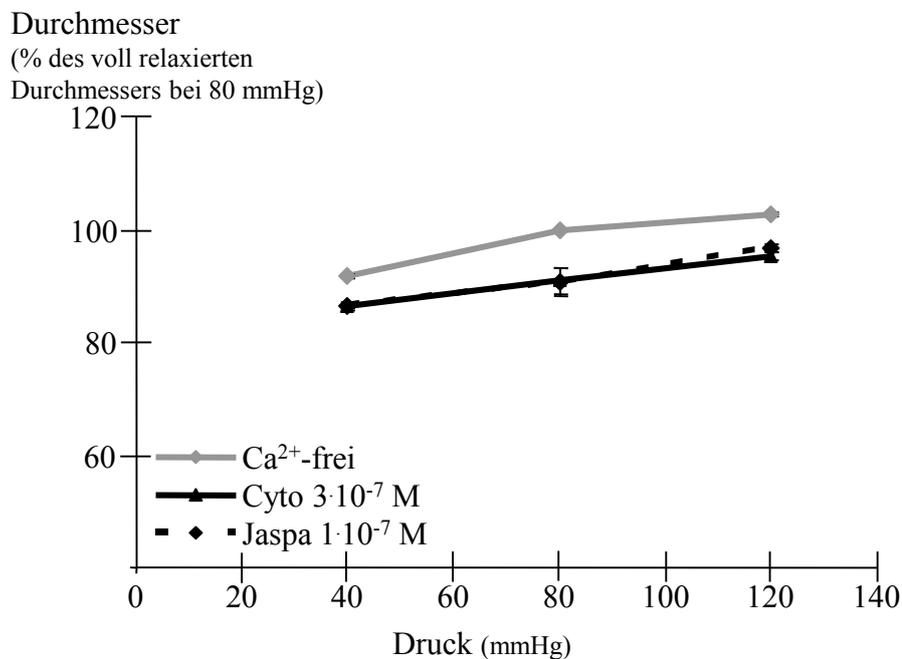


Abbildung 11: Durchmesser der Arteria Cerebellaris superior unter pulsatilem Druck unter Cytochalasin D in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-7}$ M und Jasplakinolide in einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-7}$ M.

In einem weiteren Versuch wurde die Wirkung von Jasplakinolide allein getestet. Zunächst wurde pulsatile Druck appliziert und eine myogene Reaktion, wie weiter oben beschrieben, erhalten (Abb. 12). Anschließend ist bei 80 mmHg Jasplakinolide in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-8}$ M verabreicht und in Anwesenheit der Substanz die Reaktion des Gefäßes auf pulsatile Druck erneut getestet worden. Hierbei wird deutlich, dass in Anwesenheit der Substanz der myogene Tonus zunimmt ($n=5$; $p<0,05$). Auch hier ist der Effekt, ähnlich dem Cytochalasin D-Effekt, bei höheren Drücken deutlicher zu erkennen als bei niedrigen Drücken. Dieser Teil der Arbeit zeigt, dass eine Verstärkung des Druck-induzierten Aufbaus des Zytoskeletts zu einer Stärkung der myogenen Reaktionen der Arterien auf pulsatile Druck führt.

Abb. 12

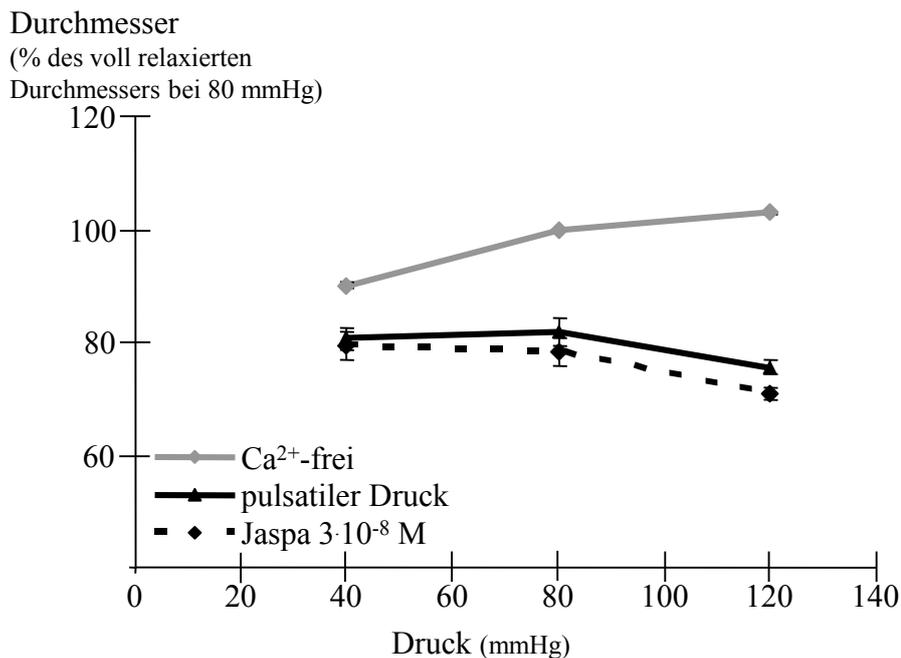


Abbildung 12: Durchmesser der Arteria Cerebellaris superior unter pulsatilem Druck in Versuchslösung und unter Jasplakinolide in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-8}$ M.

3.3 Reaktion der Arteria Gracilis auf pulsatilen Druck unter Beeinflussung des Zytoskeletts

Um zu überprüfen, ob die bisher erhaltenen Ergebnisse auch auf andere Arterien übertragbar sind, wurden die Versuche an der Arteria Gracilis wiederholt.

Zunächst wurde statischer Druck appliziert und eine myogene Reaktion, wie weiter oben beschrieben, erhalten (Abb. 13). Anschließend wurde bei 80 mmHg Cytochalasin D in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-7}$ M (Abb. 13) und in einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-6}$ M (Abb. 14) verabreicht und in Anwesenheit der Substanzen die Reaktion des Gefäßes auf statischen Druck erneut getestet. Hierbei wird deutlich, dass in Anwesenheit von $3 \cdot 10^{-7}$ M Cytochalasin D der myogene Tonus noch nicht beeinflusst ($n=5$; $p=0,05$), in Anwesenheit von $1 \cdot 10^{-6}$ M Cytochalasin D der myogene Tonus jedoch abgeschwächt ist ($n=6$, $p<0,01$). Diese Wirkung ist in höheren Druckbereichen und bei der höheren Konzentration stärker ausgeprägt. Es wird also deutlich, dass auch in diesem Gefäß die Hemmung des Aufbaus des Zytoskeletts einen Einfluss auf die myogene Reaktion hat.

Abb. 13

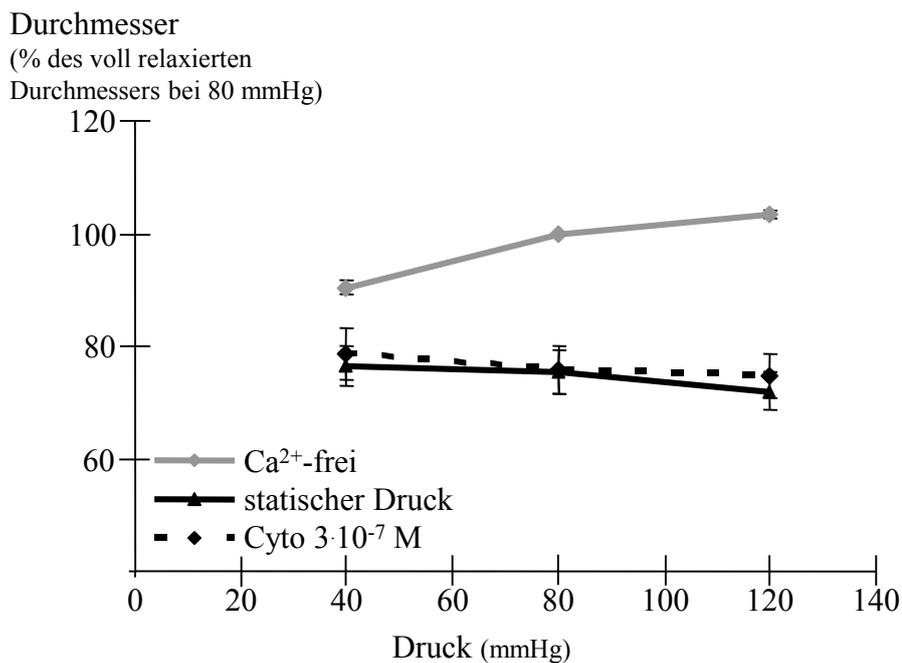


Abbildung 13: Durchmesser der Arteria Gracilis unter statischem Druck in Versuchslösung und unter Cytochalasin D in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-7}$ M.

Abb. 14

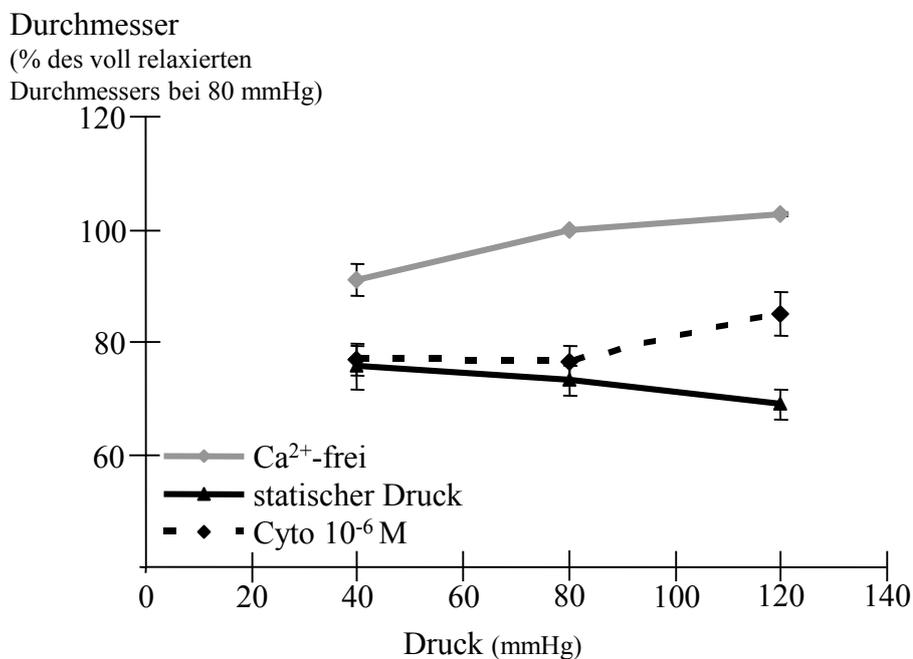


Abbildung 14: Durchmesser der Arteria Gracilis unter statischem Druck in Versuchslösung und unter Cytochalasin D in einer Konzentration von 10^{-6} M.

Um den Effekt von Cytochalasin D auch an diesem Gefäß unter pulsatilem Druck untersuchen zu können, musste geprüft werden, inwieweit die Reaktionen dieses Gefäßes auf pulsatilem und statischen Druck vergleichbar sind. Vor Versuchsbeginn wurden statische Kontrolldruckreihen durchgeführt, bis die Arterien ein wiederkehrendes Durchmesser-niveau bei den Druckreihen zeigten. Dann ist die Reaktion der Gefäße auf pulsatilem Druck bestimmt worden (Abb. 15). Die Abbildung zeigt, dass sich die Durchmesser-Druck-Kurven beider Versuche nicht unterscheiden ($n=7$; $p=0,99$). Dieser Teil der Arbeit beweist, dass sich die Reaktionen der Arterien bei pulsatilem und statischem Druck nicht unterscheiden.

Abb. 15

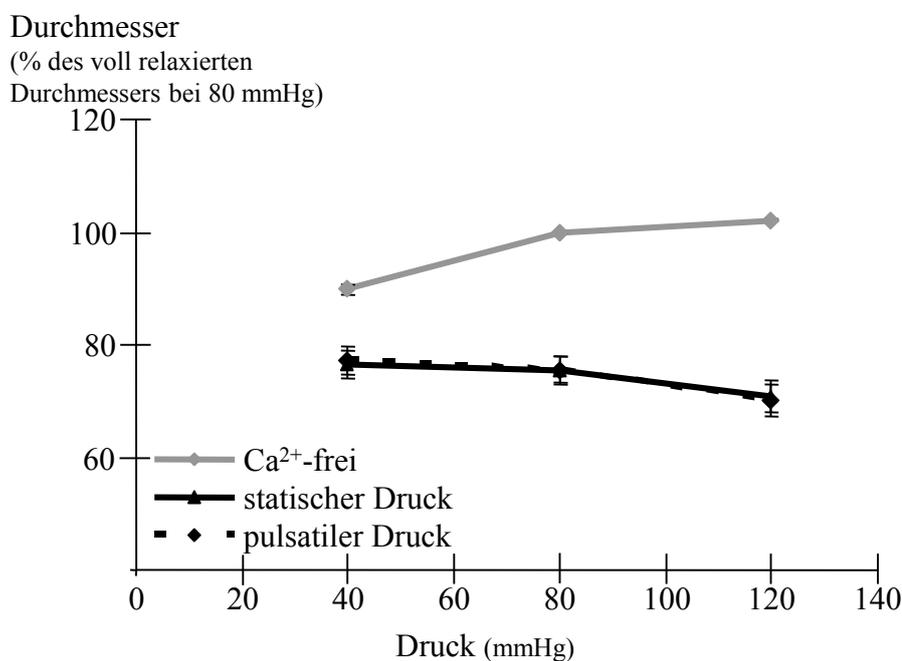


Abbildung 15: Durchmesser der Arteria Gracilis unter pulsatilem und statischem Druck, normalisiert auf den Durchmesser bei 80 mmHg, in Versuchslösung.

Anschließend wurde die Wirkung von Cytochalasin D auf die Arteria Gracilis unter pulsatilem Druck geprüft. Zunächst ist pulsatilem Druck appliziert und eine myogene Reaktion, wie weiter oben beschrieben, bestimmt worden (Abb. 16). Anschließend wurde bei 80 mmHg, Cytochalasin D in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-7}$ M verabreicht und in Anwesenheit der Substanz die Reaktion des Gefäßes auf pulsatilem Druck erneut getestet. Hierbei wird deutlich, dass in Anwesenheit der Substanz der myogene Tonus deutlich abgeschwächt ist ($n=7$; $p<0,01$). Die Wirkung ist auch hier wieder druckabhängig. Bei niedrigen Drücken ist ein geringerer Effekt zu sehen, als bei höheren Drücken. Auch für dieses Gefäß zeigt sich, dass eine Hemmung des Druck-induzierten Aufbaus des Zytoskeletts

zu einer deutlichen Schwächung der myogenen Reaktionen der Arterien auf pulsatilem Druck führt.

Abb. 16

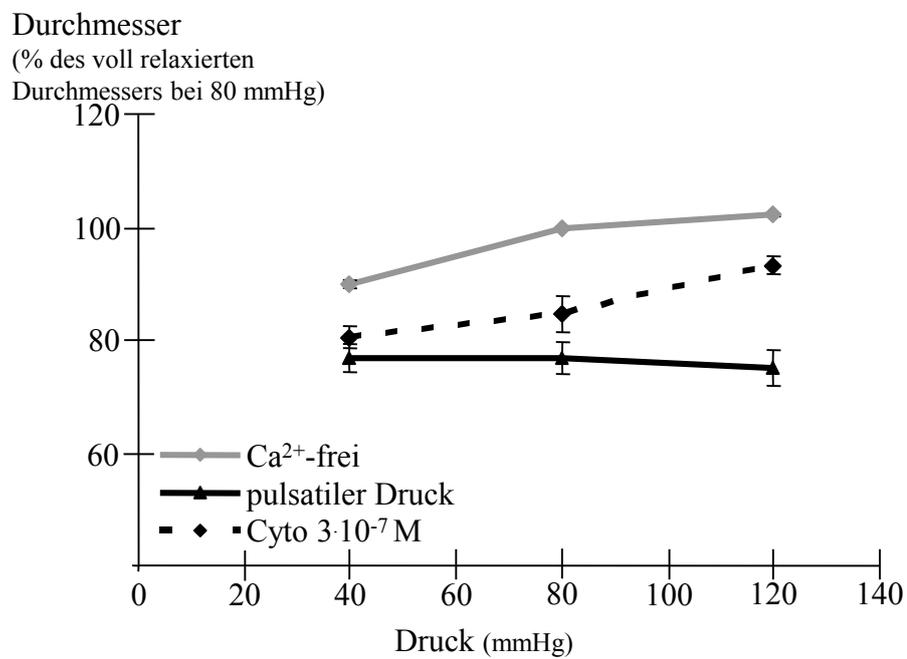


Abbildung 16: Durchmesser der Arteria Gracilis unter pulsatilem Druck in Versuchslösung und unter Cytochalasin D in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-7}$ M.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Wahl des Untersuchungsmodells

Die Ergebnisse dieser Arbeit basieren auf *in vitro* Untersuchungen, an sogenannten isobaren Gefäßpräparaten, der kleinen Rattenmuskelarterien und kleinen Rattenhirnarterien. Vor den Versuchen sind zwei grundsätzliche Entscheidungen zu treffen gewesen. Verwendet man *in vivo* oder *in vitro* Arterien? Für diese Arbeit wurde das *in vitro* Modell gewählt, da dies im Gegensatz zum *in vivo* Modell unabhängig von nervalen, humoralen und metabolischen Einflüssen ist. Die Änderung des Durchmessers hängt ausschließlich von dem Druck und den durch uns zugeführten Metaboliten ab. Ist die Entscheidung auf *in vitro* Präparate gefallen, konnte aus zwei weiteren Modellen gewählt werden: isometrisch, hier werden die Gefäße auf eine Drahtkonstruktion aufgespannt und bei definierter Länge die Kraftentwicklung gemessen, oder isobar, hier werden die Gefäße auf Glaspipetten gezogen und bei definiertem Druck die Kontraktion und Dilatation gemessen. Diese Arbeit entstand im isobaren Modell, da der Beobachter hier sehr gut die Gefäße, definierten Drücken, aussetzen und die damit verbundene myogene Reaktion beobachten und beschreiben konnte, welche aus Kontraktion und Dilatation besteht. Des Weiteren ist auch die Entwicklung des myogenen Tonus unter definiertem Druck sehr gut im isobaren Modell nachvollziehbar (Osol *et al.*, 2002). Ein weiterer Unterschied zeigt sich im Verhalten der Wandspannung. Im isobaren Modell verringert sich die Wandspannung während der Kontraktion, also bei der Ausbildung einer myogenen Reaktion. Dies entspricht der normalen Physiologie des Gefäßes. Im isometrischen Modell kommt es aber zu einer Zunahme der Wandspannung während der Kontraktion (Schubert *et al.*, 1996), was unphysiologisch ist. Wenn es um Rezeptoragonisten und Rezeptorantagonisten geht, zeigen sich zwischen beiden Modellen Sensitivitätsunterschiede, welche auf die unphysiologische Art des isometrischen Modells zurückgeführt werden konnten (Falloon *et al.*, 1995; Buus *et al.*, 1994). So ist für die vorliegende Aufgabenstellung das isobare Modell das geeignetere Modell.

Obwohl das isobare Modell das physiologischere Modell ist, kann auch hier die physiologische Situation nicht in ihrer ganzen Komplexität wiedergegeben werden. Metabolische Faktoren, zum Beispiel des umgebenen Gewebes oder der Blutfluss, werden hier ausgeschaltet und so im Modell vernachlässigt. Zur Beurteilung der Ergebnisse muss also berücksichtigt werden, dass es sich um ein vereinfachtes und auf ein Gefäß reduziertes

Modell handelt. Das Verständnis der untersuchten Reaktionen an diesem Modell ist aber die Voraussetzung, um die komplexen Gefäßnetze in vivo besser beschreiben und verstehen zu können.

4.1.2 Güte der Präparate und Ausschlusskriterien

Bei der Präparation der kleinen Gefäße besteht ein hohes Risiko der mechanischen Irritation der Gefäße während der Präparation und der Befestigung in der Messkammer. Eine Überdehnung oder der Kontakt des Metalls der Präparationsinstrumente mit der Muskelschicht der Gefäße können zur Funktionseinschränkung bis hin zum Funktionsverlust führen. Daher gab es Ausschlusskriterien, die an jedem Gefäß geprüft wurden, bevor das eigentliche Experiment beginnen konnte. Diese Ausschlusskriterien orientieren sich an bereits beschriebenen Gefäßreaktion der kleinen Rattenarterien in isobaren Präparationen (Schubert & Mulvany, 1999; Schubert *et al.*, 1997). Für diese Arbeit wurden folgende Ausschlusskriterien festgelegt:

- Die verwendeten Gefäße mussten einen spontanen, basalen Tonus, bei 80 mmHg intravasalem Druck aufweisen, der in einer Kontraktion von mindestens 15%, in Bezug auf den Maximaldurchmesser, bestand.
- Das Gefäß musste mindestens mit einer 12%igen Kontraktion des Ausgangsdurchmessers, unter 10^{-7} M Noradrenalin, reagieren. (Die Hirngefäße mussten auf Serotonin entsprechend reagieren)
- Die Gefäße mussten vollständig dilatieren unter der Gabe von Acetylcholin 10^{-6} M.

Zu beachten bei der Zugabe von Substanzen ist, dass alle Substanzen über eine Pumpe in die extravasale Lösung der Messkammer gegeben wurden. Im Gegensatz zu einer in vivo Situation mussten also die Wirkstoffe über die Adventitiaseite durch Diffusion und/oder transzellulären Transport an ihre Wirkbereiche gelangen. Dies ist insbesondere für die Beurteilung der Dosis von applizierten Substanzen zu beachten.

Das letzte zu beschreibende Gütekriterium ist die Stase der intravasalen Flüssigkeit. Hierfür musste schon während der Präparation darauf geachtet werden, dass man einen Gefäßabschnitt auswählt, bei dem möglichst keine lichtmikroskopisch sichtbaren Abgänge vorhanden waren. Die Kontrolle erfolgte, wie bereits in Material und Methoden beschrieben, über eine ins Schlauchsystem, welches für den intravasalen Druck zuständig war, eingebrachte Luftblase. Eine, über die durch Diffusion bzw. Druckschwankungen geschuldete Bewegung hinausgehende Verschiebung der Luftblase, galt als Ausschlusskriterium für die Verwendung des Gefäßes bzw. als Abbruchkriterium während des Versuches.

Bei der Beurteilung der Resultate ist also auch der Verzicht auf einen Blutfluss im Gefäß, als notwendige Vereinfachung des Modells, zu berücksichtigen.

4.1.3 Erfassung der Messwerte

Die Erfassung der Durchmesseränderungen, während des Versuches, erfolgte über eine Digitalkamera, deren Livebild, durch ein Programm, auf einem Personalcomputer ausgewertet wurde. Hierbei wurden die Kontrastunterschiede von Gefäßwand, Lumen (innen) und Flüssigkeit (außen) genutzt, um Größen wie Innendurchmesser, Außendurchmesser und Wanddicke zu bestimmen. Daher konnten sich messtechnische Fehler am ehesten über Kontrastunterschiede einschleichen. So stören zum Beispiel kleine Luftbläschen die Messung, welche sich von außen dem Gefäß anlagern, und so den Außendurchmesser scheinbar erheblich vergrößern. Andere beobachtete Fehlerquellen waren eventuelle Verschmutzungen, wie Haare oder Staub und die Befestigungsfäden. Hatte man die Fadenlänge für die Befestigung der Arterie an der Glaspipette zu lang gewählt, konnte es passieren, dass durch den Pumpenstrom der Kammerflüssigkeit die Fadenenden in den Messbereich trieben und mit diesem Verhalten den Durchmesser scheinbar vergrößerten. Um all diese Probleme zu umgehen bzw. um eventuell auftretende Probleme schnell beseitigen zu können, wurde das Livebild und die Messung grafisch über den Monitor ausgegeben. Es entstand also eine optische Kontrollinstanz. Für die hier beschriebenen Ergebnisse wurden nur einwandfreie Messungen zugelassen. Auftretende Fehlerquellen führten dabei nicht zum Abbruch des Versuches, aber zur Wiederholung der aktuellen Messreihe.

Bei der Beurteilung der Messergebnisse ist zu beachten, dass dieses System der Durchmesserermittlung eine Ungenauigkeit von bis zu 2 μm aufweisen konnte.

4.1.4 Wahl der Druckdarbietungsform, konstanter versus pulsatile Druck

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl der konstante, als auch der pulsatile Druck verwendet. Der Begriff konstanter Druck beschreibt ein Modell der Druckdarreichung, in dem festgelegte Drücke für eine fixe Zeit, in dieser Arbeit 5 oder 10 Minuten, je nach Versuchsabschnitt, auf die Arterie einwirken. Zwischen den einzelnen Druckniveaus, die in diesem Experiment verwendet wurden, ist durch Drucksprünge von einem Niveau zum Anderen gewechselt worden.

Die andere Form der Druckdarbietung bei den Experimenten ist der pulsatile Druck. Auch in diesem Modell sind Druckniveaus festgelegt, die durch zwei Einzeldrücke im arithmetischen Mittel die gleichen Druckniveaus beschreiben, wie sie in den Versuchen mit konstantem

Druck verwendet wurden. Zwischen diesen beiden Einzeldrücken wird mit einer fixen Frequenz, für diese Experimente lag sie bei 1Hz, umgeschaltet.

Beide Druckmodelle sind bekannt und wurden schon untersucht, und es konnte gezeigt werden, dass der konstante und der pulsatile Druck, bei kleinen Arterien, eine Kontraktion hervorrufen bzw. die myogene Reaktion modulieren. Beide Druckmodelle bestimmen also, auf ihre Weise die myogene Antwort einer kleinen Arterie (Schubert & Mulvany, 1999;Kotecha & Hill, 2005;Loutzenhiser *et al.*, 2006) Das Ausmaß der myogenen Reaktion ist allerdings von mehreren Faktoren abhängig, wie z.B. Frequenz, Druckniveau und Gefäßbett. (Williamson *et al.*, 2008;Loutzenhiser *et al.*, 2006)

Daher wurden diese Faktoren für die Versuche in dieser Arbeit definiert; zwei Druckdarbietungsformen (statischer und pulsatiler Druck $f=1\text{Hz}$) und zwei Gefäßbetten (Arteria Gracilis, Arteria Cerebellaris superior). Die konkreten Auswirkungen dieser Bedingungen auf die Arteria Gracilis sind durch unsere Arbeitsgruppe bereits teilweise untersucht worden (Budrowitz, 2011). Für die Arteria Cerebellaris superior lagen zum Zeitpunkt der Versuche noch keine Daten zum Verhalten bei pulsatilen Drücken vor. So wurde ein äquivalentes Prozedere zu vorhergehenden Untersuchungen gewählt und beide Druckdarbietungsformen in die Versuche mit einbezogen.

4.2 Zytoskelett und myogene Reaktion unter pulsatilem Druck

4.2.1 Myogene Reaktivität der Arteria Cerebellaris superior bei statischem und pulsatilem Druck

In den Experimenten wird der myogene Tonus einerseits durch die Druckdarreichungsform (statischer und pulsatiler Druck) beeinflusst und andererseits durch die Modulation des Zytoskeletts. Es wurde gezeigt, dass beide Druckformen, statisch bzw. pulsatil, zu einer zunehmenden Tonuserwicklung der Arteria Cerebellaris superior führen, wobei diese Reaktion bei pulsatilem Druck schwächer ausgeprägt ist. Auch in der Arteria Gracilis wird bei beiden Druckformen eine Zunahme der Tonuserwicklung bewirkt, die sich hier jedoch bei pulsatilem und statischem Druck nicht unterscheiden.

Eine eigenständige Wirkung des pulsatilen Drucks wurde auch schon, von anderen Gefäßen, beschrieben. In den afferenten Arteriolen der Niere war die myogene Reaktivität unter pulsatilem Druck verstärkt (Loutzenhiser *et al.*, 2006). Wogegen die myogene Reaktivität unter pulsatilem Druck in Koronargefäßen abgeschwächt war (Goto *et al.*, 1996).

Es zeigte sich eine direkte Abhängigkeit des myogenen Tonus vom transmuralen Druck. Durch die Darbietung des transmuralen Druckes entsteht ein myogener Tonus in der Arterie, unabhängig von der Druckdarreichungsform, ähnlich wie von (Schubert & Mulvany, 1999;Kotecha & Hill, 2005;Loutzenhiser *et al.*, 2006) postuliert. Flavahan und Andere bewiesen in ihren Experimenten, dass der transmurale Druck eine essentielle und selektive Rolle spielt bei der druckinduzierten myogenen Kontraktion der Arterien (Flavahan *et al.*, 2005).

Für die Arteria Cerebellaris superior im speziellen, konnte in den Experimenten gezeigt werden, dass die myogene Antwort bei pulsatilem Druck vom diastolischen Druck bestimmt wird und nicht vom systolischen Spitzendruck. Denn trotz erhöhter Systole im pulsatilen Druck, fällt die myogene Antwort des Gefäßes geringer aus, als in einer vergleichbaren Druckebene im konstanten Druckmodell (Gokina & Osol, 2002;Matrougui *et al.*, 2001;Shaw *et al.*, 2003).

Die letztgenannten Befunde bestätigen die von uns gemachten Beobachtungen an der Arteria Cerebellaris superior. Neu ist jedoch, dass pulsatiler und statischer Druck auch gleichgroße Wirkungen auf kleine Arterien haben können, wie in Ergebnissen an der Arteria Gracilis gezeigt. Bisher wurden nur Wirkungen mit Qualitätsunterschieden, beim Vergleich von pulsatilem mit konstantem Druck, abhängig vom Gefäßbett, beschrieben (Williamson *et al.*, 2008;Loutzenhiser *et al.*, 2006).

Zusammenfassend zeigen die Daten, aus unseren Untersuchungen, konform zur bekannten Literatur, dass die Wirkung des pulsatilen Druckes gefäßabhängig ist. Die Gründe für diese Gefäßabhängigkeit sind nicht bekannt. Die myogene Reaktivität unter statischem Druck, die bekanntermaßen gefäßabhängig ist (Schubert & Mulvany, 1999), konnte bei der Arteria Cerebellaris superior und der Arteria Gracilis der Ratte nicht bestätigt werden. Beide Gefäße zeigten keine Diskrepanz in ihrer myogenen Reaktivität.

4.2.2 Reaktion kleiner Arterien auf pulsatilen Druck unter Beeinflussung des Zytoskeletts

Die Variation der Zytoskelettaktivität wird bei unseren Untersuchungen durch einen Inhibitor, das Cytochalasin D, und einen Aktivator, Jasplakinolide vorgenommen. Beide beeinflussen das Zytoskelett auf der Ebene der Aktinpolymerisation und regulieren dadurch dessen Aktivität.

Durch den Einsatz eines Inhibitors und eines Aktivators konnte belegt werden, dass das Zytoskelett einen Anteil, an der Kontraktion von Arterien bzw. der Entwicklung des myogenen Tonus, hat. Unter dem Einfluss des Inhibitors wurde eine geringere

Kontraktionskraft der Gefäße gemessen. Bei weiterer Erhöhung des Kontraktionsreizes, durch transmuralen Druck, ist auch unter Cytochalasin D eine Tonuserhöhung erreicht worden, die allerdings schwächer ausfiel, als in der Kontrollgruppe.

Ähnliche Ergebnisse wurden für die Aktivierung des Zytoskeletts gezeigt. Diese führte zu einer erhöhten Tonusentwicklung, bei vergleichbaren Reizen, zur Kontrollgruppe. Auch steigt der Einfluss mit zunehmendem Reiz, d.h. transmuralen Druck.

Eine Reversibilität bzw. Auswaschbarkeit des Inhibitors konnte nicht bestätigt werden. Selbst nach Zugabe des Aktivators ist keine Steigerung des myogenen Tonus zu verzeichnen gewesen.

Beide Substanzen sind in ihrer Wirkungsweise in vielen Arbeiten untersucht und validiert worden. (Gokina & Osol, 2002; Gunst & Fredberg, 2003; Cipolla *et al.*, 2002) Cytochalasin D wirkt mit hoher Affinität am schnell wachsenden Plus-Ende von F-Aktin („barbed end“) und hemmt dadurch die weitere Polymerisation der Mikrofilamente. Am entgegengesetzten „pointed end“ erfolgt die Abdissoziation von G-Monomeren und es entsteht eine Verkürzung des Polymers (Urbanik & Ware, 1989). Cytochalasin D reduziert so signifikant den F-Aktin-Gehalt (Sheridan *et al.*, 1996) und „zerteilt“ Aktinfilamente in kürzere Abschnitte, was zu einer Kraftminderung der Zelle und somit einer geringeren myogenen Reaktion der Gefäße führt.

Jasplakinolide hingegen stabilisieren Aktinfilamente *in vitro* und *in vivo* sorgen sie zusätzlich für die Aktinfilamentnukleation (Bubb *et al.*, 2000). Somit können Jasplakinolide, über die Quantitätssteigerung der geordneten Zytoskelettanteile (F-Aktin), einen Qualitätszuwachs der Zytoskelettfunktionen ermöglichen. Es kommt zu einer Erhöhung der Kontraktionskraft und der Zytoskelettstabilität.

Die Modulation des dynamischen Aktin-Myosin Gleichgewichts hat einen hohen Einfluss, unabhängig von der Ca^{2+} -Homöostase, auf die Reaktionsfähigkeit der glatten Muskulatur (Shaw *et al.*, 2003; Shaw *et al.*, 2003).

In vielen Studien konnte bereits der Einfluss von transmuralen Druck, wie er auch in diesem Experiment verwendet wird, auf das Zytoskelett gezeigt werden (Flavahan *et al.*, 2005). Dabei bestätigte sich, dass die Gabe von transmuralen Drücken, zu einer Erhöhung von F-Aktin und Abbau von G-Aktin in der Muskelzelle der Gefäße führt. Bei 10 mmHg ist das F-Aktin in der Nähe der Zellwand lokalisiert, nach Erhöhung des Druckes sind die F-Aktinfäden im Inneren der Zelle und ordnen sich parallel zur Längsachse der Zelle. Genau dieser Reaktion wirkt Cytochalasin D entgegen und wird von Jasplakinoliden unterstützt (Urbanik &

Ware, 1989;Bubb *et al.*, 2000). Diese grundlegende Beobachtung konnten wir in unseren Experimenten ebenfalls bestätigen.

Gefäße steigern aufgrund einer Verstärkung des transmuralen Druckes die Wandspannung. Dies führt dazu, dass über intrazelluläre Signalwege (RhoA, Ca^{2+} , PLC, PKC) eine Verschiebung des F : G-Aktinpools, zugunsten des F-Aktin erreicht wird, um letztendlich einen größeren Widerstand dem Blutfluss in der Arterie entgegensetzen zu können. Genau am F : G-Aktinpool setzen die Jaspalakinolide an. Es verschiebt das Gleichgewicht zugunsten des F-Aktin. Was eine größere Kraftentwicklung des Gefäßes zur Folge hat (Cipolla *et al.*, 2002). Dies bestätigten unsere Experimente. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Jaspalakinolide eine aktive Komponente zur Aktivierung benötigen. Nach bloßer Zugabe der Substanz kam es nicht zu einer Kraftentwicklung bzw. Verringerung des Gefäßdurchmessers. Es musste erst eine Druckänderung erfolgen, auf die das Gefäß reagierte, um einen Effekt in der Kontraktionskraft nachweisen zu können, anders als zum Beispiel durch (Bubb *et al.*, 2000) beschrieben.

Das Cytochalasin hingegen konnte direkt nach Gabe seine Wirkung entfalten (Cipolla *et al.*, 2002;Gokina & Osol, 2002). Mit steigendem Reiz wuchs dann der Einfluss des Cytochalasin D, was wiederum, mit dem schon bei den Jaspalakinoliden zu beobachtenden Effekten, vergleichbar ist. Eine Erhöhung des transmuralen Druckes führt zu einer Tonus Erhöhung. Diese war aber prozentual geringer, als in der Kontrolldruckreihe. Die prozentuale Abweichung erhöht sich mit steigendem Reiz, dies zeigt die Zunahme der Wirkung der Zytoskelett beeinflussenden Substanzen mit der Intensität des Reizes.

Wir konnten allerdings nicht nur diese Punkte in unseren eigenen Experimenten nachweisen, sondern zusätzlich eine gefäßspezifische Sensibilität des Cytochalasin D aufzeigen. So ist die Arteria Cerebellaris superior viel empfänglicher für den Einfluss von Cytochalasin D, als die Arteria Gracilis. Bei gleichen Konzentrationen von Cytochalasin D ist die Kontraktionskraft der Arteria Cerebellaris posterior, prozentual zu einem größeren Ausmaß reduziert worden, als bei der Reaktion der Arteria Gracilis. Hier zu liegen bisher keine vergleichbaren Arbeiten vor. Ob nun das Cytoskelett einen größeren Einfluss im Hirnstromgebiet als im Beinmuskel hat, oder ob andere Faktoren eine Rolle spielen, für diese Auffälligkeit, bleibt offen.

Der letzte Teil der Cytochalasinversuche befasste sich mit dem Punkt der Reversibilität bzw. Auswaschbarkeit des Cytochalasin D. Hier konnten wir keine Reversibilität für die pulsatile Drucksprünge feststellen. Selbst nach über 30 min Auswaschphase konnte das Gefäß, die durch das Cytochalasin D verursachte Minderung der Kraftentwicklung, bzw. Wandspannung gegen den transmuralen Druck, nicht kompensieren.

In den statischen Drucksprüngen beobachteten wir eine geringe oder teilweise Reversibilität für das Cytochalasin D. Aber auch hier kann man nicht von einer vollständigen Remission der Wirkung von Cytochalasin D sprechen, obwohl dies für statische, transmurale Drücke in vorangegangenen Experimenten beschrieben wurde (Flavahan *et al.*, 2005). Es reduziert den F-Aktin-Gehalt also so nachhaltig, dass die Kontraktion über lange Zeiträume gestört ist.

Zusammengefasst zeigt die Arbeit wie in der Literatur teilweise beschrieben, dass Mikrotubulus-Systeme, in enger funktioneller Verbindung mit F-Aktin stehen und zur myogenen Reaktion wesentlich beitragen. Bestätigt wurden die Wirkungsweise der zytoskelettbeeinflussenden Substanzen und eine Mitwirkung des Zytoskeletts bei der Kontraktion der Gefäße (Gunst & Fredberg, 2003; Gokina & Osol, 2002; Osol *et al.*, 2002; Cipolla *et al.*, 2002). Bisher nicht beschrieben ist die unterschiedliche Sensibilität von Cytochalasin D in verschiedenen Gefäßbetten. Zusätzlich wurde Hirn- mit Muskelgefäßbett verglichen, wobei für die Arteria Cerebellaris superior eine erhöhte Sensitivität im Vergleich zur Arteria Gracilis nachgewiesen werden konnte. Ebenso ist die Irreversibilität der Cytochalasin-D-Wirkung neu. Die Substanz ließ sich weder auswaschen, noch durch Jaspalakinolide antagonisieren.

Auch der verzögerte Wirkeintritt von Jaspalakinoliden, welche ihre Wirkung bei Reizänderung in unseren Versuchen entfalteten, ist bisher so nicht in der Literatur zu finden.

4.2.3 Extrazelluläre Modulation der myogenen Reaktion

Am Besten erforscht sind bis jetzt die intrazellulären Signalwege der myogenen Reaktion. Obwohl auch hier nicht alle sich gegenseitig beeinflussenden Transduktionswege, sowie feedback- und feedforward-Mechanismen entdeckt wurden und schon gar kein Gesamtmodell vorhanden ist, welches alle bisher bekannten Mechanismen zur Modulation der myogenen Reaktion vereint und schlüssig deren Zusammenhänge erklärt.

Weitaus weniger ist über die externe Modulation der myogenen Antwort bekannt. Dazu zählt die neurogene Komponente oder die extravasale Druckänderung, die z.B. durch Anspannung von Skelettmuskulatur hervorgerufen werden kann. Ein anderes Beispiel sind die adaptiven Wachstumsprozesse, die wiederum langfristiger oder eher kurzfristiger Natur sein können. Diese inneren Umgestaltungsprozesse hängen nicht mit der Höhe des Drucks zusammen. Sie geschehen auf Grund der Erscheinungsform der Vasomotion (Bakker *et al.*, 2004). Extrazelluläre Einflüsse, wie hochmolekulare Serumfaktoren, führen zu strukturellen Umbauten im Gefäß (Bakker *et al.*, 2000), genau wie intraluminale Flussphänomene (Pistea *et al.*, 2005). Diese Einwirkungen müssen in die Überlegungen und Diskussionen mit einbezogen werden. Hier setzt diese Arbeit an. Wir erschweren und begünstigen den

kurzfristigen Umbau des Zytoskeletts im Gefäß und konnten zeigen, dass die strukturellen Elemente der glatten Muskelzelle einen Einfluss auf die Kontraktionskraft und damit auf die Größe der myogene Antwort haben.

4.2.4 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung

Die myogene Reaktion ist ein hochwirksamer Regulationsmechanismus zur Konstanterhaltung der Organdurchblutung. Das macht die myogene Reaktion zu einem wichtigen, wenn nicht gar zum wichtigsten Regelkreis des Blutkreislaufes, für die Perfusion von Geweben.

Deutlich wird dies besonders, wenn dieser Regelkreis nur unzureichend funktioniert, wie zum Beispiel bei Bluthochdruckerkrankungen, cerebrovaskulären Erkrankungen, der koronaren Herzkrankheit, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und vielen Weiteren.

Unsere Versuche zeigen, dass die Gesamtdurchblutung, also der eigentliche Blutfluss, durch die myogene Reaktion stabilisiert werden kann. Steigt der Druck in der Arterie, setzt eine Autoregulation ein, die zu einer Verjüngung des Durchmessers führt und so die Menge des durchströmenden Blutes begrenzt. Dieser Mechanismus ist relativ anpassungsfähig. So ist bei der essentiellen Hypertonie durch die Autoregulation die Niere stets gut geschützt, so dass die Glomeruli der Personen mit essentieller Hypertonie weitgehend, von den Auswirkungen des Bluthochdruckes, verschont bleiben. Bei ihnen kann daher auch nur selten eine Proteinurie nachgewiesen werden (Griffin & Bidani, 2006; Bidani & Griffin, 2004; Bidani & Griffin, 2002).

Überschreitet die Hypertonie jedoch eine kritische Schwelle, oder entwickelt sich ungewöhnlich schnell, bricht dieser Schutzmechanismus zusammen. Die Nieren werden geschädigt. Diese Schädigung betrifft dann nicht nur die Arterien und Arteriolen die eine Nephrosklerose entwickeln, sondern setzt sich bis in die Glomeruli fort. Es entsteht eine Glomerulosklerose, wodurch diese Patienten dann Proteinurie, Hämaturie und Nierenversagen entwickeln. Bei Patienten mit Diabetes mellitus, ist dieser Verlauf deutlich schneller, und das schützende System, die myogene Autoregulation, bricht deutlich früher zusammen (Griffin & Bidani, 2006; Bidani & Griffin, 2004; Bidani & Griffin, 2002). Ein ähnliches Beispiel stellt der Schlaganfall dar. Auch die Durchblutung des Gehirns wird durch die myogene Autoregulation bestimmt. Sicher gibt es viele Einflüsse die an den neuronalen Gefäßen wirken wie z.B. direkte neuronale Steuerung, das Endothel und der Stoffwechsel, aber der einflussreichste, ist der Gefäßtonus, als Reaktion auf Druckänderungen (Johansson, 1989). Kommt es nun zum Schlaganfall, verstopft eine zuführende Arterie und verursacht eine Ischämie im nachgeschalteten Gebiet. Ist diese Verstopfung vorbei, zeigen die Gefäße eine verminderte

Autoregulation und dies führt zu einer Hyperperfusion (Gourley & Heistad, 1984). Dadurch entstehen weitere Schädigungen und ein Hirnödem. Zusätzlich konnte ein Zusammenhang vom reduzierten Tonus mit dem Verlust von F-Aktin gezeigt werden, was eine Reduzierung der Kontraktionskraft, der Gefäße, zum Teil erklärt (Cipolla *et al.*, 2001). Unklar bleibt bisher jedoch, ob es nur eine Reduzierung des F-Aktins durch den Tonusverlust bei der Verstopfung gibt, oder die Metaboliten der Ischämie bzw. die Ischämie selber dafür verantwortlich sind, dass der F-Aktin Gehalt sinkt und damit die Fähigkeit der Gefäße zur adäquaten Antwort auf den Perfusionsdruck. Klar ist nur, dass das Zytoskelett eine entscheidende Rolle an der Kontraktion von Gefäßen hat und das im Gesunden und im Pathologischen.

5 Zusammenfassung

In den vorliegenden Ausführungen wurde die Wirkung des Druckes und seiner Darbietungsformen, statisch versus pulsatil und der Einfluss des Zytoskeletts auf die myogene Reaktion von kleinen Arterien untersucht. Es erfolgte zum Einen durch eine Hemmung des Zytoskeletts mit Cytochalasin D und zum Anderen durch eine Aktivierung des Zytoskeletts unter Verwendung von Jasplakinolide. Hierfür wurden die Effekte der Druckdarreichungsformen in vitro verglichen, um eine Grundaussage über die Entwicklung des myogenen Tonus der Testgefäße treffen zu können. Für die Arteria Cerebellaris superior zeigten wir, dass der pulsatile Reiz zu einer geringeren Signalantwort des Gefäßes führte als der statische Druck, da sich die Arterie am diastolischen Wert des pulsatilen Druckes zu orientieren scheint und nicht am Mittelwert der Druckamplitude.

Die Wirkung des pulsatilen Druckes ist abhängig vom Gefäßbett. Der statische Druck hingegen war bei den zu untersuchenden Arterien in seinem Einfluss nicht selektiv für jedes Gefäßbett. Die Arteria Cerebellaris superior reagierte, wie die Arteria Gracilis in ihrer Antwortqualität.

Im zweiten Teil der Experimente stellten wir heraus, dass die Kraftentwicklung der Arteria Cerebellaris superior mit zunehmendem Druck nachlässt, wenn das Zytoskelett auf negative Weise beeinflusst wird. Unter der Gabe von Cytochalasin D, welches die Polymerisation der Mikrofilamente hemmt, war eine deutliche Minderung der Tonusentwicklung zu beobachten. Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass mit Progredienz der Drücke auch der Einfluss der Substanz auf die Kontraktion steigt. Ob der Einfluss des Zytoskeletts auf die Kontraktion der Gefäße, mit zunehmender Reizintensität, sich erhöht, oder die Wirkung des Cytochalasin D auf das Zytoskelett bei stärkerer Aktivierung die Mikrofilamentsystems steigt, bleibt offen.

Es fiel eine schlechte Auswaschbarkeit (Reversibilität) von Cytochalasin D auf. Es konnte nur wenig bei den statischen Versuchen und gar nicht in den pulsatilen Versuchsreihen ausgewaschen werden, was ein Anhaltspunkt für eine teils irreversible Schädigung des Zytoskeletts darstellt. Dieser Sachverhalt lässt ebenfalls Schlüsse zum Einfluss der Reizstärke zu. Denn die statischen Drücke rufen eine stärkere Antwort der Arteria Cerebellaris superior hervor und schaffen es die Cytochalasin-D-Wirkung teilweise zu durchbrechen, im Gegensatz zu den pulsatilen Reizen.

Nun sollte, um den Einfluss des Zytoskeletts auf die Kontraktion vollständig belegen zu können, der Beweis erbracht werden, dass eine Stärkung des Zytoskeletts auch zu einer Verbesserung der Kontraktionskraft der Gefäße führt. Hierzu wurden Jasplakinolide

ausgewählt, eine Substanz, die F-Aktin stabilisiert und somit einen gegensätzlichen Effekt hat wie Cytochalasin D, aber an der gleichen Untereinheit des Mikrotubulsystems wirkt. Hier konnte eine Steigerung des myogenen Tonus, der zu untersuchenden Gefäße, beobachtet werden. Mit der Auffälligkeit, dass die bloße Gabe von Jasplakinolide keinen Effekt auf die Gefäße zeigte. Es bedurfte einer Reizänderung, d.h. des Drucks, um die Wirkung von Jasplakinolide zur Entfaltung zu bringen.

Die in den Experimenten festgestellte, teils bestehende, Irreversibilität des Cytochalasin D sollte durch Jasplakinolide durchbrochen werden, da beide reziprok an der gleichen Einheit des Zytoskeletts wirken. Dies konnte nicht bewiesen werden, die Ursachen dafür sind zur Zeit unklar.

Im letzten Teil wurden die bereits an der Arteria Cerebellaris superior beobachteten Ergebnisse an einem anderen Gefäßsystem überprüft, um diese zu verifizieren, wobei eine gleichgerichtete, aber unterschiedlich stark ausgeprägte Wirkung bei Zerebralen- (Arteria Cerebellaris superior) und Skelettmuskelgefäßen (Arteria Gracilis) zu beobachten war.

Die Experimente zeigten also, dass das Zytoskelett einen Einfluss auf die myogene Kontraktion hat, dieser Einfluss variiert aber je nach Druckdarbietung, statisch versus pulsatil, und Gefäßbett, Hirn versus Muskel.

6 Thesen

1. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen die Durchmesseränderung eines Gefäßes, als myogene Reaktion auf die Änderung des transmuralen Druckes, wobei eine Erhöhung des Druckes einer Kontraktion des Gefäßes entspricht und im Umkehrschluss die Erniedrigung des Druckes einer Dilatation.
2. Die zu untersuchenden Objekte sind isobare Gefäßpräparationen der Arteria Cerebellaris superior und der Arteria Gracilis, der Ratte.
3. Ein Teil dieser Arbeit befasst sich mit der These, dass die myogene Antwort kleiner Arterien und Arteriolen durch pulsatilem und statischen Druck reguliert werden kann.
4. Der andere Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Behauptung, dass das Zytoskelett an der Ausbildung der myogenen Reaktion von kleinen Arterien und Arteriolen beteiligt ist und eine wesentliche Rolle in der Modifikation myogene Antwort hat.
5. Die Aufzeichnung der Durchmesseränderung des Gefäßes, während der Experimente, erfolgt videomikroskopisch.
6. Das Zytoskelett wird während der Experimente durch Cytochalasin D inhibierend und durch Jasplakinolide aktivierend, beeinflusst.
7. Die Ergebnisse zeigen, dass die myogene Antwort der Arteria Cerebellaris superior bei pulsatilem Druck, mit einer Frequenz von 1Hz, vom diastolischen Druck bestimmt wird.
8. Die myogene Antwort der Arteria Gracilis wird bei pulsatilem Druck, mit einer Frequenz von 1Hz vom Mitteldruck bestimmt.
9. Cytochalasin D wirkt als Inhibitor des Zytoskeletts bei der Arteria Cerebellaris superior und bei der Arteria Gracilis, sowohl bei statischem, als auch bei pulsatilem Druck.
10. Die Wirkung von Cytochalasin D steigt mit steigendem Kontraktionsreiz, d.h. steigender Aktivierung des Zytoskeletts und äußert sich in einer Abschwächung der myogenen Reaktivität.
11. Jasplakinolide wirken als Aktivatoren des Zytoskeletts.
12. Jasplakinolide entfalten ihre Wirkung erst nach einer Reizänderung und verstärken dann die myogene Reaktivität.
13. Jasplakinolide können als Aktivator des Zytoskeletts nicht die inhibierende Wirkung von Cytochalasin D aufheben.

14. Diese Arbeit zeigt, dass das Zytoskelett einen wesentlichen Anteil an der myogenen Reaktion von kleinen Arterien und Arteriolen hat und dass der Einfluss des Zytoskeletts auf die muskuläre Antwort eines Gefäßes mit der Druckbelastung steigt.

7 Literaturverzeichnis

1. Adam, LP & Hathaway, DR. (1993). Identification of mitogen-activated protein kinase phosphorylation sequences in mammalian h-Caldesmon. *FEBS Lett*, **322**, 56-60.
2. Albrecht, K, Schneider, A, Liebetrau, C, Ruegg, JC & Pfitzer, G. (1997). Exogenous caldesmon promotes relaxation of guinea-pig skinned taenia coli smooth muscles: inhibition of cooperative reattachment of latch bridges? *Pflugers Arch*, **434**, 534-542.
3. Anschutz, S & Schubert, R. (2005). Modulation of the myogenic response by neurogenic influences in rat small arteries. *Br J Pharmacol*, **146**, 226-233.
4. Babij, P. (1993). Tissue-specific and developmentally regulated alternative splicing of a visceral isoform of smooth muscle myosin heavy chain. *Nucleic Acids Res*, **21**, 1467-1471.
5. Babij, P & Periasamy, M. (1989). Myosin heavy chain isoform diversity in smooth muscle is produced by differential RNA processing. *J Mol Biol*, **210**, 673-679.
6. Babu, GJ, Loukianov, E, Loukianova, T, Pyne, GJ, Huke, S, Osol, G, Low, RB, Paul, RJ & Periasamy, M. (2001). Loss of SM-B myosin affects muscle shortening velocity and maximal force development. *Nat Cell Biol*, **3**, 1025-1029.
7. Bakker, EN, Sorop, O, Spaan, JA & VanBavel, E. (2004). Remodeling of resistance arteries in organoid culture is modulated by pressure and pressure pulsation and depends on vasomotion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **286**, H2052-H2056.
8. Bakker, EN, van Der Meulen, ET, Spaan, JA & VanBavel, E. (2000). Organoid culture of cannulated rat resistance arteries: effect of serum factors on vasoactivity and remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **278**, H1233-H1240.
9. Bayliss, WM. (1902). On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *J Physiol*, **28**, 220-231.
10. Bidani, AK & Griffin, KA. (2002). Long-term renal consequences of hypertension for normal and diseased kidneys. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **11**, 73-80.
11. Bidani, AK & Griffin, KA. (2004). Pathophysiology of hypertensive renal damage: implications for therapy. *Hypertension*, **44**, 595-601.
12. Bradley, AB & Morgan, KG. (1987). Alterations in cytoplasmic calcium sensitivity during porcine coronary artery contractions as detected by aequorin. *J Physiol*, **385**, 437-448.
13. Brayden, JE & Nelson, MT. (1992). Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science*, **256**, 532-535.

14. Brenner, SL & Korn, ED. (1980). The effects of cytochalasins on actin polymerization and actin ATPase provide insights into the mechanism of polymerization. *J Biol Chem*, **255**, 841-844.
15. Brown, AM & Birnbaumer, L. (1990). Ionic channels and their regulation by G protein subunits. *Annu Rev Physiol*, **52**, 197-213.
16. Bubb, MR, Spector, I, Beyer, BB & Fosen, KM. (2000). Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. An explanation for certain in vivo observations. *J Biol Chem*, **275**, 5163-5170.
17. Budrowitz, A. (2011). Myogene Autoregulation kleiner Arterien durch pulsatile Drücke. *No.*
18. Buus, NH, VanBavel, E & Mulvany, MJ. (1994). Differences in sensitivity of rat mesenteric small arteries to agonists when studied as ring preparations or as cannulated preparations. *Br J Pharmacol*, **112**, 579-587.
19. Chamley-Campbell, J, Campbell, GR & Ross, R. (1979). The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev*, **59**, 1-61.
20. Chamley-Campbell, JH & Campbell, GR. (1981). What controls smooth muscle phenotype? *Atherosclerosis*, **40**, 347-357.
21. Childs, TJ, Watson, MH, Sanghera, JS, Campbell, DL, Pelech, SL & Mak, AS. (1992). Phosphorylation of smooth muscle caldesmon by mitogen-activated protein (MAP) kinase and expression of MAP kinase in differentiated smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **267**, 22853-22859.
22. Cipolla, MJ, Gokina, NI & Osol, G. (2002). Pressure-induced actin polymerization in vascular smooth muscle as a mechanism underlying myogenic behavior. *FASEB J*, **16**, 72-76.
23. Cipolla, MJ, Lessov, N, Hammer, ES & Curry, AB. (2001). Threshold duration of ischemia for myogenic tone in middle cerebral arteries: effect on vascular smooth muscle actin. *Stroke*, **32**, 1658-1664.
24. Conti, MA & Adelstein, RS. (1981). The relationship between calmodulin binding and phosphorylation of smooth muscle myosin kinase by the catalytic subunit of 3':5' cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, **256**, 3178-3181.
25. Coombes, JE, Hughes, AD & Thom, SA. (1999). Intravascular pressure-evoked changes in intracellular calcium $[Ca^{2+}]_i$ and tone in rat mesenteric and rabbit cerebral arteries in vitro. *J Hum Hypertens*, **13**, 855-858.
26. Cooper, JA. (1987). Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol*, **105**, 1473-1478.
27. Cooper, JA. (1991). The role of actin polymerization in cell motility. *Annu Rev Physiol*, **53**, 585-605.
28. Davis, MJ. (1993). Myogenic response gradient in an arteriolar network. *Am J Physiol*, **264**, H2168-H2179.

29. Davis, MJ & Hill, MA. (1999). Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev*, **79**, 387-423.
30. de, LP, Nishikawa, M, Yost, DA & Adelstein, RS. (1984). Increased phosphorylation of myosin light chain kinase after an increase in cyclic AMP in intact smooth muscle. *Science*, **223**, 1415-1417.
31. Deetjen, P, Alzheimer, C & Deetjen, SH. (2005). Physiologie mit 88 Tabellen ; plus CD-ROM mit Prüfungsfragen und allen Abbildungen ; [Online-Zugang + interaktive Extras www.studentconsult.de], **4.**, vollst. überarb. Aufl., [Nachdr.].
32. Dornyei, G, Monos, E, Kaley, G & Koller, A. (1996). Myogenic responses of isolated rat skeletal muscle venules: modulation by norepinephrine and endothelium. *Am J Physiol*, **271**, H267-H272.
33. Doughty, JM & Langton, PD. (2001). Measurement of chloride flux associated with the myogenic response in rat cerebral arteries. *J Physiol*, **534**, 753-761.
34. Drummond, HA, Grifoni, SC & Jernigan, NL. (2008). A new trick for an old dogma: ENaC proteins as mechanotransducers in vascular smooth muscle. *Physiology (Bethesda)*, **23**, 23-31.
35. Earley, JJ, Su, X & Moreland, RS. (1998). Caldesmon inhibits active crossbridges in unstimulated vascular smooth muscle: an antisense oligodeoxynucleotide approach. *Circ Res*, **83**, 661-667.
36. Earley, S, Waldron, BJ & Brayden, JE. (2004). Critical role for transient receptor potential channel TRPM4 in myogenic constriction of cerebral arteries. *Circ Res*, **95**, 922-929.
37. Eto, M, Ohmori, T, Suzuki, M, Furuya, K & Morita, F. (1995). A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization. *J Biochem*, **118**, 1104-1107.
38. Falloon, BJ, Stephens, N, Tulip, JR & Heagerty, AM. (1995). Comparison of small artery sensitivity and morphology in pressurized and wire-mounted preparations. *Am J Physiol*, **268**, H670-H678.
39. Fatigati, V & Murphy, RA. (1984). Actin and tropomyosin variants in smooth muscles. Dependence on tissue type. *J Biol Chem*, **259**, 14383-14388.
40. Feng, J, Ito, M, Ichikawa, K, Isaka, N, Nishikawa, M, Hartshorne, DJ & Nakano, T. (1999a). Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem*, **274**, 37385-37390.
41. Feng, J, Ito, M, Kureishi, Y, Ichikawa, K, Amano, M, Isaka, N, Okawa, K, Iwamatsu, A, Kaibuchi, K, Hartshorne, DJ & Nakano, T. (1999b). Rho-associated kinase of chicken gizzard smooth muscle. *J Biol Chem*, **274**, 3744-3752.
42. Flavahan, NA, Bailey, SR, Flavahan, WA, Mitra, S & Flavahan, S. (2005). Imaging remodeling of the actin cytoskeleton in vascular smooth muscle cells after

- mechanosensitive arteriolar constriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **288**, H660-H669.
43. Foster, DB, Shen, LH, Kelly, J, Thibault, P, Van Eyk, JE & Mak, AS. (2000). Phosphorylation of caldesmon by p21-activated kinase. Implications for the Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle contraction. *J Biol Chem*, **275**, 1959-1965.
 44. Fultz, ME, Li, C, Geng, W & Wright, GL. (2000). Remodeling of the actin cytoskeleton in the contracting A7r5 smooth muscle cell. *J Muscle Res Cell Motil*, **21**, 775-787.
 45. Gailly, P, Gong, MC, Somlyo, AV & Somlyo, AP. (1997). Possible role of atypical protein kinase C activated by arachidonic acid in Ca²⁺ sensitization of rabbit smooth muscle. *J Physiol*, **500 (Pt 1)**, 95-109.
 46. Gallagher, PJ, Herring, BP & Stull, JT. (1997). Myosin light chain kinases. *J Muscle Res Cell Motil*, **18**, 1-16.
 47. Ganitkevich, VY & Isenberg, G. (1991). Stimulation-induced potentiation of T-type Ca²⁺ channel currents in myocytes from guinea-pig coronary artery. *J Physiol*, **443**, 703-725.
 48. Gerthoffer, WT, Yamboliev, IA, Shearer, M, Pohl, J, Haynes, R, Dang, S, Sato, K & Sellers, JR. (1996). Activation of MAP kinases and phosphorylation of caldesmon in canine colonic smooth muscle. *J Physiol*, **495 (Pt 3)**, 597-609.
 49. Gokina, NI & Osol, G. (2002). Actin cytoskeletal modulation of pressure-induced depolarization and Ca²⁺ influx in cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **282**, H1410-H1420.
 50. Gong, MC, Fuglsang, A, Alessi, D, Kobayashi, S, Cohen, P, Somlyo, AV & Somlyo, AP. (1992). Arachidonic acid inhibits myosin light chain phosphatase and sensitizes smooth muscle to calcium. *J Biol Chem*, **267**, 21492-21498.
 51. Gong, MC, Kinter, MT, Somlyo, AV & Somlyo, AP. (1995). Arachidonic acid and diacylglycerol release associated with inhibition of myosin light chain dephosphorylation in rabbit smooth muscle. *J Physiol*, **486 (Pt 1)**, 113-122.
 52. Goto, M, VanBavel, E, Giezeman, MJ & Spaan, JA. (1996). Vasodilatory effect of pulsatile pressure on coronary resistance vessels. *Circ Res*, **79**, 1039-1045.
 53. Gourley, JK & Heistad, DD. (1984). Characteristics of reactive hyperemia in the cerebral circulation. *Am J Physiol*, **246**, H52-H58.
 54. Griffin, KA & Bidani, AK. (2006). Progression of renal disease: renoprotective specificity of renin-angiotensin system blockade. *Clin J Am Soc Nephrol*, **1**, 1054-1065.
 55. Gunst, SJ & Fredberg, JJ. (2003). The first three minutes: smooth muscle contraction, cytoskeletal events, and soft glasses. *J Appl Physiol*, **95**, 413-425.
 56. Hai, CM & Murphy, RA. (1989). Ca²⁺, crossbridge phosphorylation, and contraction. *Annu Rev Physiol*, **51**, 285-298.

57. Harhun, MI, Gordienko, DV, Povstyan, OV, Moss, RF & Bolton, TB. (2004). Function of interstitial cells of Cajal in the rabbit portal vein. *Circ Res*, **95**, 619-626.
58. Hashimoto, Y & Soderling, TR. (1990). Phosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II: comparative study of the phosphorylation sites. *Arch Biochem Biophys*, **278**, 41-45.
59. Himpens, B, Kitazawa, T & Somlyo, AP. (1990). Agonist-dependent modulation of Ca^{2+} sensitivity in rabbit pulmonary artery smooth muscle. *Pflugers Arch*, **417**, 21-28.
60. Himpens, B, Matthijs, G, Somlyo, AV, Butler, TM & Somlyo, AP. (1988). Cytoplasmic free calcium, myosin light chain phosphorylation, and force in phasic and tonic smooth muscle. *J Gen Physiol*, **92**, 713-729.
61. Ikebe, M & Hartshorne, DJ. (1985). Phosphorylation of smooth muscle myosin at two distinct sites by myosin light chain kinase. *J Biol Chem*, **260**, 10027-10031.
62. Ikebe, M, Hartshorne, DJ & Elzinga, M. (1986). Identification, phosphorylation, and dephosphorylation of a second site for myosin light chain kinase on the 20,000-dalton light chain of smooth muscle myosin. *J Biol Chem*, **261**, 36-39.
63. Ikebe, M & Reardon, S. (1990). Phosphorylation of smooth muscle caldesmon by calmodulin-dependent protein kinase II. Identification of the phosphorylation sites. *J Biol Chem*, **265**, 17607-17612.
64. Itoh, H, Shimomura, A, Okubo, S, Ichikawa, K, Ito, M, Konishi, T & Nakano, T. (1993). Inhibition of myosin light chain phosphatase during Ca^{2+} -independent vasoconstriction. *Am J Physiol*, **265**, C1319-C1324.
65. Jaggar, JH. (2001). Intravascular pressure regulates local and global Ca^{2+} signaling in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **281**, C439-C448.
66. Johansson, B. (1989). Myogenic tone and reactivity: definitions based on muscle physiology. *J Hypertens Suppl*, **7**, S5-S8.
67. Kamm, KE & Stull, JT. (1985). The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **25**, 593-620.
68. Kaneko, T, Amano, M, Maeda, A, Goto, H, Takahashi, K, Ito, M & Kaibuchi, K. (2000). Identification of calponin as a novel substrate of Rho-kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, **273**, 110-116.
69. Kelley, CA, Takahashi, M, Yu, JH & Adelstein, RS. (1993). An insert of seven amino acids confers functional differences between smooth muscle myosins from the intestines and vasculature. *J Biol Chem*, **268**, 12848-12854.
70. Kimura, K, Ito, M, Amano, M, Chihara, K, Fukata, Y, Nakafuku, M, Yamamori, B, Feng, J, Nakano, T, Okawa, K, Iwamatsu, A & Kaibuchi, K. (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*, **273**, 245-248.

71. Kitazawa, T, Takizawa, N, Ikebe, M & Eto, M. (1999). Reconstitution of protein kinase C-induced contractile Ca^{2+} sensitization in triton X-100-demembrated rabbit arterial smooth muscle. *J Physiol*, **520 Pt 1**, 139-152.
72. Knot, HJ & Nelson, MT. (1995). Regulation of membrane potential and diameter by voltage-dependent K^+ channels in rabbit myogenic cerebral arteries. *Am J Physiol*, **269**, H348-H355.
73. Knot, HJ & Nelson, MT. (1998). Regulation of arterial diameter and wall $[\text{Ca}^{2+}]$ in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure. *J Physiol*, **508 (Pt 1)**, 199-209.
74. Knot, HJ, Standen, NB & Nelson, MT. (1998). Ryanodine receptors regulate arterial diameter and wall $[\text{Ca}^{2+}]$ in cerebral arteries of rat via Ca^{2+} -dependent K^+ channels. *J Physiol*, **508 (Pt 1)**, 211-221.
75. Korn, ED. (1982). Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. *Physiol Rev*, **62**, 672-737.
76. Kotecha, N & Hill, MA. (2005). Myogenic contraction in rat skeletal muscle arterioles: smooth muscle membrane potential and Ca^{2+} signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **289**, H1326-H1334.
77. Kubota, Y, Nomura, M, Kamm, KE, Mumby, MC & Stull, JT. (1992). GTP gamma S-dependent regulation of smooth muscle contractile elements. *Am J Physiol*, **262**, C405-C410.
78. Kuo, L, Arko, F, Chilian, WM & Davis, MJ. (1993). Coronary venular responses to flow and pressure. *Circ Res*, **72**, 607-615.
79. Kuo, L, Chilian, WM & Davis, MJ. (1990). Coronary arteriolar myogenic response is independent of endothelium. *Circ Res*, **66**, 860-866.
80. Kuo, L, Davis, MJ & Chilian, WM. (1988). Myogenic activity in isolated subepicardial and subendocardial coronary arterioles. *Am J Physiol*, **255**, H1558-H1562.
81. Kureishi, Y, Kobayashi, S, Amano, M, Kimura, K, Kanaide, H, Nakano, T, Kaibuchi, K & Ito, M. (1997). Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem*, **272**, 12257-12260.
82. Launay, P, Fleig, A, Perraud, AL, Scharenberg, AM, Penner, R & Kinet, JP. (2002). TRPM4 is a Ca^{2+} -activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell*, **109**, 397-407.
83. Lee, MR, Li, L & Kitazawa, T. (1997). Cyclic GMP causes Ca^{2+} desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem*, **272**, 5063-5068.
84. Loutzenhiser, R, Griffin, K, Williamson, G & Bidani, A. (2006). Renal autoregulation: new perspectives regarding the protective and regulatory roles of the underlying mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **290**, R1153-R1167.

85. Malmqvist, U, Trybus, KM, Yagi, S, Carmichael, J & Fay, FS. (1997). Slow cycling of unphosphorylated myosin is inhibited by calponin, thus keeping smooth muscle relaxed. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 7655-7660.
86. Matrougui, K, Tanko, LB, Loufrani, L, Gorny, D, Levy, BI, Tedgui, A & Henrion, D. (2001). Involvement of Rho-kinase and the actin filament network in angiotensin II-induced contraction and extracellular signal-regulated kinase activity in intact rat mesenteric resistance arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **21**, 1288-1293.
87. McCarron, JG, Osol, G & Halpern, W. (1989). Myogenic responses are independent of the endothelium in rat pressurized posterior cerebral arteries. *Blood Vessels*, **26**, 315-319.
88. Mehta, D & Gunst, SJ. (1999). Actin polymerization stimulated by contractile activation regulates force development in canine tracheal smooth muscle. *J Physiol*, **519 Pt 3**, 829-840.
89. Meininger, GA & Davis, MJ. (1992). Cellular mechanisms involved in the vascular myogenic response. *Am J Physiol*, **263**, H647-H659.
90. Menice, CB, Hulvershorn, J, Adam, LP, Wang, CA & Morgan, KG. (1997). Calponin and mitogen-activated protein kinase signaling in differentiated vascular smooth muscle. *J Biol Chem*, **272**, 25157-25161.
91. Miller, JR, Silver, PJ & Stull, JT. (1983). The role of myosin light chain kinase phosphorylation in beta-adrenergic relaxation of tracheal smooth muscle. *Mol Pharmacol*, **24**, 235-242.
92. Morgan, KG & Gangopadhyay, SS. (2001). Invited review: cross-bridge regulation by thin filament-associated proteins. *J Appl Physiol*, **91**, 953-962.
93. Morrison, DL, Sanghera, JS, Stewart, J, Sutherland, C, Walsh, MP & Pelech, SL. (1996). Phosphorylation and activation of smooth muscle myosin light chain kinase by MAP kinase and cyclin-dependent kinase-1. *Biochem Cell Biol*, **74**, 549-557.
94. Nagai, R, Kuro-o M, Babij, P & Periasamy, M. (1989). Identification of two types of smooth muscle myosin heavy chain isoforms by cDNA cloning and immunoblot analysis. *J Biol Chem*, **264**, 9734-9737.
95. Narayanan, J, Imig, M, Roman, RJ & Harder, DR. (1994). Pressurization of isolated renal arteries increases inositol trisphosphate and diacylglycerol. *Am J Physiol*, **266**, H1840-H1845.
96. Nelson, MT, Conway, MA, Knot, HJ & Brayden, JE. (1997). Chloride channel blockers inhibit myogenic tone in rat cerebral arteries. *J Physiol*, **502 (Pt 2)**, 259-264.
97. Nelson, MT, Standen, NB, Brayden, JE & Worley, JF, III. (1988). Noradrenaline contracts arteries by activating voltage-dependent calcium channels. *Nature*, **336**, 382-385.
98. Nishikawa, M, Shirakawa, S & Adelstein, RS. (1985). Phosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase by protein kinase C. Comparative study of the phosphorylated sites. *J Biol Chem*, **260**, 8978-8983.

99. Nishimura, J & van, BC. (1989). Direct regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers. *Biochem Biophys Res Commun*, **163**, 929-935.
100. Nixon, GF, Iizuka, K, Haystead, CM, Haystead, TA, Somlyo, AP & Somlyo, AV. (1995). Phosphorylation of caldesmon by mitogen-activated protein kinase with no effect on Ca²⁺ sensitivity in rabbit smooth muscle. *J Physiol*, **487 (Pt 2)**, 283-289.
101. North, AJ, Gimona, M, Lando, Z & Small, JV. (1994). Actin isoform compartments in chicken gizzard smooth muscle cells. *J Cell Sci*, **107 (Pt 3)**, 445-455.
102. Osol, G. (1995). Mechanotransduction by vascular smooth muscle. *J Vasc Res*, **32**, 275-292.
103. Osol, G, Brekke, JF, McElroy-Yaggy, K & Gokina, NI. (2002). Myogenic tone, reactivity, and forced dilatation: a three-phase model of in vitro arterial myogenic behavior. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **283**, H2260-H2267.
104. Osol, G & Halpern, W. (1985). Myogenic properties of cerebral blood vessels from normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol*, **249**, H914-H921.
105. Osol, G, Laher, I & Cipolla, M. (1991). Protein kinase C modulates basal myogenic tone in resistance arteries from the cerebral circulation. *Circ Res*, **68**, 359-367.
106. Otto, B, Steusloff, A, Just, I, Aktories, K & Pfitzer, G. (1996). Role of Rho proteins in carbachol-induced contractions in intact and permeabilized guinea-pig intestinal smooth muscle. *J Physiol*, **496 (Pt 2)**, 317-329.
107. Park, S & Rasmussen, H. (1986). Carbachol-induced protein phosphorylation changes in bovine tracheal smooth muscle. *J Biol Chem*, **261**, 15734-15739.
108. Parker, CA, Takahashi, K, Tao, T & Morgan, KG. (1994). Agonist-induced redistribution of calponin in contractile vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, **267**, C1262-C1270.
109. Pavalko, FM, Adam, LP, Wu, MF, Walker, TL & Gunst, SJ. (1995). Phosphorylation of dense-plaque proteins talin and paxillin during tracheal smooth muscle contraction. *Am J Physiol*, **268**, C563-C571.
110. Pfitzer, G & Arner, A. (1998). Involvement of small GTPases in the regulation of smooth muscle contraction. *Acta Physiol Scand*, **164**, 449-456.
111. Pfitzer, G, Merkel, L, Ruegg, JC & Hofmann, F. (1986). Cyclic GMP-dependent protein kinase relaxes skinned fibers from guinea pig taenia coli but not from chicken gizzard. *Pflugers Arch*, **407**, 87-91.
112. Pfitzer, G, Sonntag-Bensch, D & Brkic-Koric, D. (2001). Thiophosphorylation-induced Ca²⁺ sensitization of guinea-pig ileum contractility is not mediated by Rho-associated kinase. *J Physiol*, **533**, 651-664.
113. Pfitzer, G, Zeugner, C, Troschka, M & Chalovich, JM. (1993). Caldesmon and a 20-kDa actin-binding fragment of caldesmon inhibit tension development in skinned gizzard muscle fiber bundles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 5904-5908.

114. Pistea, A, Bakker, EN, Spaan, JA & VanBavel, E. (2005). Flow inhibits inward remodeling in cannulated porcine small coronary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **289**, H2632-H2640.
115. Pollard, TD. (1986). Assembly and dynamics of the actin filament system in nonmuscle cells. *J Cell Biochem*, **31**, 87-95.
116. Pollard, TD & Cooper, JA. (1986). Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu Rev Biochem*, **55**, 987-1035.
117. Pucovsky, V, Gordienko, DV & Bolton, TB. (2002). Effect of nitric oxide donors and noradrenaline on Ca²⁺ release sites and global intracellular Ca²⁺ in myocytes from guinea-pig small mesenteric arteries. *J Physiol*, **539**, 25-39.
118. Rovner, AS, Freyzon, Y & Trybus, KM. (1997). An insert in the motor domain determines the functional properties of expressed smooth muscle myosin isoforms. *J Muscle Res Cell Motil*, **18**, 103-110.
119. Sauzeau, V, Le, JH, Cario-Toumaniantz, C, Smolenski, A, Lohmann, SM, Bertoglio, J, Chardin, P, Pacaud, P & Loirand, G. (2000). Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem*, **275**, 21722-21729.
120. Savineau, JP & Marthan, R. (1994). Activation properties of chemically skinned fibres from human isolated bronchial smooth muscle. *J Physiol*, **474**, 433-438.
121. Schubert, R & Mulvany, MJ. (1999). The myogenic response: established facts and attractive hypotheses. *Clin Sci (Lond)*, **96**, 313-326.
122. Schubert, R, Serebryakov, VN, Mewes, H & Hopp, HH. (1997). Iloprost dilates rat small arteries: role of K(ATP)- and K(Ca)-channel activation by cAMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol*, **272**, H1147-H1156.
123. Schubert, R, Wesselman, JP, Nilsson, H & Mulvany, MJ. (1996). Noradrenaline-induced depolarization is smaller in isobaric compared to isometric preparations of rat mesenteric small arteries. *Pflugers Arch*, **431**, 794-796.
124. Setoguchi, M, Ohya, Y, Abe, I & Fujishima, M. (1997). Stretch-activated whole-cell currents in smooth muscle cells from mesenteric resistance artery of guinea-pig. *J Physiol*, **501 (Pt 2)**, 343-353.
125. Shaw, L, Ahmed, S, Austin, C & Taggart, MJ. (2003). Inhibitors of actin filament polymerisation attenuate force but not global intracellular calcium in isolated pressurised resistance arteries. *J Vasc Res*, **40**, 1-10.
126. Sheridan, BC, McIntyre, RC, Jr., Meldrum, DR, Cleveland, JC, Jr., Agrafojo, J, Banerjee, A, Harken, AH & Fullerton, DA. (1996). Microtubules regulate pulmonary vascular smooth muscle contraction. *J Surg Res*, **62**, 284-287.
127. Shin, HM, Je, HD, Gallant, C, Tao, TC, Hartshorne, DJ, Ito, M & Morgan, KG. (2002). Differential association and localization of myosin phosphatase subunits during agonist-induced signal transduction in smooth muscle. *Circ Res*, **90**, 546-553.

128. Sjuve, R, Arner, A, Li, Z, Mies, B, Paulin, D, Schmittner, M & Small, JV. (1998). Mechanical alterations in smooth muscle from mice lacking desmin. *J Muscle Res Cell Motil*, **19**, 415-429.
129. Sobue, K, Muramoto, Y, Fujita, M & Kakiuchi, S. (1981). Purification of a calmodulin-binding protein from chicken gizzard that interacts with F-actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 5652-5655.
130. Somlyo, AP & Himpens, B. (1989). Cell calcium and its regulation in smooth muscle. *FASEB J*, **3**, 2266-2276.
131. Somlyo, AP & Somlyo, AV. (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*, **372**, 231-236.
132. Szpacenko, A, Wagner, J, Dabrowska, R & Ruegg, JC. (1985). Caldesmon-induced inhibition of ATPase activity of actomyosin and contraction of skinned fibres of chicken gizzard smooth muscle. *FEBS Lett*, **192**, 9-12.
133. Takahashi, K, Hiwada, K & Kokubu, T. (1988). Vascular smooth muscle calponin. A novel troponin T-like protein. *Hypertension*, **11**, 620-626.
134. Tang, DD & Gunst, SJ. (2004). The small GTPase Cdc42 regulates actin polymerization and tension development during contractile stimulation of smooth muscle. *J Biol Chem*, **279**, 51722-51728.
135. Tang, DD, Turner, CE & Gunst, SJ. (2003). Expression of non-phosphorylatable paxillin mutants in canine tracheal smooth muscle inhibits tension development. *J Physiol*, **553**, 21-35.
136. Tang, DD, Zhang, W & Gunst, SJ. (2005). The adapter protein CrkII regulates neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein, actin polymerization, and tension development during contractile stimulation of smooth muscle. *J Biol Chem*, **280**, 23380-23389.
137. Thorin-Trescases, N, Bartolotta, T, Hyman, N, Penar, PL, Walters, CL, Bevan, RD & Bevan, JA. (1997). Diameter dependence of myogenic tone of human pial arteries. Possible relation to distensibility. *Stroke*, **28**, 2486-2492.
138. Urbanik, E & Ware, BR. (1989). Actin filament capping and cleaving activity of cytochalasins B, D, E, and H. *Arch Biochem Biophys*, **269**, 181-187.
139. Vandekerckhove, J & Weber, K. (1978). At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J Mol Biol*, **126**, 783-802.
140. Vorotnikov, AV. (1997). Kinase-related protein: a smooth muscle myosin-binding protein. *Int J Biochem Cell Biol*, **29**, 727-730.
141. Watanabe, J, Horiguchi, S, Keitoku, M, Karibe, A, Takeuchi, M, Suzuki, S, Satoh, S & Shirato, K. (1996). The role of extracellular cations in the development of myogenic contraction in isolated rat small arteries. *Jpn Circ J*, **60**, 239-246.

142. Welch, HC, Coadwell, WJ, Ellson, CD, Ferguson, GJ, Andrews, SR, Erdjument-Bromage, H, Tempst, P, Hawkins, PT & Stephens, LR. (2002). P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P₃- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell*, **108**, 809-821.
143. White, S, Martin, AF & Periasamy, M. (1993). Identification of a novel smooth muscle myosin heavy chain cDNA: isoform diversity in the S1 head region. *Am J Physiol*, **264**, C1252-C1258.
144. Williamson, GA, Loutzenhiser, R, Wang, X, Griffin, K & Bidani, AK. (2008). Systolic and mean blood pressures and afferent arteriolar myogenic response dynamics: a modeling approach. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **295**, R1502-R1511.
145. Winder, SJ & Walsh, MP. (1990). Smooth muscle calponin. Inhibition of actomyosin MgATPase and regulation by phosphorylation. *J Biol Chem*, **265**, 10148-10155.
146. Yamashiro, S, Yamakita, Y, Hosoya, H & Matsumura, F. (1991). Phosphorylation of non-muscle caldesmon by p34cdc2 kinase during mitosis. *Nature*, **349**, 169-172.
147. Yamashiro, S, Yamakita, Y, Ishikawa, R & Matsumura, F. (1990). Mitosis-specific phosphorylation causes 83K non-muscle caldesmon to dissociate from microfilaments. *Nature*, **344**, 675-678.
148. Zhang, W & Gunst, SJ. (2006). Dynamic association between alpha-actinin and beta-integrin regulates contraction of canine tracheal smooth muscle. *J Physiol*, **572**, 659-676.
149. Zhang, W, Wu, Y, Du, L, Tang, DD & Gunst, SJ. (2005). Activation of the Arp2/3 complex by N-WASp is required for actin polymerization and contraction in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, **288**, C1145-C1160.
150. Zhang, W, Wu, Y, Wu, C & Gunst, SJ. (2007). Integrin-linked kinase regulates N-WASp-mediated actin polymerization and tension development in tracheal smooth muscle. *J Biol Chem*, **282**, 34568-34580.

8 Selbständigkeitserklärung

Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation eigenständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, angefertigt zu haben. Alle öffentlichen Quellen sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit ist in dieser oder anderer Form zuvor nicht als Prüfungsarbeit zur Begutachtung vorgelegt worden.

Rostock, den 15.11.2011

Ramon Kral

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. habil. R. Schubert für die Bereitstellung des Themas, die Formulierung der Aufgabenstellung, die hervorragende Anleitung bei der Einarbeitung, sowie die außerordentlich gute Betreuung während der Durchführung der Untersuchungen danken.

Des Weiteren gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Instituts für Physiologie, die für jegliche Probleme ansprechbar und stets hilfsbereit waren.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester bedanken, die mir stets eine Stütze und Motivation waren.