

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER

NATURWISSENSCHAFTLICHEN-MATHEMATISCHEN GESAMTFAKULTÄT

DER

RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT

HEIDELBERG

vorgelegt von

Diplom Biologin Larissa Daniela Pfisterer

aus: Heidelberg

Tag der mündlichen Prüfung:

DER EINFLUSS DER WANDSPANNUNG
AUF DIE FUNKTION VON MYOKARDIN
IN GLATTEN GEFÄßMUSKELZELLEN

Gutachter: Prof. Dr. Markus Hecker

Prof. Dr. Thomas Wieland

Damit das Mögliche entsteht, muss immer wieder das Unmögliche versucht werden. *Hermann Hesse*

Step out of your comfort zone. *George Verwer*

Wohin und wie weit wir also blicken mögen, zwischen Religion und Wissenschaft finden wir nirgends einen Widerspruch, wohl aber gerade in den entscheidenden Punkten volle Übereinstimmung. Gott steht für den Gläubigen am Anfang, für den Physiker am Ende allen Denkens. *Max Planck*

Diese Arbeit sei all jenen gewidmet, denen es Freude bereitet in der Widmung einer Doktorarbeit zu stehen.

1	ABKÜRZUNGEN	- 11 -
2	ZUSAMMENFASSUNG	- 15 -
3	SUMMARY	- 17 -
1	EINLEITUNG	- 19 -
1.1	DAS BLUTGEFÄßSYSTEM	- 19 -
1.2	AUFBAU UND FUNKTION DER BLUTGEFÄßE	- 21 -
1.3	BLUTDRUCKREGULATION	- 23 -
1.4	MECHANISMEN DER GLATTMUSKULÄREN KONTRAKTION	- 25 -
1.5	ERKRANKUNGEN DES BLUTGEFÄßSYSTEMS	- 28 -
1.5.1	ARTERIOSKLEROSE	- 29 -
1.5.2	HYPERTENSION	- 30 -
1.5.3	ARTERIOGENESE	- 32 -
1.5.4	VARIKOSIS	- 33 -
1.6	PHÄNOTYPÄNDERUNG DER GLATTEN GEFÄßMUSKELZELLEN	- 34 -
1.7	MYOKARDINFAMILIE	- 37 -
1.8	FRAGESTELLUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT	- 39 -
2	MATERIAL	- 41 -
2.1	OPERATIVE EINGRIFFE	- 41 -
2.2	PERFUSION ISOLIERTER, MURINER GEFÄßE	- 42 -
2.3	ZELLKULTURMETHODEN	- 42 -
2.4	ZELLKULTURMEDIEN UND VERWENDETE ZELLEN	- 43 -
2.5	PUFFERLÖSUNGEN	- 43 -
2.6	LÖSUNGEN FÜR FLUORESCENZBASIERTE UND MORPHOLOGISCHE ANALYSEN	- 44 -
2.7	LÖSUNGEN ZUR MOLEKULARBIOLOGISCHEN ANALYSE	- 45 -
2.8	NUKLEOTIDSEQUENZEN	- 46 -
2.8.1	HUMANE UND MURINE PRIMERSEQUENZEN	- 46 -
2.8.2	SIRNA	- 47 -
2.8.3	MIRNA	- 47 -
2.9	ANTIKÖRPER	- 47 -
2.9.1	PRIMÄRANTIKÖRPER	- 47 -
2.9.2	SEKUNDÄRANTIKÖRPER	- 48 -
2.10	STIMULANTIEN UND INHIBITOREN	- 48 -

2.10.1	STIMULIERENDE PHARMAKA	- 48 -
2.10.2	INHIBITOREN	- 49 -
3	METHODEN.....	- 50 -
3.1	<i>IN VITRO</i> METHODEN.....	- 50 -
3.1.1	PRÄPARATION UND KULTIVIERUNG GLATTMUSKULÄRER, HUMANER ZELLEN.....	- 50 -
	Präparation arterieller und venöser, humaner Muskelzellen aus der Nabelschnur	- 50 -
	Kultivierung arterieller und venöser humaner, glatter Muskelzellen	- 50 -
	Herstellung von Kollagen-I aus Rattenschwänzen	- 51 -
	Methocelherstellung	- 51 -
3.1.2	METHODEN IN 2-DIMENSIONALER ZELLKULTUR.....	- 52 -
	Migrationsassay	- 52 -
	Proliferationsassay	- 52 -
	Biomechanische Dehnung glattmuskulärer Zellen mit dem Flexcell Tension System	- 52 -
	siRNA-basierte Inhibition spezifischer Transkriptionsprodukte.....	- 53 -
3.1.3	METHODEN IN 3-DIMENSIONALER ZELLKULTUR.....	- 54 -
	Herstellung glattmuskulärer Sphäroide.....	- 54 -
	Invasionsassay.....	- 55 -
	<i>Compaction Assay</i>	- 56 -
3.2	ANALYSEMETHODEN.....	- 56 -
3.2.1	IMMUNFLUORESCENZBASIERTE ANALYSE	- 56 -
	Fixierung	- 56 -
	Einbettung.....	- 57 -
	Immunfluoreszenzfärbung der Gewebe- und Sphäroidschnitte.....	- 57 -
	Immunzytochemie.....	- 58 -
3.2.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE ANALYSEN	- 58 -
	mRNA-Isolation, -Aufreinigung und PCR.....	- 58 -
	miRNA-Isolation, –Aufreinigung und quantitative real-time-PCR.....	- 60 -
	Proteinlyse	- 61 -
	Immunopräzipitation.....	- 62 -
	Nukleäre Proteinextraktion	- 62 -
	Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine (SDS-PAGE).....	- 63 -
	Proteintransfer im Nass-Blot-Verfahren.....	- 63 -
	Analyse der immobilisierten Proteine	- 63 -
3.3	GEFÄßPERFUSIONSMODELLE	- 64 -
	Perfusion isolierter muriner Gefäße.....	- 64 -
3.4	<i>IN VIVO</i> METHODEN	- 65 -

3.4.1	TIERMODELLE	- 65 -
	Bluthochdruckmodell	- 65 -
	<i>Hindlimb-Ischemia</i> -Modell.....	- 65 -
	Ohrmuschelvenenligationsmodell.....	- 66 -
3.5	STATISTIK	- 67 -
4	ERGEBNISSE	- 68 -
4.1	FUNKTIONELLE KONSEQUENZEN DES MYOKARDIN-KNOCKDOWNS AUF VASKULÄRE GLATTE MUSKELZELLEN	- 68 -
4.1.1	DER KNOCKDOWN VON MYOKARDIN HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE GLATTMUSKULÄRE MIGRATION	- 68 -
4.1.2	VERMINDERUNG DER KONTRAKTILEN KAPAZITÄT DER MUSKELZELLEN NACH MYOKARDIN-KNOCKDOWN...	- 69 -
4.1.3	VERMINDERTE PROTEINSYNTHESE DES KONTRAKTILEN APPARATES SOWIE EINE VERMEHRTE PROLIFERATION NACH MYOKARDIN-KNOCKDOWN	- 70 -
4.1.4	DIE INVASION VON HUASMCs IN EIN 3-DIMENSIONALES KOLLAGEN-I-GEL IST NACH MYOKARDIN-KNOCKDOWN VERMINDERT.....	- 73 -
4.2	MYOKARDIN UNTER DEM EINFLUSS BIOMECHANISCHER FAKTOREN <i>IN VIVO</i>	- 74 -
4.2.1	EXPERIMENTELL INDUZIERTE ARTERIOGENESE FÜHRT ZUR VERMINDERUNG DER MYOKARDIN-PROTEINSYNTHESE IN SMCs	- 75 -
4.2.2	DIE NUKLEÄRE MYOKARDIN-MENGE IST NACH ERHÖHUNG DES BLUTDRUCKS VERMINDERT	- 76 -
4.2.3	REDUKTION DER MYOKARDIN-PROTEINSYNTHESE IN DER REMODELLIERENDEN VENENWAND	- 78 -
4.2.4	DIE ERHÖHUNG DER WANDSPANNUNG IN PERFUNDIERTEN GEFÄßEN VERMINDERT DIE MYOKARDIN-EXPRESSION UND PROTEINSYNTHESE IN MEDIALEN SMCs.....	- 79 -
4.3	LOKALISATION VON MYOKARDIN IN KULTIVierten SMCs	- 81 -
4.3.1	DIE VERMINDERUNG DER MATRIXSTEIFIGKEIT FÜHRT ZUM NUKLEÄREN EXPORT VON MYOKARDIN	- 82 -
4.3.2	ZYKLISCHE DEHNUNG INDUZIERT DEN EXPORT VON MYOKARDIN AUS DEM NUKLEUS.....	- 83 -
4.3.3	VERIFIZIERUNG DER DEHNUNGSABHÄNGIGEN TRANSLOKATION DES GFP-MARKIERTEN MYOKARDIN-KONSTRUKTES.....	- 84 -
4.4	CHARAKTERISIERUNG DES EINFLUSSES ZYKLISCHER DEHNUNG AUF DIE MYOKARDIN-AKTIVITÄT	- 85 -
4.5	MIR143/145 NACH ERHÖHTER WANDSPANNUNG.....	- 88 -
4.5.1	KEIN EFFEKT ERHÖHTER WANDSPANNUNG AUF DIE EXPRESSION VON MIR143 ODER MIR145	- 88 -
4.5.2	DER KNOCKDOWN VON MYOKARDIN VERMINDERT DIE EXPRESSION VON MIR145, NICHT ABER VON MIR143 ..	- 89 -
4.6	AKTIVIERUNG VON ERK1/2 NACH ZYKLISCHER DEHNUNG	- 90 -
4.6.1	DIE INHIBITION DER ERK1/2-AKTIVITÄT VERMINDERT DIE TRANSLOKATION VON MYOKARDIN IN HUASMCs NACH ZYKLISCHER DEHNUNG.....	- 91 -
4.6.2	ZYKLISCHE DEHNUNG INDUZIERT DIE SERIN-PHOSPHORYLIERUNG VON MYOKARDIN IN HUASMCs	- 92 -
4.6.3	ZYKLISCHE DEHNUNG STEIGERT DIE PHOSPHORYLIERUNG VON ERK1/2 IN HUASMCs.....	- 93 -
4.7	HDAC/14-3-3-VERMITTELTEN EXPORT VON MYOKARDIN	- 94 -

4.7.1	DIE INHIBITION DER HDACs UND DES CHAPERONS 14-3-3 VERHINDERT DEN NUKLEÄREN EXPORT VON MYOKARDIN NACH ZYKLISCHER DEHNUNG	- 95 -
4.8	VALIDIERUNG DER ROLLE VON CALCIUM IM RAHMEN DER DEHNUNGSINDUZIERTEN TRANSLOKATION IN HUASMCS	- 97 -
4.8.1	STIMULATION MIT KCL FÜHRT ZU EINER VERRINGERTEN ANZAHL MYOKARDIN-POSITIVER NUKLEI IN HUASMCS - 97 -	
4.8.2	KEIN EINFLUSS AUF DIE LOKALISATION VON MYOKARDIN DURCH DIE INHIBITION VON TRP-KANÄLEN <i>IN VITRO</i> UND <i>EX VIVO</i>	- 98 -
4.8.3	KEINE BEEINFLUSSUNG DER MYOKARDIN-TRANSLOKATION DURCH KOMPLEXIERUNG DES INTRAZELLULÄREN CALCIUMS NACH ZYKLISCHER DEHNUNG VON HUASMCS	- 99 -
4.8.4	PDGF-BB HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE NUKLEÄRE LOKALISATION VON MYOKARDIN.....	- 100 -
4.9	UNTERSUCHUNG DER ROLLE DES UPS AUF DIE DEGRADATION VON MYOKARDIN	- 101 -
4.9.1	DIE INHIBITION DES PROTEASOMS FÜHRT ZUR AKKUMULATION VON MYOKARDIN IM ZYTOPLASMA DEHNUNGSSTIMULIERTER HUASMCS	- 101 -
4.9.2	BORTEZOMIB INHIBIERT DEN ABBAU VON MYOKARDIN <i>EX VIVO</i> , WOBEI DIE PROTEINSYNTHESE VON CHIP NACH ZYKLISCHER DEHNUNG IN HUASMCS STEIGT	- 103 -
5	DISKUSSION	- 105 -
5.1	DER EINFLUSS ERHÖHTER WANDSPANNUNG AUF DIE MYOKARDIN-EXPRESSION UND DIE REORGANISATION DER MEDIA	- 105 -
5.2	MYOKARDIN-ABHÄNGIGE KONTROLLE DES GLATTMUSKULÄREN PHÄNOTYPS.....	- 111 -
5.3	DEHNUNGSREGULIERTE SIGNALWEGE UND IHR EINFLUSS AUF DEN NUKLEÄREN EXPORT VON MYOKARDIN - 114 -	
5.4	DIE FUNKTION VON MYOKARDIN IN GLATTEN GEFÄßMUSKELZELLEN	- 122 -
5.5	DER EINFLUSS VON MYOKARDIN AUF DIE EXPRESSION VON MIR143/145	- 123 -
5.6	REGULATION DES PROTEASOMALEN ABBAUS VON MYOKARDIN.....	- 126 -
5.7	AUSBlick.....	- 128 -
6	DANKSAGUNG/ ACKNOWLEDGMENTS/ SAVE THE BEST FOR LAST.....	- 130 -
7	LITERATURANGABEN.....	- 132 -

1 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
AC	Adenlyatzyklase
ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym
ADH	Antidiuretisches Hormon, Vasopressin
AFM	Rasterkraftelektronenmikroskopie (<i>atomic force microscopy</i>)
ANF	Antinatriuretischer Faktor
AT1R	Angiotensin I Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
AU	künstliche Einheit (<i>arbitrary unit</i>)
BSA	bovines Serum Albumin (Fraktion V)
Ca(C ₂ H ₃ O) ₂	Calciumazetat
Ca ²⁺	Calcium
Ca ₂ Cl	Calciumchlorid
CARG	SRF-Bindesequenz der Desribonukleinsäure, (CC(A/T) ₆ GG)
cDNA	komplementäre Desribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanidinmonophosphat
CHIP	<i>C terminus of Hsc70-interacting protein</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPI-17	Proteinkinase C stimuliertes Inhibitorprotein
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-diamidino-2-Phenylindol
DNA	Desribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DOCA	Deoxycorticosteron
DTT	Dithiothreitol
E	Effizienz
E10,5	Tag 10,5 der <u>E</u> mbryonalentwicklung
EC	Endothelzellen (<i>endothelial cells</i>)
ECM	Extrazellulärmatrix (<i>extracellular matrix</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
ET-1	Endothelin-1
ET-1R	Endothelin-1 Rezeptor
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gravitationskonstante
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GMP	Guanidinmonophosphat
h	Stunde(n)
HCl	Wasserstoffchlorid
HDAC	Histon Deacetylase

HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor-1
HuASMC	humane, arterielle glatte Muskelzellen
HuVSMC	humane, venöse glatte Muskelzellen
ICAM1	<i>intracellular adhesion molecule 1</i>
IP3	Inositoltriphosphat
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
K ⁺	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KLF	<i>Kruppel-like-factor</i>
Kollagen-I	Kollagen-Typ-I
kPa	Kilopascal
l	(Gefäß-) Länge
LDL	<i>low density lipid</i>
mA	Milliampere
MAP	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
miRNA	microRibonukleinsäure
MLC2	leichte Kette des Myosins 2 (<i>myosin light chain</i>)
MLCK	Kinase der leichten Kette des Myosins
MLCP	Phosphatase der leichten Kette des Myosins
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MOV	mikroskopische Sichtfelder (<i>microscopic field of view</i>)
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MRTF-A/B	Myokardin-verwandter Transkriptionsfaktor-A/-B
n	Anzahl
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrophosphat
Na ₃ OV ₄	Natriumorthovanadat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaHCO ₃	Natriumhydrocarbonat
NaOH	Natronlauge
nd	nicht detektierbar
NES	nukleäre Exportsequenz
NFκB	nukleärer Faktor der 'kappa-leichten Kette' aktivierter B-Zellen
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz
NO	Stickstoffmonooxid
ns	nicht signifikant
NTS	nukleäre Transportsequenz
O ₂	Sauerstoff
oxLDL	oxidiertes LDL

Abkürzungen

PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF-BB	<i>platelet derived growth factor-BB</i>
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Phosphokinase C
PLC	Phospholipase C
Q	Flussgeschwindigkeit/ Stromstärke
r	Radius
R	(Strömungs-) Widerstand
RGD	Sequenz der Aminosäuren Arginin, Glycin, Asparaginsäure
Rho-GEF	Rho-Guanin-Nukleotid Austauschfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RNU6	kleine, nukleäre RNA
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPL32	ribosomales Protein L32
rpm	Runden pro Minute
RT-PCR	<i>real-time</i> Polymerasekettenreaktion
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
Ser	Serin
siRNA	kleine inhibierende Ribonukleinsäure
SM22	<i>smooth muscle 22</i>
SMA	glattemuskuläres Aktin
SMC	glatte Muskelzellen
SM-MHC	glattemuskuläre, schwere Kette des Myosins
SM-MLC	glattemuskuläre, leichte Kette des Myosins
SRF	Serum Response Faktor
S _t	Spannung (Gefäßwand)
TBS	Tris-gepufferte Saline
TGF	<i>tumor growth factor</i>
Thr	Threonin
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TRPC	<i>transient receptor potential channel</i>
TSA	Trichostatin-A
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vgl.	vergleiche
vs.	versus
VSMC	vaskuläre glatte Muskelzellen
w	Gefäßwanddicke

w/v	Gewicht/Volumen
Zn(O ₂ CH ₃) ₂	Zinkdiacetat
ZnCl ₂	Zinkchlorid
ΔP _{tm}	transmurale Druckdifferenz
η	(Blut-) Viskosität
τ	Schubspannung

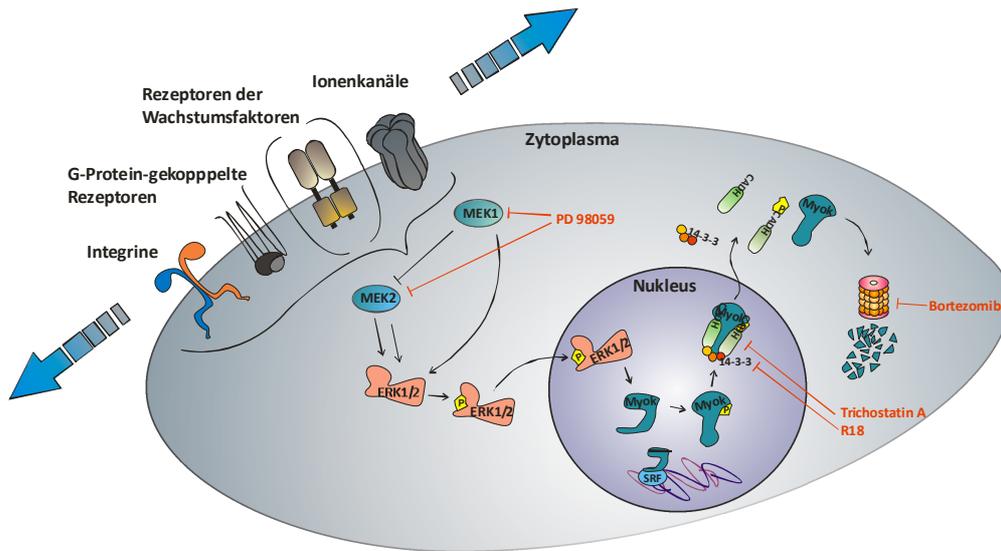
2 Zusammenfassung

Gefäßerkrankungen sind nach wie vor eine der vorwiegenden Todesursachen in den Industrienationen, wobei statistisch gesehen chronischer Bluthochdruck (Hypertension) als bedeutender Risikofaktor für die Bildung arteriosklerotischer Plaques, einen großen Anteil daran hat. Eine Charakteristik der Hypertension ist insbesondere ein chronisch erhöhter diastolischer Blutdruck, der den Anstieg des peripheren (Gefäß-)Widerstandes widerspiegelt und lokal die transmurale Druckdifferenz für arterielle Gefäße und damit deren Wandspannung erhöht. In der Folge kommt es zu einem Umbauvorgang der Gefäßwand, der dem Gesetz von Laplace folgend die Wandspannung senkt, langfristig aber zu einer Abnahme des intraluminalen Durchmessers, zur Verdickung der Gefäßwand und zu einer Zunahme der Steifigkeit der Gefäße führt. Hierbei ändert sich der Phänotyp der glatten Gefäßmuskelzellen von ruhend und kontraktile zu aktiviert und synthetisch, was eine Voraussetzung für die nachfolgende vaskuläre Remodellierung der Gefäßwand ist. Nach wie vor ist jedoch unklar durch welche Stimuli diese Anpassung des glattmuskulären Phänotyps und damit die Reorganisation der Gefäßwandarchitektur initiiert werden. Ausgehend von der Hypothese, dass die Erhöhung der Wandspannung selbst Mechanismen antreibt, die entscheidende Stabilisationsfaktoren für den kontraktile Phänotyp außer Kraft setzen, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, welchen Einfluss eine erhöhte Wandspannung oder Bluthochdruck auf die Funktion von Myokardin hat – einem transkriptionellen Koaktivator des Serum *response* Faktors (SRF), der die Expression von Genprodukten des kontraktile Apparates wie *smooth muscle actin* (SMA) und Calponin reguliert. Die Bildung eines ternären Komplexes durch SRF und Myokardin stabilisiert dabei die Kontraktilität der glatten Muskelzellen.

Im Zuge der Arbeiten wies die Analyse siRNA-vermittelter Inhibition der Myokardin-mRNA eine Zunahme der Proliferation und Reduktion der Kontraktilität der glatten Muskelzellen nach und zeigte damit die Bedeutung dieses Koaktivators für die Aufrechterhaltung des kontraktile und ruhenden Phänotyps dieser Zellen. Zudem wurde erstmalig gezeigt, dass die Myokardinmenge in medialen glatten Muskelzellen remodellierender Gefäße von hypertensiven Mäusen abnimmt und gleichzeitig die Proliferation dieser Zellen zunimmt. Darüber hinaus belegt die Untersuchung isolierter, druckperfundierter Gefäße und die zyklische Dehnung (eine wichtige Komponente der Wandspannung) glatter Gefäßmuskelzellen eine Abnahme der mRNA- sowie Proteinsynthese von Myokardin. Die weitere mechanistische Analyse dieser Beobachtungen impliziert einen bis dato unbekanntem Signalweg, der durch erhöhte Wandspannung zur Reduktion von Myokardin und damit der Kontraktilität der vaskulären glatten Muskelzellen führt: Die Dehnung glatter Gefäßmuskelzellen hat die Serinphosphorylierung von Myokardin durch ERK1/2 zur Folge und initiiert so die Dissoziation

von Myokardin vom SRF. Phosphoryliertes Myokardin bindet intranukleär an HDAC4/HDAC5 und wird durch das Chaperon 14-3-3 exportiert. Darauf folgend wird Myokardin im Zytoplasma durch die E3-Ligase CHIP ubiquitinyliert und durch das 26S-Proteasom abgebaut.

Zusammenfassend wird durch diese Arbeit erstmalig gezeigt, dass (I) die Steigerung der Wandspannung ausreichend für die Inaktivierung von Myokardin ist, (II) die dehnungsinduzierte Myokardin-Translokation vom Kern ins Zytoplasma von ERK1/2 und Klasse II HDACs/14-3-3 abhängt und (III) in dehnungsstimulierten Gefäßmuskelzellen zytoplasmatisch lokalisiertes Myokardin proteasomal abgebaut wird (siehe zusammenfassendes Schaubild). Mit diesem Mechanismus wird die Funktion eines stabilisierenden Faktors des glattmuskulären kontraktile Phänotyps blockiert und somit die Ausbildung eines aktivierten und synthetischen Phänotyps dieser Zellen begünstigt. Diese Ergebnisse weisen Myokardin eine kritische, regulative Funktion im Rahmen der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase und Unterdrückung maladaptiver, vaskulärer Remodellierungsprozesse zu und zeigen gleichzeitig neue Angriffspunkte für die Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen auf.



3 Summary

Cardiovascular diseases are still the major cause of death in industrialized countries with hypertension being the most important risk factor for these pathologies, namely for the onset and development of arteriosclerosis. Hypertension itself typically leads to an increase in peripheral resistance causing a rise in diastolic blood pressure initiating detrimental changes in structure and function of arterial blood vessels. This local rise in transmural pressure in these blood vessels causes an increase in wall tension to which the arterial smooth muscle cells (SMCs) first respond with active vasoconstriction, the so-called myogenic response, aimed at reducing the biomechanical strain within the arterial vessel wall. If the increase in blood pressure hence wall tension persists, however, the smooth muscle cells within the media will inevitably undergo hypertrophy or hyperplasia, depending on the size of the arterial blood vessel, resulting in an inward remodeling that according to the law of Laplace reduces wall tension at the expense of a further rise in peripheral resistance. Depending on the intensity and duration of the increase in wall tension, therefore, the remodeling process in the arterial vessel wall becomes maladaptive ultimately causing an irreversible fixation of diastolic blood pressure at an elevated level. The basis of this initially adaptive remodeling process turning into maladaptive is a switch in phenotype of the arterial SMCs from the contractile to the synthetic state which is earmarked by their increased rate of proliferation and loss of their contractile capacity. The reasons why vascular SMCs in general fail to maintain their contractile state in conditions of hypertension are still elusive.

Starting from the hypothesis that increased wall tension is the driver of this maladaptive inward remodeling through weakening factors that maintain the vascular SMCs in the contractile state, this work addressed the putative role of such a phenotype stabilizing factor therein, i.e. myocardin. Mainly localized to the nucleus of these cells, myocardin is a co-activator of the transcription factor serum response factor (SRF) and as such pivotal for maintaining the expression of contractility promoting gene products in vascular SMCs.

In this context, knockdown of myocardin in human arterial SMCs in fact revealed a loss of expression of such gene products like smooth muscle α -actin (SMA) or calponin, and subsequently a loss of their contractile capacity while their rate of proliferation increased. In line with these findings, myocardin abundance decreased in the media of remodeling arteries from hypertensive mice. Subsequent analyses of isolated perfused murine blood vessels and both human and mouse cultured SMCs exposed to elevated wall tension or stretch confirmed a loss of myocardin from the nucleus of the arterial SMCs as well as a concomitant reduction of its abundance in the cytoplasm.

Stretching of the cultured SMCs also promoted the rapid phosphorylation of myocardin at a serine residue through activated extracellular reactive kinase (ERK) 1/2. As a result, the phosphorylated myocardin dissociated from SRF and bound to histone deacetylase (HDAC) 4/5 followed by its chaperone 14-3-3-mediated export from the nucleus to the cytoplasm. There, presumably the exported myocardin was ubiquitinated by the E3-ligase CHIP and subsequently degraded by the 26S-proteasome.

Collectively these findings point towards a novel mechanism by which elevated wall tension or stretch causes an ERK1/2-mediated serine phosphorylation of myocardin leading to its HDAC4/5 and 14-3-3-mediated transport from the nucleus to the cytoplasm where it is subsequently degraded through the proteasome. As such, a pivotal transcriptional co-activator in vascular SMCs controlling the gene expression program required to maintain their contractile phenotype is effectively inactivated and removed paving the way for their transient or chronic switching to the synthetic phenotype that is prototypic for vascular remodeling processes owing to an increase in wall tension. In this respect, this mechanism may offer a novel and interesting therapeutic approach to address hypertension-related cardiovascular disorders through maintaining the contractile vascular SMC phenotype.

1 Einleitung

1.1 Das Blutgefäßsystem

Die suffiziente Verteilung von Sauerstoff, Nähr- und Botenstoffen sowie der Transport zirkulierender Leukozyten hängen entscheidend von der Funktion und dem Aufbau des Blutgefäßsystems ab. Es ist somit ein strukturelles Grundelement unseres Organismus, dessen Funktionseinschränkung fatale Folgen für die Gesundheit hat.

Die Hauptaufgabe des Herz-Kreislauf-Systems ist die Gewährleistung einer ausreichenden Sauerstoffversorgung der Organe durch die bedarfsgerechte Verteilung des Blutes im Körper. Für die adäquate Funktion von Niere und Gehirn ist dabei eine konstante Durchblutung besonders entscheidend. Zur Regulation des Wärmehaushaltes fließen ca. 10 % des Herz-Zeit-Volumens zur Haut. Zudem wird der Abtransport metabolischer Endprodukte aus den Geweben und die inter-organische Kommunikation durch das Herz-Kreislauf-System realisiert (Risau 1997, Aitsebaomo, Portbury et al. 2008).

Der große Körperkreislauf beginnt im linken Ventrikel, der das Blut pulsatil über die Aorta in das arterielle System auswirft. Nach Eintritt des Blutes in das Kapillarsystem wird es im venösen System gesammelt, das über die Vena cava im rechten Vorhof endet. Im kleinen Kreislauf oder Lungenkreislauf zirkuliert das Blut vom rechten Ventrikel durch die Lunge und wird von dort in den linken Vorhof des Herzens geleitet. Der mittlere Druck in der Aorta bzw. den großen Leitungsarterien beträgt 100 mmHg, in den kleinen Arterien und Arteriolen ca. 40 mmHg, in den Kapillaren um die 25 mmHg, in den Venolen bei 20 mmHg und in den Venen bei 5-8 mmHg (Silbernagel 2003).

Um die unterschiedlichen Anforderungen an das Herz-Kreislauf-System adressieren zu können, unterscheiden sich die Blutgefäße in ihrem Aufbau und damit ihren Eigenschaften (Jain 2003). Die großen Arterien und die Aorta verteilen sauerstoffreiches Blut im Organismus. Ihre Wand ist durch Einlagerung von elastischen Fasern sehr dehnbar und erlaubt, dass sie die Energie der vom Herz ausgehenden Druckpulsquelle teilweise aufnehmen und so die aufzubringende Herzarbeit zur Beschleunigung des Blutvolumens verringern (Windkesselphänomen). Die kleinen Arterien und die Arteriolen (Durchmesser 3-0,02 mm) gehören zur Gruppe der Widerstandsgefäße. Der Strömungswiderstand (R) ist nach dem Hagen-Poiseuille'schen Gesetz ($R = \frac{8\eta}{\pi r^4}$) proportional zur Gefäßlänge (l), der Blutviskosität (η) und umgekehrt proportional zur vierten Potenz des Innenradius (r). Der periphere Widerstand wird durch ihren geringen Radius der Endarterien und der Arteriolen wesentlich stärker beeinflusst, als durch ihre Gesamtoberfläche. Gemäß des Ohm'schen

Gesetzes ist die axiale Blutdruckdifferenz zwischen rechtem und linkem Ventrikel (in mmHg) das Produkt der Stromstärke (Q) und des Gefäßwiderstandes (R): $\Delta P_{tm} = QR$. Mit der Verringerung des Radius durch Gefäßkontraktion erhöhen sich der Widerstand (R) und damit auch die transmurale Druckdifferenz (ΔP_{tm}). Der Radius einer Kapillare (ca. 9 μm) ist zwar kleiner als der der Arteriolen, durch ihre große Anzahl und Parallelschaltung (2. Kirchhoff'sches Gesetz) haben diese Gefäße jedoch keinen Anteil an der Blutdruckregulation. Dies wird dadurch unterstützt, da sie amuskulär sind und somit kaum kontrahieren können. In den Kapillaren findet der Gas- und Stoffaustausch statt, was durch die niedrige Blutgeschwindigkeit (Q) und große Gesamtoberfläche begünstigt wird. Unterstützend kommt hier hinzu, dass Kapillaren mit einer sehr dünnen Wand ausgestattet sind. Das kapilläre Netzwerk geht in das venöse System über, das das sauerstoffarme Blut zurück zum Herzen transportiert. Die Venen werden als Kapazitätsgefäße bezeichnet, da sie ein sehr großes Volumen aber eine verhältnismäßig dünne Wand mit vielen elastischen Fasern aber wenigen glatten Muskelzellen besitzen, woraus eine starke Dehnbarkeit resultiert. Ein Nebeneffekt des geringen Anteils glatter Gefäßmuskelzellen ist eine verminderte Kontraktionsfähigkeit. Um das Blut auch entgegen der Gravitation zurück zum Herzen zu transportieren, wird die sogenannte Muskelpumpe - die Kontraktion der umliegenden Muskulatur - verwendet. Venenklappen vermeiden dabei den Reflux des Blutes (Klinke 2003).

Zwischen den Gefäßen des arteriellen und venösen Teils des Kreislaufsystems besteht nicht nur eine Heterogenität auf struktureller sondern auch auf molekularer Ebene. Beispielsweise exprimieren die Endothelzellen des arteriellen Systems den Liganden EphrinB2, während Venenendothelzellen EphB4 exprimieren – Moleküle, die als arteriovenöse Marker bezeichnet werden (Wang, Chen et al. 1998). Der Wachstumsfaktor *vascular endothelial growth factor* (VEGF)-A existiert in drei Isoformen (VEGF-A_{120, 188, 164}), die entweder löslich (VEGF₁₂₀) oder Matrix-assoziiert (VEGF₁₈₈) sind (Carmeliet, Ng et al. 1999, Stalmans, Ng et al. 2002). Transgene bzw. für diese beiden Isoformen defiziente Mäuse zeigen eine normale Entwicklung venöser Gefäße, wohingegen die arterielle Differenzierung sehr eingeschränkt ist (Aitsebaomo, Portbury et al. 2008). VEGF-A reguliert einen weiteren Faktor, der einer arteriovenösen Diskrepanz unterliegt – Notch (Lawson, Scheer et al. 2001). Die vier Notch-Rezeptoren binden an einen der fünf Liganden, Jagged 1-2 bzw. *Delta-like* (Dll) 1-3. Dieses System ist im Laufe der ontogenetischen Entwicklung in die Entscheidung des Zellschicksals involviert. Notch-Zielgene wie Hey 1/2 kontrollieren die Expression von EphrinB2 und damit die arterielle Differenzierung (Fischer, Schumacher et al. 2004). Vor allem der Prozess der embryonalen Gefäßneuentwicklung, Angiogenese, wird durch dieses Rezeptor-Liganden-Zusammenspiel programmiert (Gerhardt, Golding et al. 2003, Hellstrom, Phng et al. 2007). Darüber hinaus haben Arterien und Venen eine divergierende Gefäßarchitektur. Arterien haben engere endotheliale

Verbindungspunkte, eine dickere Media und einen eigenen Puls. Die Ursachen oder molekularen Determinanten dieser arteriovenösen Heterogenität, die vor allem im Laufe der Embryonalentwicklung eine Rolle spielt, sind nicht vollständig verstanden. Zum einen scheinen endotheliales EphrinB2 und venöses EphB4 eine entscheidende Rolle bei der Etablierung der endothelialen arteriovenösen Divergenz zu spielen. Zum anderen wird die Differenzierung von Arterien und Venen auch durch biomechanische Unterschiede, wie Fluss oder Druck bestimmt (le Noble, Moyon et al. 2004).

1.2 Aufbau und Funktion der Blutgefäße

Arterien und Venen sind grundsätzlich aus drei Wandteilen (Tunicae) aufgebaut, die ausgehend vom Lumen folgendermaßen benannt sind: Tunica interna, die aus Endothelzellen (ECs) und dem subendothelialen Raum besteht. Darauf folgt – abgegrenzt durch die Lamina elastica interna - die Tunica media, die aus glatten Muskelzellen (SMCs) aufgebaut ist und mit der Lamina elastica externa endet. Die Tunica adventitia ist die Bindegewebsschicht, die das Gefäß umschließt und in den Gewebeverband integriert ist. Die ECs und die SMCs stehen parakrin in direkter Kommunikation und funktioneller Beziehung.

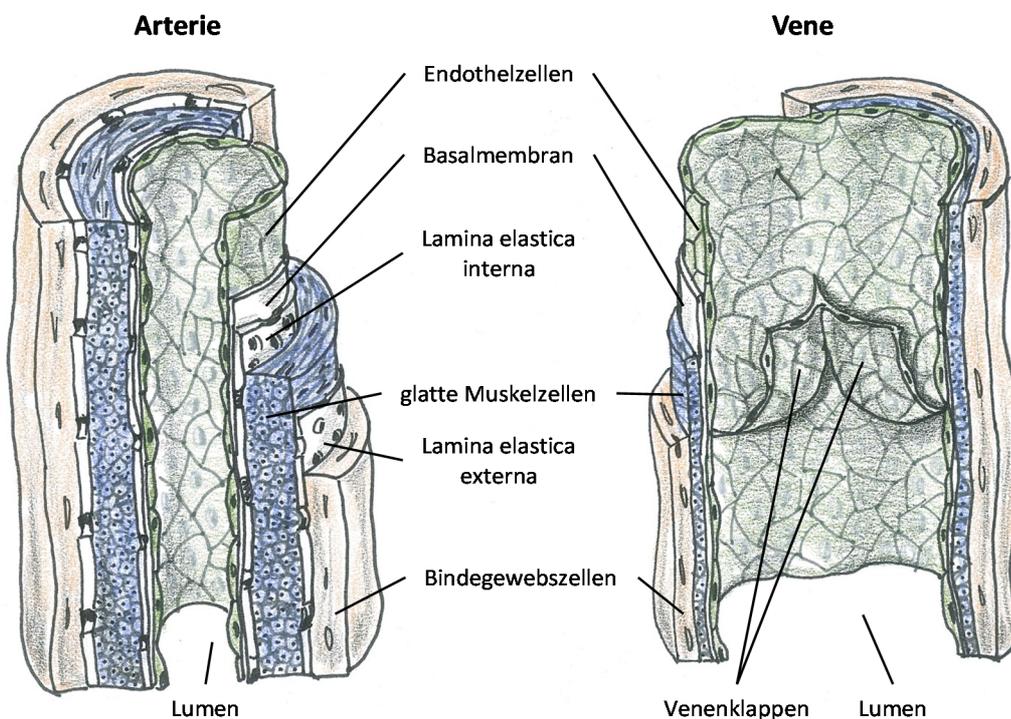


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Gefäßaufbaus. Die Tunica interna besteht aus der Endothelzellschicht, der Basalmembran und der Lamina elastica interna. Darauf folgt die Tunica media bestehend aus den glatten Muskelzellen und der Lamina elastica externa und die Tunica adventitia liegt dem Intravasalraum an und ist aus Bindegewebszellen aufgebaut. Schema nach Tortora, Derrickson, *Principles of Anatomy and Physiologie*, 11th Edition, Wiley and Sons.

Die Endothelzellschicht hat die Funktion einer Barriere zwischen dem Gefäßlumen und der Gefäßwand bzw. dem Intravasalraum und dem interstitiellen Raum. Die ECs kleiden das Gefäßlumen als einschichtiges Endothel aus. Dieses bildet die Grundlage für eine selektive Permeabilität unter anderem für Botenstoffe und eine bedarfsgerechte und lokale Interaktion mit zirkulierenden Immunzellen. Durch ihre direkte Exposition zum fließenden Blut und damit zu unterschiedlichen chemischen und humoralen Stimuli, bildet die Endothelzellschicht die Grundlage für die Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase (Davies 1995, Chien 2007). Darüber hinaus beeinflusst sie nicht nur die Diffusion von Botenstoffen aus dem Blut, sondern sie kommunizieren auch parakrin mit den SMCs durch Ausschüttung von Wachstumsfaktoren oder stimulierenden sowie inhibierenden Faktoren. Über diesen Weg kontrollieren sie parakrin unter anderem die Kontraktion (beispielsweise durch Stickstoffmonoxid) bzw. myogene Antwort der Gefäße, autokrin die Adhärenz von Immunzellen (beispielsweise CD40 (Korff, Aufgebauer et al. 2007, Wagner, Hildebrandt et al. 2011) oder VCAM-1) und damit auch komplexere vaskuläre Remodellierungsprozesse (Chiu and Chien 2011), wie beispielsweise die Angiogenese (Yancopoulos, Davis et al. 2000, Herbert and Stainier 2011) oder die Arteriogenese (siehe 1.5.3).

Im Gegensatz zu den ECs sind die SMCs der Media ringförmig und mehrschichtig angeordnet. Ihr Expressionsmuster unterscheidet sich von dem der ECs beispielweise hinsichtlich Kontraktilitäts-vermittelnder Genprodukte. So exprimieren SMCs Gene wie glattmuskuläres Aktin (*smooth muscle actin* (SMA)), die glattmuskuläre, schwere Kette des Myosins (*smooth muscle myosin heavy chain* (SM-MHC)), die leichte Kette des Myosins (*myosin light chain 2* (MLC2)) oder Calponin. Durch ihre ringförmige Kontraktion bzw. Dilatation im Verbund regulieren sie die myogene Antwort bzw. den Gefäßtonus über die Veränderung des Gefäßdurchmessers. Das Gen-Expressionsmuster der SMCs ist an ihre jeweilige Lokalisation und die an sie gestellten Anforderungen angepasst. So unterscheiden sich SMCs der Aorta von denen der kleinen Widerstandsgefäße. Sie sind an die organspezifische Mikroumgebung adaptiert, um eine optimale Blutversorgung spezifischer Organteile zu garantieren (Michel, Li et al. 2012). Die SMCs werden durch die Extrazellulärmatrix (ECM) umfasst, wobei diese durch die Expression proteolytischer Enzyme und Proteine durch die SMCs moduliert wird. So unterscheidet sich auch die Komposition der ECM der einzelnen Gefäßtypen. Die ECM der Aorta enthält beispielsweise mehr Elastin als die Gefäßwand der Venen, die wiederum einen höheren Anteil Kollagen-Typ-1 (Kollagen-I) besitzt. Auch die kleinen Arterien bzw. Arteriolen haben einen relativ hohen Elastinanteil, was ein Grund ihrer Dehnbarkeit und Anpassungsfähigkeit an erhöhten Blutdruck oder -Fluss ist.

Im Fokus dieser Arbeit wird die Rolle der arteriellen SMCs im Zuge dieser Reorganisationsprozesse stehen. Im Alter (Qiu, Zhu et al. 2010) oder durch maladaptive vaskuläre Remodellierungsprozesse

(Palatini, Casiglia et al. 2011) reduziert sich der Elastinanteil in der ECM und führt zu einer Versteifung von arteriellen Gefäßen. Im Rahmen solcher Umbauprozesse ändern SMCs ihren Phänotyp - Prozesse, die durch humorale Mediatoren sowie beispielsweise durch Lipide, Hyperglykämie, oxidativen Stress oder durch biomechanische Stimuli (erhöhte Wandspannung bzw. Dehnung) initiiert werden (siehe 1.6).

1.3 Blutdruckregulation

Die Kontrolle des Blutdrucks ist abhängig von der Kontraktionsfähigkeit der arteriellen glatten Muskelzellen und unterliegt einer Reihe unterschiedlicher Regulationsmechanismen. So kann der Blutdruck lokal oder systemisch über neurohumorale Mechanismen (z.B. Sympathikus-vermittelte Ausschüttung von Noradrenalin), den Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt (z.B. Volumen-vermittelte Vasodilatation bzw. Vasokonstriktion), die Temperatur (Wärme-vermittelte Vasodilatation in der Haut) und den Sauerstoffpartialdruck (Vasokonstriktion schlecht ventilierter Bereiche in der Lunge) kurz- und langfristig reguliert werden.

Der systolische Blutdruck (liegt beim Menschen in Ruhe physiologisch bei 100-130 mmHg) wird definiert durch das Schlagvolumen des linken Ventrikels und die Frequenz mit der dieser pumpt. Darüber hinaus ist die Systole ein Ausdruck für das zirkulierende Blutvolumen. Der diastolische Druck (liegt in Ruhe physiologisch bei 60-80 mmHg) ist der Ruhedruck im Kreislaufsystem, der insbesondere durch den Tonus der Widerstandsgefäße bestimmt wird. Daher entspricht der diastolische Druck weitgehend dem totalen, durch den Kontraktionszustand der glatten Muskelzellen in diesen Blutgefäßen hervorgerufenen, peripheren Widerstand.

Die axiale Blutdruckdifferenz zwischen zwei Punkten im Gefäßsystem und damit die Organdurchblutung (Ohm'sches Gesetz) wird weitgehend über die Einstellung des Gefäßdurchmessers und damit den Gefäßwiderstand (R) reguliert. Ein klassisches Beispiel für die Induktion einer Vasokonstriktion ist die Aktivierung des Sympathikus in Stresssituationen. Die neuronale Kontrolle über den Blutdruck läuft über die Ausschüttung von Noradrenalin (und sekundär Adrenalin aus der Nebennierenrinde) aus den sogenannten Varikositäten. Dieser Neurotransmitter bindet vorrangig an die α 1-Adrenorezeptoren der SMCs kleiner Arterien und Arteriolen, die insbesondere in der Haut, der Muskulatur und dem Gastrointestinaltrakt zu finden sind. So führt Noradrenalin zu einer G-Protein-vermittelten Kontraktion (siehe 1.4) der glatten Muskelzellen und in Ihrer Gesamtheit, neben der durch Noradrenalin vermittelten Erhöhung der Auswurfleistung des Herzens und damit des systolischen Blutdrucks, zu einer Erhöhung des diastolischen Blutdrucks. In

den betroffenen Organen kommt es in Folge dieser Kontraktion zu einer verminderten Durchblutung, sodass starker Stress (bzw. Schockzustände) beispielsweise zu einer Blässe der Haut führen kann.

Ein Beispiel für eine neuronal stimulierte Vasodilatation ist in den zuführenden Gefäßen des genitalen Schwellkörpers des Penis bzw. der Klitoris zu finden. Hier führt eine durch sexuelle Erregung verursachte Aktivierung des Parasympathikus zu einer Ausschüttung von Acetylcholin. Acetylcholin bindet an die muskarinergen (M3-) Rezeptoren der ECs dieser Gefäße und stimuliert Aktivität der endothelialen Stickstoffmonooxide Synthase (eNOS) und so die Produktion und Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO), welches als starker Dilatator auf glatte Muskelzellen wirkt (siehe 1.4). In der Folge kommt es zur Dilatation der Schwellkörpergefäße und zur Erektion.

Ein weiterer klassischer Mechanismus über den eine Vasodilatation realisiert wird, ist die Freisetzung von Metaboliten z.B. in der arbeitenden Muskulatur. Zu solchen Stoffwechselprodukten zählt beispielsweise Adenosin, das durch Bindung an A2A und A2B-Adenosinrezeptoren arterieller glatter Muskelzellen bindet und deren Relaxation verursacht. Auch die im arbeitenden Muskel erhöhte Freisetzung von Protonen und Kaliumionen steigern die Kaliumleitfähigkeit und die Aktivität der Natrium-Kalium-ATPase in der glatten Gefäßmuskulatur, was in der Folge zu einer Hyperpolarisation der Zellen und einem verminderten Calciumeinstrom über spannungsgesteuerte L-Typ Calciumkanäle führt. Die Konsequenz dieser Mechanismen ist eine Vasodilatation, die mit einer verbesserten Perfusion der Arbeitsmuskulatur verbunden ist.

Auch biomechanische Parameter können Einfluss auf die Kontraktion der glatten Muskelzellen nehmen und damit blutdruckregulierend wirken (Hahn and Schwartz 2009). So führt erhöhter Blutfluss beispielsweise über die Erhöhung der auf die ECs wirkenden Schubspannung ebenfalls zu einer vermehrten Produktion von NO, was wiederum vasodilatatorisch auf die SMCs wirkt und den Blutdruck senkt. Im Gegensatz dazu führt eine Erhöhung der Wandspannung bei Bluthochdruckerkrankungen eher zu einer gegenregulatorischen Konstriktion der glatten Muskelzellen und somit zu einer weiteren Erhöhung des diastolischen Blutdruckwertes.

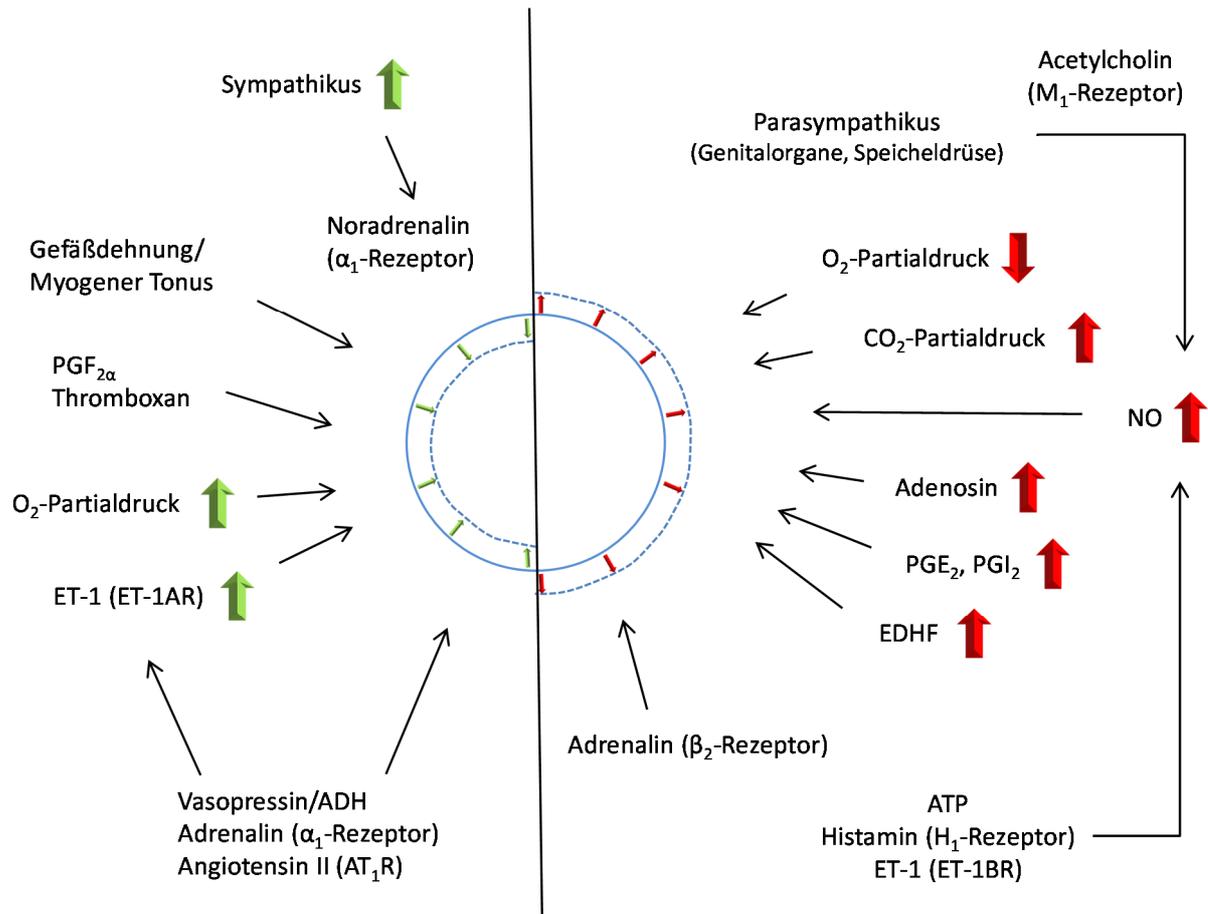


Abbildung 2: Übersichtsbild der unterschiedlichen neuronalen bzw. humoralen vasokonstriktiven bzw. vasodilatatorischen Stimuli. Diese wirken einerseits auf die Endothelzellen und vermitteln so indirekt die Kontraktion der SMCs über die ECs, als auch direkt auf die medialen SMCs. PGF_{2α} (Prostaglandin F_{2α}), ET-1 (Endothelin-1), ET-1AR (Endothelin-1 A Rezeptor), AT₁R (Angiotensin-1-Rezeptor), Stickstoffmonoxid (NO), PGE₂ (Prostaglandin E₂), PGI₂ (Prostaglandin I₂), EDHF (*endothelium derived hyperpolarising factor*), ATP (Adenosin-Triphosphat), ET-1BR (Endothelin-1 B Rezeptor). Nach Silbernagel und Despopoulos, Taschenbuch der Physiologie, 6. Auflage, 2003

1.4 Mechanismen der glattmuskulären Kontraktion

Die vorgestellten unterschiedlichen und vielfältigen Mechanismen, die zur Regulation des Blutdruckes beitragen, wirken zum größten Teil auf dieselben Zielmoleküle, die dann die Kontraktion der SMCs vermitteln. Diese geschieht primär über den Phosphorylierungsstatus der leichten Kette des Myosins, welche durch die Bindung an Aktin eine Kontraktion bzw. durch das Lösen der Bindung eine Relaxation induziert.

Im Detail betrachtet, wird die glattmuskuläre Kontraktion über die Phosphorylierung und Dephosphorylierung bzw. Inaktivierung oder Aktivierung der *myosin light chain phosphatase* (MLCP) und die Calcium/Calmodulin-abhängige Aktivierung der *myosin light chain kinase* (MLCK) gesteuert. Die Interaktion zwischen dem phosphorylierten Myosin und Aktinfilamenten löst den eigentlichen Kontraktionszyklus der glatten Muskelzelle aus. Entscheidend dabei ist, dass das Gleichgewicht der

reversiblen Phosphorylierung der MLC nach rechts verschoben wird, dadurch kommt es zu einer raschen Erhöhung des Tonus, die auch als phasische Kontraktion bezeichnet wird. Dazu muss die intrazelluläre freie Calciumkonzentration in den SMCs rasch erhöht werden. Dieses bindet an Calmodulin, wodurch die Calcium/Calmodulin-abhängige CaM-Kinase (CaMK) MLCK aktiviert wird und die MLC phosphoryliert. Um nach dieser schnellen phasischen Kontraktion den Tonus der SMCs aufrechtzuerhalten, wird die regulatorische Untereinheit der MLCP inhibiert. Dazu wird über eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) ein inhibitorisches Protein aktiviert (CPI-17), welches an der regulatorischen Untereinheit der MLCP angreift und diese so hemmt. Dadurch bleibt die MLC phosphoryliert und die SMCs können ihren Tonus halten. Dieser Prozess wird als tonische Kontraktion bezeichnet. Derselbe Effekt wird erzielt bzw. diese tonische Kontraktion weiter verstärkt, wenn die Rho-Kinase die katalytische Untereinheit der MLCP phosphoryliert und diese dadurch ebenfalls hemmt (Morano 2003). Der α 1-Adrenorezeptor ist ein klassischer Kontraktionsstimulierender Rezeptor, der bevorzugt durch Noradrenalin gebunden wird. Er ist $G_{\alpha_{q/11}}$ -gekoppelt, wobei die α -Untereinheit des G-Protein die Phospholipase C (PLC) stimuliert. Dieses Enzym spaltet PIP_2 in IP_3 und DAG. Durch die Bindung an den IP_3 -Rezeptor des Sarcoplasmatischen Retikulums (SR) bewirkt IP_3 eine Freisetzung von Calcium und damit die Aktivierung der MLCK. (Wier and Morgan 2003). DAG stimuliert die PKC, wodurch es zu der CPI-17-vermittelten Hemmung der MLCP kommt. Gleichzeitig kann Noradrenalin über die α -Untereinheit des $G_{\alpha_{12/13}}$ -Proteins den Rho-Kinase-Signalweg aktivieren und damit zusätzlich die MLCP hemmen.

Weitere Rezeptoren, die ebenfalls über den $G_{\alpha_{q/11}}$ - bzw. $G_{\alpha_{12/13}}$ -gekoppelten-Signalweg zur Kontraktion führen, sind der Endothelin-1-Rezeptor A (ET_A) oder der Angiotensin-1-Rezeptor (AT_{1R}) (Halayko and Solway 2001). β 1-Adrenorezeptoren werden ebenfalls durch die Bindung von Noradrenalin bzw. Adrenalin aktiviert und verstärken unter anderem den Calciumeinstrom über den G_{α_s} -Signalweg – beispielsweise bei der Kontraktion von Kardiomyozyten (Kauffenstein, Laher et al. 2012). Dieser führt über die Stimulation der AC zu einer Steigerung des intrazellulären Spiegels von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und damit zu einer Aktivierung der Proteinkinase A. Diese phosphoryliert unter anderem die spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanäle, wodurch die Wahrscheinlichkeit für deren Öffnung steigt (positiv ionotroper Effekt). In glatten Muskelzellen bewirkt die Bindung von Adrenalin an den identisch gekoppelten β_2 -Adrenorezeptor allerdings eine Vasodilatation, da die PKA unter anderen über Telokin die regulatorische Untereinheit der MLCP phosphoryliert und damit aktiviert. Gleichzeitig phosphoryliert die PKA die MLCK und hemmt diese bzw. aktiviert die Calcium ATPase des Sarcoplasmatischen Retikulums (SERCA) wodurch der Calciumspiegel sinkt und die Calcium/Calmodulin-abhängige Stimulation der MLCK stoppt (Secomb 1995, Carlson, Arciero et al. 2008, Secomb 2008).

Vasokonstriktoren wie Angiotensin II oder Endothelin-1 können auch an Rezeptoren (AT_2R bzw. $ET_B R$) auf der Oberfläche der ECs binden. Diese sind ebenfalls $G\alpha_{q/11}$ -gekoppelt, sodass es zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in den ECs kommt. Die Bindung von Calcium an das von der endothelialen NO Synthase (eNOS) gebundene Calmodulin führt zu einer Dimerisierung des Enzyms und damit zu dessen Aktivierung. Das aus den ECs vermehrt freigesetzte NO aktiviert die lösliche Guanylatzyklase (GC) in den SMCs. Der resultierende Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration bewirkt über die Aktivierung der PKG unter anderem eine Sequestrierung von Calcium und damit indirekt eine Hemmung der MLCK sowie ebenfalls über Telokin eine Stimulation bzw. Entthemmung der MLCP. Darauf folgt die Relaxation der SMCs. Der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in den ECs, der auch über andere Vasodilatoren wie ATP oder Histamin hervorgerufen werden kann, führt neben der Stimulation der eNOS auch zu einer vermehrten Freisetzung von Arachidonsäure aus den Phospholipiden der Endothelzellmembran über die Calcium-aktivierbare Phospholipase A_2 . Das Ergebnis ist eine verstärkte Bindung von Arachidonsäuremetaboliten wie dem Prostaglandin I_2 (PGI_2) oder Prostacyclin und zumindest einer Variante des sogenannten *endothelium derived hyperpolarising factor* (EDHF). PGI_2 bewirkt über die Bindung an den entsprechenden Rezeptor auf der Oberfläche der SMCs einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration, die zu einer Relaxation der SMCs führt. EDHF aktiviert Calcium-abhängige Kaliumkanäle in den SMCs. Die resultierende Hyperpolarisation führt zu einem Schließen der spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanäle, dem Sinken des intrazellulären Calciumspiegels und damit in der Relaxation der Zelle. Der wichtigste Stimulus für eine Erhöhung der Schub- und Wandspannung, welche letztlich die Calciumsensitivität der eNOS steigert, ist NO. Da jede Verringerung des Gefäßdurchmessers zu einem Anstieg der Wandschubspannung und damit der Freisetzung von NO führt, ist die eNOS-Freisetzung der natürliche Gegenspieler einer neurogenen oder myogen vermittelten Vasokonstriktion und verhindert, dass diese ebenso wie eine vasokonstriktorische Wirkung der vorgenannten neuro-humoralen Stimuli übersteigt.

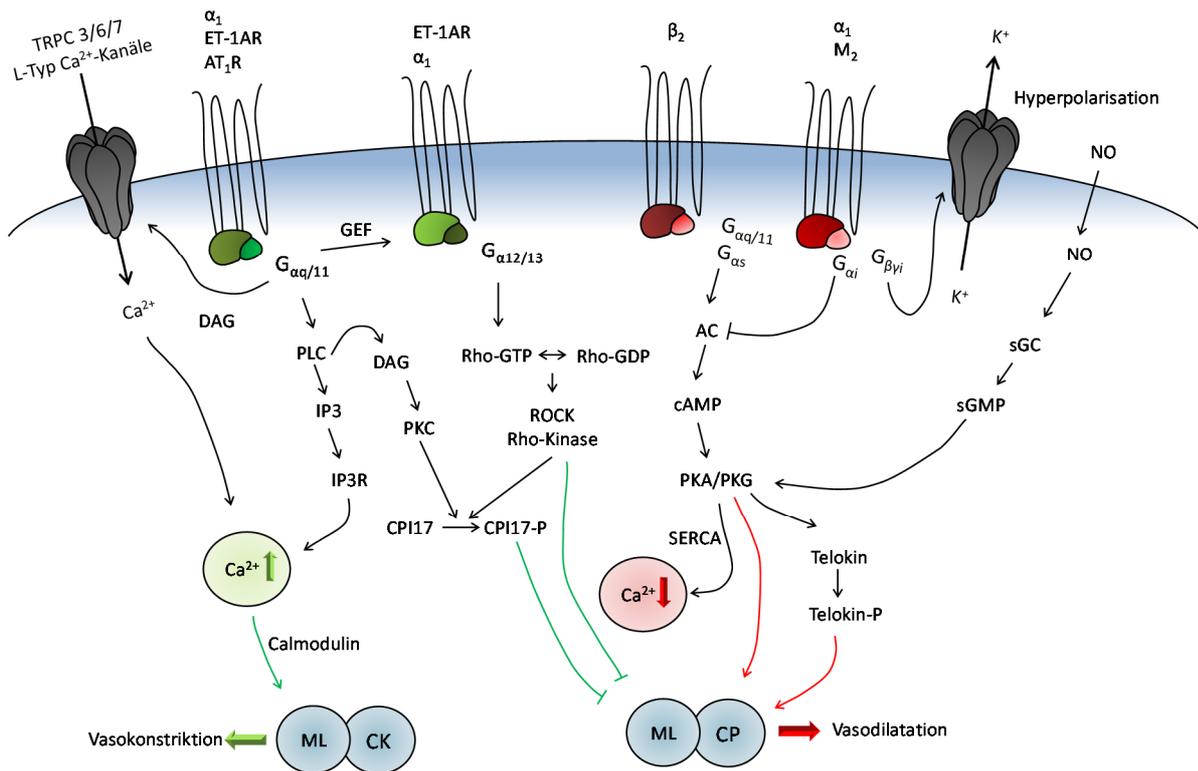


Abbildung 3: Übersicht über Aktivierungs- bzw. Inaktivierungsmechanismen der MLCP bzw. MLCK und damit der glatten muskulären Kontraktion. Im Schaubild ist eine Auswahl der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der SMCs skizziert, die zur Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung der leichten Kette des Myosins führen.

Die vorgestellten Regulationsmechanismen führen zu einer Adaption des Durchmessers der Widerstandsgefäße und damit des Blutdruckes an veränderte Parameter. Eine chronische Stimulation vasokonstriktorischer Signalwege bzw. Konstriktion der SMCs führt jedoch zu einer maladaptiven Änderung der Gefäßzellen. Diese äußert sich in einer verstärkten Zunahme der Gefäßwand und damit einer Verengung des Innenradius, um die gesteigerte Wandschubspannung auszugleichen.

1.5 Erkrankungen des Blutgefäßsystems

Herz-Kreislauferkrankungen sind in Deutschland nach wie vor die häufigste Todesursache. Kardiovaskuläre Erkrankungen gehen ursächlich entweder auf eine vaskuläre Pathologie zurück oder sie sind die Folge einer Pathologie des Herzens, wie beispielsweise der Kardiomyopathie oder dem Herzversagen (Borlaug and Redfield 2011), welches anteilig die höchste Inzidenz hat. Hier ist die Auswurfleistung des linken Ventrikels bereits in Ruhe stark vermindert. Symptome für ein kardiales Versagen sind: Müdigkeit, Atemlosigkeit, Ödeme in der Lunge (Linksherzversagen) oder in den Beinen (Rechtsherzversagen) oder eine geringe körperliche Belastbarkeit. Um die reduzierte Kontraktionsfähigkeit des Herzens zu kompensieren, kommt es zunächst zu einer Zunahme der Wanddicke des betroffenen Ventrikels (Hypertrophie), die durch den gleichzeitig stattfindenden

Bindegewebsumbau zu einer Aussackung (Dilatation) des betroffenen Ventrikels führen kann. Das resultierende Missverhältnis aus zu großem Volumen bei maximal verdickter Wand kann nicht mehr kompensiert werden und die Auswurfleistung sinkt stark. Eine solche kardiale Dysfunktion bewirkt über die verringerte Auswurfleistung bzw. in der Regel eine Verminderung des systolischen Blutdrucks, der zu einer Adaption der Gefäße an den niedrigen Füllungsdruck führt. Dieser wird durch eine Erhöhung des Gefäßtonus ausgeglichen, die um ihrerseits zu einer maladaptiven Anpassung der Gefäßwand (Hypertrophie) führen und damit eine vaskuläre Pathologie induzieren kann.

1.5.1 Arteriosklerose

Arterielle Gefäßerkrankungen wie beispielsweise die Arteriosklerose werden durch Risikofaktoren wie Dyslipidämie, Rauchen, genetische Prädisposition, Diabetes oder rheumatoide Arthritis verstärkt bzw. beschleunigt und gehen mit dem Risiko eines Gefäßverschlusses einher. Ursächlich für Arteriosklerose scheint ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren zu sein. Die besondere hämodynamische Situation an arteriosklerotischen Prädilektionsstellen (Korff, Aufgebauer et al. 2007) und damit der Verlust der unidirektional wirkenden Wandschubspannung und folglich die Verringerung der endothelialen NO-Freisetzung (Moore, Xu et al. 1994). Zusätzlich führt die zyklische Dehnung der Gefäßwand (in Folge der Reflexion der Pulswellen) zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und einer verminderten Bioverfügbarkeit von NO. Diese wird oft als endotheliale Dysfunktion diagnostiziert (Wentzel, Chatzizisis et al. 2012). Da NO die Expression pro-arteriosklerotischer Genprodukte in den ECs wie *monocyte chemotactic protein 1* (MCP-1) oder VCAM-1 nun nicht mehr hemmen kann, kommt es zu einer vermehrten Rekrutierung von Leukozyten, vor allem Monozyten und Lymphozyten unterhalb der Intima (Doran, Meller et al. 2008). Vor allem in Regionen, die keinen Fluss erfahren, wird dieser Prozess begünstigt. Durch die erhöhte endotheliale Permeabilität gelangen vermehrt *low density* Lipidproteine (LDL) in die Gefäßwand, die durch die relative Überproduktion reaktiver Sauerstoffspezies vermehrt in oxidiertes LDL (oxLDL) umgewandelt werden (McNally, Davis et al. 2003). OxLDL wiederum verstärkt den Entzündungsprozess und bewirkt über die verstärkte Expression von *scavenger* Rezeptoren zunächst auf den Makrophagen und später auf den in die Intima ausgewanderten SMCs - die sogenannte Schaumzellen. Diese gehen zum Teil durch Nekrose zugrunde und bilden sog. Fettstreifen unter der Endothelzellschicht (Nakashima, Wight et al. 2008).

Darauf folgend kommt es zur Ausbildung einer fibrösen Kappe aus den neointimalen SMCs und der Matrixsynthese. Dieser wachsende arteriosklerotische Plaque durch die persistierende Entzündungsreaktion und damit der Stimulation von Zytokinen (von Makrophagen und

T-Helferzellen) (Orr, Hastings et al. 2010) und die Reorganisation der ECM durch die Proteinsynthese und Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen (MMP) und sukzessive ausgedünnt (Moore and Fisher 2012). Die Entwicklung der Verlauf des arteriosklerotischen Krankheitsbildes ist ein sich selbst verstärkender Prozess, so werden beispielsweise die SMCs durch die Lipide selbst zu glattmuskulären Schaumzellen (Allahverdian, Pannu et al. 2012) bzw. durch Zytokine oder die Makrophagen und die umstrukturierte ECM angeregt. Es entsteht ein sogenannter vulnerabler Plaque mit einer fragilen, fibrösen Kappe und einem ausgeprägten nekrotischen Kern, der jederzeit einreißen und dadurch einen thrombotischen Verschluss der betroffenen Arterie verursachen kann. Etwa 90 % der Herzinfarkte, ein Drittel der Schlaganfälle und peripheren, arteriellen Verschlusskrankheiten sind auf die Ruptur eines vulnerablen Plaques zurückzuführen.

1.5.2 Hypertension

Die chronische Erhöhung des arteriellen Blutdrucks begünstigt oder beschleunigt die Entstehung von Arteriosklerose und damit auch deren Folgeerscheinungen wie Myokardinfarkt, Schlaganfall oder Herzinsuffizienz. Eine systemische Hypertonie entwickelt sich beispielsweise als Folge einer Nierenarterienstenose oder Niereninsuffizienz (Mulvany 2002). Die Nierenaktivität reguliert das Gesamtblutvolumen durch die glomeruläre Filtrationsrate und die Natrium-/Wasserresorption entlang der Nierentubuli. Vor diesem Hintergrund führt beispielsweise eine Niereninsuffizienz zu einem Anstieg des zirkulierenden Blutvolumens, einer Steigerung der Volumenbelastung für das rechte Herz und konsekutiv zu Bluthochdruck und Herzinsuffizienz.

Ein weiterer Mechanismus, der zu erhöhtem Blutdruck führt und die Nieren involviert, ist vom Renin-Angiotensin-Aldosteron-System abhängig. So führt eine Minderdurchblutung der Nieren grundsätzlich zu einer Stimulation der Reninfreisetzung aus den Granulazellen der distalen Vas afferentia. Die Ausschüttung von Adenosin stimuliert in der Folge die Freisetzung von Renin. Diese Protease spaltet das Dekapeptid Angiotensin I aus dem Protein Angiotensinogen ab, das aus der Leber stammt. Das endothelständige *Angiotensin-converting-enzyme* (ACE) spaltet (hauptsächlich in der Lunge) die beiden Carboxyterminalen Aminosäuren aus dem Angiotensin I zu Angiotensin II. Angiotensin II erhöht über den glattmuskulären $G\alpha_{q11}$ -gekoppelten AT_1R den peripheren Gefäßwiderstand und dadurch systemisch den diastolischen Blutdruck (Feihl, Liaudet et al. 2006) (siehe 1.4). Zudem ist Angiotensin II der stärkste Stimulator der Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde. Zusammen mit dem antidiuretischen Hormon (ADH, Vasopressin) aus dem Hypothalamus fördert Aldosteron die Wasserretention in den Sammelrohren der Niere, sodass das zirkulierende Blutvolumen ansteigt und auch der systolische Blutdruck angehoben wird. Das Ergebnis ist eine deutliche Steigerung des mittleren, arteriellen Drucks, der auf Kosten eines systemischen Bluthochdruckes die Blutversorgung der Niere normalisiert.

Die direkte Erhöhung des Tonus der Widerstandsgefäße spielt insbesondere bei der Erhöhung des diastolischen Blutdruckwertes eine entscheidende Rolle und wirkt sich besonders schädlich auf die Struktur und Funktion dieser Gefäße und damit der Organdurchblutung aus. Die Ursachen für diesen zumeist idiopathischen Blutdruckanstieg sind vielfältig und weniger gut charakterisiert. Besser bekannt sind Faktoren, die zu einer Manifestation der Hypertonie beitragen, wie beispielsweise eine dauerhaft erhöhte Sympathikusaktivität (neuro-humorale Stimulation).

Eine chronische Hypertension führt – unabhängig von der Ursache - in der Konsequenz immer zu einer kompensatorischen Verdickung der Media mit einer gleichzeitigen Verengung des Durchmessers (*inward remodeling*) (Christensen and Mulvany 2001, Ibrahim and Berk 2009). Eine Erklärung für diese Art der Kompensation (Mulvany 1993, Mulvany 1993) findet sich im Gesetz nach Laplace: $S_t = \frac{(\Delta P_{tm})r}{h}$, wobei die (zirkumferentielle) Spannung in der Gefäßwand (S_t), dem Produkt aus transmuraler Druckdifferenz (ΔP_{tm}) und Radius' (r) in Abhängigkeit von der Wanddicke (h) entspricht. Demnach wird ein Anstieg von der transmuralen Druckdifferenz - wie auch im Herzen - mit der Verdickung der Gefäßwand beantwortet, um die Wandspannung auf einen normalen Wert zu reduzieren (Li 2006). Dieser initial vorteilhafte Anpassungsprozess wird maladaptiv durch die gleichzeitige Verringerung des Gefäßdurchmessers und der dadurch bedingten Steigerung des Gefäßwiderstandes. Die Initiation der vaskulären Remodellierung per se ist also ein Vorgang, um den Fluss, die Schubspannung oder die Wandspannung auf einem physiologischen möglichst niedrig zu halten (Julius 1988). Lediglich durch die aktive Kontraktion der SMCs gelingt das nur für kurze Zeit, langfristig muss die Struktur der Gefäßwand verändert werden (Arribas, Hinek et al. 2006). Die Verdickung der Gefäßwand wird durch eine Hyperplasie oder Hypertrophie der SMCs erreicht. Diese Abnahme des Durchmessers von Widerstandsgefäßen wurde bislang im Kontext von Hypertension unterschiedlicher Ursachen (essentielle bzw. sekundäre Hypertension) beschrieben (Schiffrin, Deng et al. 1993, Rizzoni, Muiesan et al. 1998, Rizzoni, Porteri et al. 1998, Rizzoni, Porteri et al. 2000) sowie in unterschiedlichen Tiermodellen zur Initiation von Hypertension (Arribas, Gonzalez et al. 1997, Arribas, Hillier et al. 1997, Intengan, Park et al. 1999, Intengan, Thibault et al. 1999). Der Theorie des druckbedingten *inward remodelings* (Mulvany 1993, Mulvany 1993) stehen opponierende Überlegungen gegenüber (Korner and Angus 1997, Bund and Lee 2003). Bund und Lee beschreiben die Gefäßwandverdickung eher als Folge einer verringerten Elastizität, des Verlustes der Funktion oder einer veränderten Wandstruktur, nicht jedoch als direkte Reaktion auf den erhöhten Blutdruck. (Bund and Lee 2003, Bund and Lee 2003).

1.5.3 Arteriogenese

Eine andere Form arterieller Remodellierung ist das sog. *outward remodeling*, welches z.B. im Rahmen der Arteriogenese – der Vergrößerung von Kollateralen, kleinen Arteriolen zu Arterien infolge einer chronischen Flusserhöhung – stattfindet. Auch dieser Prozess lässt sich mit Hilfe der Laplace-Beziehung erklären: Der durch Verschluss oder Stenosen einer Leitungsarterie gesteigerte Fluss in kollateralen Arteriolen führt durch die schubspannungsabhängige Freisetzung von NO zu einer anhaltenden Vasodilatation (siehe Abbildung 4). Die Steigerung der Schubspannung initiiert die vermehrte Produktion von NO in den ECs, was in den SMCs der Media zur vermehrten Aktivierung der MLCP führt. Durch die NO-vermittelte Aufweitung des Gefäßes nimmt die glattmuskuläre Wandspannung in den kollateralen Arteriolen zu. Das Ergebnis ist eine Hyperplasie der SMCs in diesen Gefäßen, wodurch die Muskelmasse damit die Dicke der Gefäßwand zunimmt. Durch glattmuskuläre Proliferation wird die Wanddicke vergrößert

(Hahn and Schwartz 2009, van den Akker, Schoorl et al. 2010). Die Schubspannung (τ) einer Newton'schen Flüssigkeit lässt sich mit der folgenden Formel beschreiben: $\tau = \frac{4\eta Q}{\pi r^3}$. Basierend auf dieser Korrelation ist die Schubspannung durch das Produkt der Viskosität (η) und der Flussgeschwindigkeit (Q) in Relation mit der dritten Potenz des Radius' (r) definiert. Die Erweiterung des Gefäßradius kompensiert so teilweise die Steigerung der Schubspannung in den kollateralen Arteriolen (Li 2006).

Die Arteriogenese kann also als eine Form des postembryonalen Gefäßwachstums betrachtet werden, wobei bereits vorhandene kollaterale Arteriolen zu funktionsfähigen kollateralen Arterien wachsen (van Royen, Piek et al. 2001). Mit Hilfe eines solchen Remodellierungsprozesses kann auch

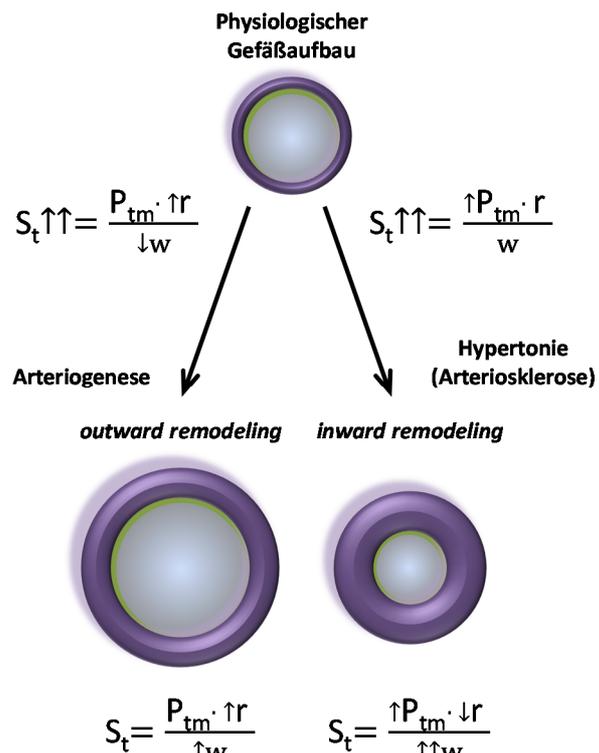


Abbildung 4: Gegenüberstellung der auslösenden Faktoren (mal)adaptiver, arterieller Remodellierung sowie deren Ausprägung. Die Gleichung nach Laplace zeigt die Wirkung der erhöhten Wandspannung (S_t) als den initialen Stimulus, der auf die Gefäße wirkt und eine vaskuläre Reorganisation stimuliert. Im Falle der Arteriogenese kommt es zu einer ausgleichenden Steigerung des Gefäßradius (r) und einer Steigerung der Wanddicke (w), das als sog. *outward remodeling* bezeichnet wird. Die chronische, systemische Erhöhung des Blutdrucks (Hypertension) zeichnet sich durch eine erhöhte Wandspannung (S_t) und transmurale Druckdifferenz (P_{tm}) aus. Das darauf folgende sog. maladaptive *inward remodeling* gleicht diese hämodynamischen Stimuli durch eine Verringerung des Radius (r) und einer Steigerung der Wanddicke (w) aus.

nach Verschluss einer Leitungsarterie eine ausreichende Sauerstoffversorgung distaler Regionen gewährleistet werden, indem freie Umgehungskreisläufe. 1971 stellten Schaper et al erstmals einen Zusammenhang zwischen der Arteriogenese und einem pathophysiologischen Ereignis her (Schaper, De Brabander et al. 1971): Durch die Okklusion der linken Koronararterie eines Hundes wurde die Vergrößerung der kollateralen Gefäße im Verlauf von drei Wochen provoziert. Die radioaktive Markierung sich teilender medialer Zellen zeigte einen Anstieg proliferierender SMCs in den remodellierenden Arteriolen. Die Vergrößerung des Lumens basiert daher nicht nur auf einer Gefäßdilatation, sondern auch auf einer Vermehrung vor allem der SMCs in den betroffenen Gefäßen. Die lokal begrenzte glattmuskuläre Hyperplasie (van den Akker, Schoorl et al. 2010) führt zu deren typischen Korkenzieher-artigen Erscheinungsbild dieser Gefäße. Die verstärkte Proliferation der SMCs hat eine Verlängerung der remodellierenden Arteriolen zur Folge, da diese jedoch im Bindegewebe verankert sind, weicht das länger werdende Gefäß aus und dies äußert sich morphologisch in der erwähnten Korkenzieher-artigen Struktur (Heil, Eitenmuller et al. 2006). Die Anpassung dieser Arteriolen führt zu einer deutlich verbesserten Perfusion des unterversorgten Gewebes. Dies kann experimentell mit Hilfe des sog. *hindlimb-ischemia*-Modells bei Mäusen durch die Ligation der Femoralarterie und die anschließende Laser-Doppler-gestützte Analyse der Durchblutung des Hinterlaufs visualisiert werden (Prior, Lloyd et al. 2004, Limbourg, Korff et al. 2009).

1.5.4 Varikosis

Ein Beispiel für die pathologische Remodellierung in Venen ist die Varikosis. Hiervon sind ca. 25 % der erwachsenen Bevölkerung in den westlichen Industrienationen betroffen (Callam 1994, Robertson, Evans et al. 2008). Diese Volkskrankheit zeichnet sich durch Schwellungen und Dilatation der tiefen und oberflächlichen Venen der unteren Extremitäten, Schmerzen, Krämpfen und Ödeme aus (Atta 2012). Die genauen Ursachen der Entstehung und Pathogenese variköser Venen ist noch nicht gänzlich aufgeklärt. Als eine primäre Ursache wird die Fehlfunktion der Venenklappen angesehen: Diese sorgen normalerweise für einen gerichtete Blutfluss. Versagen sie bzw. sind undicht kommt es zum Reflux und nachfolgend zu einem Blutstau in den distalen Venen, da die Muskelpumpe das Blut nicht mehr optimal in Herzrichtung befördern kann. Durch diesen Volumenstau resultiert ein lokaler Anstieg des hydrostatischen Drucks. Vorrangig, der Schwerkraft folgend, in den Venen der unteren Extremität und damit verbunden ein Anstieg der Wandspannung in den Venen ebenso wie in den kollateralen Venolen. Dieser Anstieg der Wandspannung kann zum einen die Ursache als auch die Konsequenz einer Venenklappendysfunktion sein. Das einzige bisher etablierte tierexperimentelle Modell zur Nachahmung dieses Prozesses ist die Ligation der Ohrmuschelvene in der Maus (North

and Sanders 1958, Feldner, Otto et al. 2011). Durch Okklusion einer großen abführenden Vene in der Ohrmuschel wird der hydrostatische Druck im assoziierten kollateralen Venennetzwerk erhöht und so die Bildung der ebenfalls korkenzieher-artigen Morphologie variköser Venen induziert.

Diese drei Beispiele einer (mal)adaptiven vaskulären Remodellierung scheinen auf unterschiedliche Weisen alle auf denselben biomechanischen Stimulus - die Erhöhung der Wandspannung - zurückzuführen sein. Diese verursacht offenbar grundsätzlich eine Aktivierung bzw. Anpassung des glattmuskulären Phänotyps. Durch die chronische Dehnung verlieren die SMCs ihren kontraktilen und differenzierten Phänotyp und redifferenzieren zum juvenilen synthetischen, dedifferenzierten Phänotyp an (Rensen, Doevendans et al. 2007, Gomez and Owens 2012, Lacolley, Regnault et al. 2012, Michel, Li et al. 2012).

1.6 Phänotypänderung der glatten Gefäßmuskelzellen

Der synthetische, aktivierte glattmuskuläre Phänotyp (Mulvany 2002, Mulvany 2002) zeichnet sich durch eine erhöhte Proliferation, Migration und durch einen Verlust der kontraktilen Kapazität aus (Lacolley, Regnault et al. 2012, Michel, Li et al. 2012). Eine Reihe von Markerproteinen wird für die Identifikation des glattmuskulären Phänotyps verwendet. Typisch für den synthetischen Phänotyp ist eine erhöhte Expression von Kollagen-I und -IV, verschiedene Isoformen der MMPs und ICAM-1 aus. Zudem ist sowohl die Proliferation als auch die Migration der SMCs erhöht (Denger, Jahn et al. 1999, Rolfe, Muddiman et al. 2000).

Der kontraktile Phänotyp ist sich durch die Expression von SMA, Calponin, SM-MHC, Desmin, α 1-, β 1- und α 7-Integrin sowie Elastin charakterisiert (Rensen, Doevendans et al. 2007). Dies sind Genprodukte des kontraktilen Apparates bzw. Zytoskelett sowie Verankerung der Zellen untereinander bzw. mit der ECM.

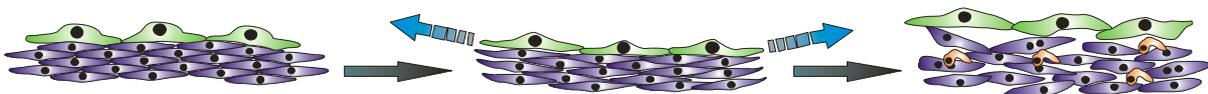


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Induktion glattmuskulärer Remodellierung durch erhöhte Wandspannung. Durch die mechanische Dehnung werden sowohl die Endothelzellen (grün) als auch die glatten Muskelzellen (blau) aktiviert, wobei sich folgend der glattmuskuläre Phänotyp von kontraktile zu synthetisch ändert. In Folge dessen kommt es zur Steigerung der Proliferation und Migration/Invasion und damit zur Reorganisation der Gefäßwandarchitektur, was so u.a. die Infiltration von Immunzellen (orange) ermöglicht.

Die Änderung des glattmuskulären Phänotyps und damit der Verlust der Kontraktilität werden durch eine Reihe von Faktoren stimuliert bzw. inhibiert. Der *platelet derived growth factor* (PDGF)-BB ist ein wichtiger Regulator der glattmuskulären Differenzierung und Aktivität während der Embryonalentwicklung (Schattemann, Loushin et al. 1996, Hellstrom, Kalen et al. 1999). Jedoch spielt PDGF-BB auch im adulten Gefäßsystem eine zentrale Rolle bei Remodellierungsprozessen und wird

insbesondere nach einer Läsion der Intima vermehrt exprimiert und führt unter anderem zu einer Steigerung der glattmuskulären Proliferation in der Neointima (Giordano and Romano 2011, Robertson, McDonald et al. 2012). Die Inhibition von PDGF-BB wiederum blockiert diese vermehrte Proliferation und damit die Neointimabildung (Kotani, Fukuda et al. 2003).

Ein weiterer wichtiger humoraler Faktor für die glattmuskuläre Differenzierung ist der *tissue growth factor* (TGF) β . TGF- β ist essentiell für die Erhaltung des kontraktilen Phänotyps der SMCs. Durch TGF- β wird die Expression von SMA, SM-MHC oder Calponin gesteigert (Hautmann, Madsen et al. 1997) und die Proliferation der SMCs inhibiert. Das Vorkommen von TGF- β selbst ist in geschädigtem Gewebe oder in der Neointima vermindert (Beamish, He et al. 2010).

Auch oxLDL kann im Rahmen der Arteriosklerose eine wichtige Rolle bei der glattmuskulären Differenzierung spielen. Oxidiertes LDL bindet an die Bestandteile der von SMCs synthetisierten ECM (Khalil, Wagner et al. 2004) und wird durch Endozytose von den SMCs aufgenommen (Muir and Bowyer 1983, Lacolley, Regnault et al. 2012). In Folge dessen nehmen die SMCs einen synthetischen Phänotyp an.

Die verminderte Expression Kontraktion-assoziiierter Genprodukte wie SMA, SM-MHC oder Calponin im Zusammenhang mit der Redifferenzierung zum synthetischen Phänotyp ist offenbar reversibel (Owens 1995, Stegmann, Hong et al. 2005). Stegmann et al postulierten ein sog. Kontinuum der Phänotypen und eine grundsätzliche Heterogenität des glattmuskulären Phänotyps in der Gefäßwand. Diese unterschiedlichen Differenzierungsstadien implizieren eine phänotypische Variabilität der SMCs. Beamish et al beschrieben den Zustand der SMCs nicht nur als flexibel, sondern auch als nie eindeutig definierbar, was möglicherweise die Heterogenität der SMCs in einem Gewebe bedingt. Die Identifikation eines Phänotyps ist über die Bestimmung der vorgenannten Markermoleküle oder über den Nachweis von SM α -Aktin Stressfasern, die nur in kontraktilen SMCs vorkommen, möglich.

Auch die Zusammensetzung der ECM wird durch die glatten Muskelzellen bestimmt. So können verschiedene Proteasen, wie z.B. die Matrixmetalloproteinasen (MMPs), welche bestimmte Proteine der ECM abbauen. Interessanterweise hat auch die Komposition der ECM selbst entscheidenden Einfluss auf den glattmuskulären Phänotyp (Gjorevski and Nelson 2009). Die ECM der Arterienwand besteht zum größten Teil aus Kollagen und Elastinfasern (Wagenseil and Mecham 2009). Vor allem Elastin verleiht den Gefäßen Flexibilität und ist daher wichtig für die Reaktion auf veränderte hämodynamische Belastungen. Steigt der biomechanische Stress, so erhöht sich der Anteil an Kollagenen, so kann die Gefäßwand höheren Perfusionsdrücken widersprechen (van den Akker, Schoorl et al. 2010, Tuna, Bakker et al. 2012). Damit einher geht allerdings der Verlust an Elastizität.

Kollagen-I und -III verleihen der Gefäßwand Stabilität. Kollagen-IV hat ein ähnliches Expressionsmuster und eine ähnliche Verteilung wie Elastin. Es formiert sich nicht in Kollagenbündeln wie Kollagen-I oder -III und verknüpft SMCs mit der ECM sowie elastische Lamellen mit der Basalmembran der ECs. Die Interaktion des glattmuskulären Zytoskeletts mit der ECM über verschiedene Integrine ermöglicht den Zellen eine Mechanosensitivität (Heerkens, Izzard et al. 2007, Chao and Davis 2011). Druckänderungen werden vermutlich über diesen Weg von den SMCs wahrgenommen und direkt adressiert. So kommen nicht nur autoregulatorische druckbedingte Anpassungen im myogenen Tonus zustande (Bayliss-Effekt), sondern möglicherweise das *inward* bzw. *outward remodeling* (Lacolley, Regnault et al. 2012).

Die Bestandteile der ECM binden an die Zelloberflächenmoleküle der Integrin-Gruppe. Diese sind Heterodimere, die je nach Aufbau und entsprechenden Bindungspartnern andere intrazelluläre Signalkaskaden stimulieren (Aplin, Stewart et al. 2001). Die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_5\beta_1$ sind in die Mechanotransduktion über die Aktivierung von Calcium- und Kaliumkanälen involviert (Heerkens, Izzard et al. 2007). $\alpha_v\beta_3$ Integrine binden das RGD-Motiv von Fibronektin und aktivieren intrazelluläre Kinasen, wie Rho oder Src, die zur Kontraktion der SMC, zu zytoskelettaler Reorganisation oder zu Calciumeinstrom und somit Kontraktion führen.

Auch $G_{\alpha_{q/11}}$ -gekoppelte Rezeptoren wie der AT_1R oder $ET_A R$ werden offenbar unabhängig von ihren Liganden durch die Deformation (Dehnung) der glatten Gefäßmuskelzellen aktiviert (Sharif-Naeini, Folgering et al. 2010). Durch die $G_{\alpha_{q/11}}$ -vermittelte Bildung von DAG werden die kanonischen TRP-Kanäle 3, 6 und 7 aktiviert. Der resultierende Calciumeinstrom wird durch spannungsabhängige L-Typ Calciumkanäle verstärkt und die SMCs kontrahieren sich gegen die Dehnungskraft. Die Dehnung von SMCs bzw. die Aktivierung mechanosensitiver Kanäle bzw. Rezeptoren stimuliert unter anderem den *mitogen-activated protein* (MAP)-Kinase-Weg. Dieser besteht aus den MAP-Kinasen *extracellular signal-related kinases 1/2* (ERK1/2), der p38-mitogenaktivierten Proteinkinase (p38) und der c-Jun-N-terminalen Kinase (JNK). Die ERK1/2-Kaskade wird durch Raf und MEK1/2 aktiviert. Raf aktiviert die MEK1/2, welche ERK1/2 phosphoryliert. Die MAP-Kinasen werden durch biomechanische Dehnung innerhalb von 15-60 min aktiviert (Correa-Meyer, Pesce et al. 2002, Hsu, Lee et al. 2010). Die Aktivierung von Raf-MEK1/2-ERK1/2 kann auch durch die Stimulation unterschiedlicher Tyrosinkinase-rezeptoren initiiert werden, z. B. durch Wachstumsfaktoren (PDGF-BB, EGF), die Aktivierung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder einen vermehrten Calciumeinstrom in die SMCs. Die phosphorylierten Kinasen (hier im Speziellen: ERK1/2) phosphorylieren wiederum Transkriptionsfaktoren wie Elk1, Jun oder HIF-1 α im oder außerhalb des Zellkerns. Deren Aktivierung führt zur verstärkten Transkription spezifischer Genprodukte, die Proliferation, Differenzierung und Zellwachstum zur Folge haben.

Das Protein ERK1/2 hat keine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS), die eine Translokation in den Nukleus ermöglichen würde. Diese NLS ist eine Abfolge von basischen Aminosäuren, die einmal oder als Cluster vorkommen und den Transport zwischen dem Zytoplasma und dem Nukleus reguliert. Um die aktive Translokation von ERK1/2 in den Nukleus zu initiieren, muss ein Threonin- und Tyrosinrest phosphoryliert werden (Fukuda, Gotoh et al. 1997, Aplin, Stewart et al. 2001).

Die Markerproteine, die den glattmuskulären Phänotyp definieren, werden durch Transkriptionsfaktoren bestimmt, die wiederum durch mechanosensitive Signalwege aktiviert oder inhibiert werden. Elk1 und Myokardin sind Koaktivatoren des *serum response factor* (SRF), die für die Differenzierung bzw. Dedifferenzierung von SMCs eine große Rolle spielen (Wang, Wang et al. 2004). Beide binden formieren mit SRF einen ternären Komplex, um so an die CArG-Box-Bindestelle im Promoter verschiedener Zielgene zu binden und so deren Expression und damit die Ausprägung des kontraktilen (Myokardin) oder synthetischen (Elk1) Phänotyps zu regulieren. Da in dieser Arbeit die Bedeutung von Myokardin für die Differenzierung vaskulärer glatter Muskelzellen im Fokus steht, widmet sich das folgende Kapitel daher der genaueren Vorstellung von Faktoren der Myokardinfamilie.

1.7 Myokardinfamilie

Die Myokardinfamilie umfasst die homologen transkriptionellen Koaktivatoren Myokardin, den *myocardin related transcription factor* (MRTF) -A (auch MKL1 genannt) und MRTF-B (MKL2) (Muehlich, Wang et al. 2008). Am N-Terminus haben diese Mitglieder der Myokardinfamilie ein RPEL-Motiv mit einer G-Aktin-Bindungsstelle. Diese Bindungsstelle ist jedoch lediglich in MRTF-A und -B vorhanden. Die Bindung an G-Aktin ist die Ursache für die zytoplasmatische Lokalisation der beiden Transkriptionsfaktoren (Guettler, Vartiainen et al. 2008). Diese Interaktionsstelle im RPEL-Motiv ist in Myokardin selbst nicht vorhanden, auch fehlt eine nukleäre Exportsequenz (NES), die in MRTF-A vorhanden ist. Muehlich et al zeigten darüber hinaus drei Serin bzw. Threonin Phosphorylierungsstellen in MRTF-A (Muehlich, Wang et al. 2008). Wenn diese durch Alanin ersetzt wurden und daher nicht mehr als Phosphorylierungsstelle dienten, wurde MRTF-A nicht mehr aus dem Nukleus exportiert. Diese Serin- bzw. Threoninreste sind außerhalb des RPEL-Motivs in der Leucin-reichen Sequenz sowie auch in der SRF-Interaktionsdomäne vorhanden. Taurin *et al.* identifizierten auch für Myokardin vier Phosphorylierungsstellen (Ser⁸¹², Ser⁸⁵⁹, Ser⁸⁶⁶, Thr⁸⁹³) (Taurin, Sandbo et al. 2009). Darüber hinaus zeigten sie die Abhängigkeit der Phosphorylierung von ERK1/2 und eine damit einhergehende Inaktivierung der SRF-Bindung durch Phosphorylierung. Jedoch sind die Rolle und auch der Stimulus der Phosphorylierung von Myokardin durch diese MAP-Kinase unklar.

Myokardin ist in glatten Muskelzellen und Kardiomyozyten exprimiert. Bislang gibt es noch keine detaillierte und eindeutige Beschreibung der Regulation der Myokardin-Expression. Mef2c, Tead2 und FOXO4 sind Kandidaten, die in diesem Zusammenhang beschrieben wurden (Creemers, Sutherland et al. 2006). Ergebnisse von Versuchen mit Zelllinien, die diese Faktoren und Myokardin überexprimieren, weisen auf eine direkte Interaktion zwischen Mef2c, Tead2 oder FOXO4 und Myokardin hin. Myokardin assoziiert als Dimer mit SRF und bindet an die sog. CARG-Box (CC(A/T)₆GG) in der Promotorregion der Gene, die zur Stabilisierung der Kontraktilität beitragen (Wang, Wang et al. 2003, Pipes, Creemers et al. 2006). Myokardin alleine hat keine transkriptionellen Aktivität. Neben dem Bindungsmotiv für SRF hat Myokardin eine Interaktionsdomäne für Klasse II HDACs und FOXO4.

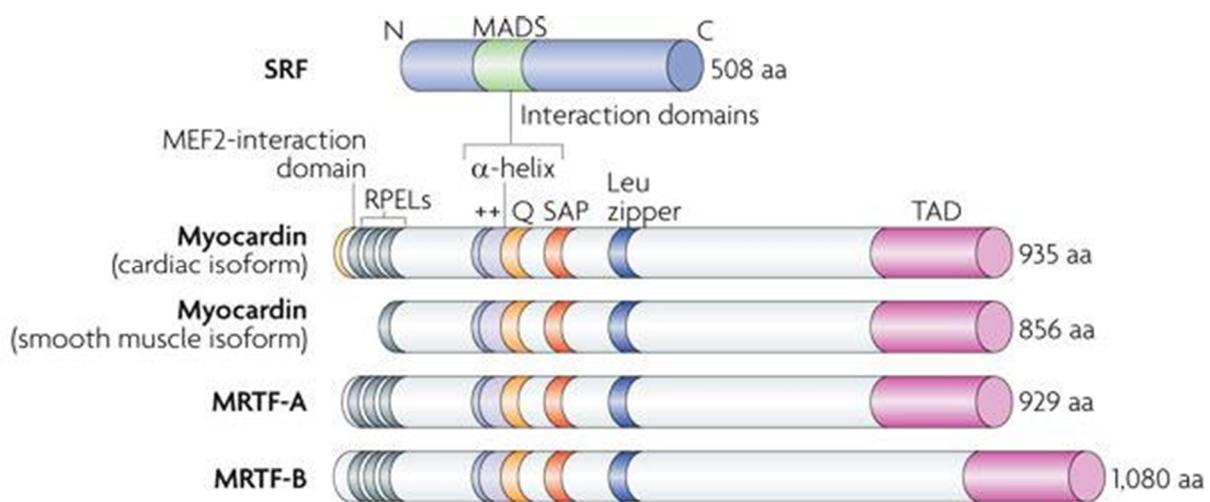


Abbildung 6: Gegenüberstellung der Strukturhomologen der Myokardin-Familie hinsichtlich der Anordnung der Interaktionsdomänen. Aus Olson und Nordheim et al, 2010

Erste Informationen über die Funktion von Myokardin stammen von Myokardin-defizienten Mäusen. Der Myokardin-Knockout ist für die Maus pränatal letal am Tag E10,5 (Li, Wang et al. 2003). Diese Mäuse zeigen einen kardialen Phänotyp, wobei allerdings die Ursache für die Letalität dieser Knockout-Mäuse in einer Fehlregulation des glattmuskulären Phänotyps zu suchen ist. Bis zum Tag E8 entwickeln sich die Tiere normal. Ab dem Tag E9,5 sehen die Herzkammern zwar normal aus, jedoch ist die dorsale Aorta bzw. das vaskuläre System unterentwickelt. Die Endothelzellen wiederum sind nicht beeinträchtigt und entwickeln sich normal. Li *et al.* wiesen keine SMA-spezifische Färbung in Gefäßen nach, wobei die Kardiomyozyten SMA exprimierten (Li, Wang et al. 2003). Dies ist auch eine mögliche Erklärung für die normale Entwicklung des Herzens, wobei Hoofnagle et al. durchaus einen ventrikulären Entwicklungsdefekt nach Kultivierung Myokardin-negativer embryonaler Stammzellen dokumentierten (Hoofnagle, Neppel et al. 2011).

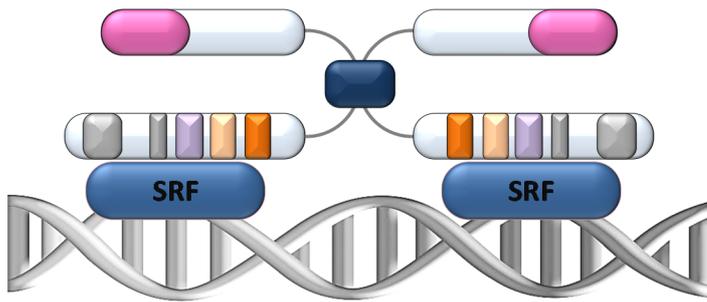


Abbildung 7: Übersichtsbild des ternären Komplexes zwischen dem SRF und Myokardin und dessen Interaktion mit der DNA

Die sog. *basic domain* (lila) enthält eine *nuclear localisation sequence* und bindet an den SRF, wobei die SAP-Domäne (orange) diese Bindung stabilisiert und mit der CArG-Box-Sequenz der DNA oder weiteren nukleären oder zytoplasmatischen Molekülen interagiert. Diese Region ist möglicherweise auch am nukleären Im- und Export beteiligt. Die N-terminale RPEL-Domäne (grau) ist nicht an der SRF-Bindung beteiligt und damit frei. Diese Region ist im Vergleich der Isoformen als auch der Homologen unterschiedlich und kann in ihrer Größe variieren. Die C-terminale *transcription activation domain* (TAD) steuert die Initiation der Transkription.

realisiert zu sein. Elk1 als Dimer bildet mit ebenfalls SRF einen ternären Komplex, um so allerdings um die Expression von Genprodukten zu fördern, die zur Dedifferenzierung der glatten Muskelzelle führen und so die Ausbildung des synthetischen Phänotyps zu fördern. Wang und Nordheim *et al.* sowie Liu *et al.* beschrieben die Interaktion von Elk1 und Myokardin mit SRF als kompetitiv (Wang, Wang *et al.* 2004, Liu, Wang *et al.* 2005). Jedoch ist die Rolle von Myokardin im adulten System nicht genau charakterisiert. In Gefäßen, die durch eine Ballon-Katheter verletzt wurden, ist Myokardin in der Neointima vermindert exprimiert (Xie, Guo *et al.* 2012). Die synthetischen SMCs der Neointima zeichnen sich durch ein hohes Maß an Proliferation und Migration aus. FOXO4 und der *kruppel-like-factor* (KLF)-4 werden von SMCs beide vermehrt in einem pathophysiologischen Kontext, wie z.B. biomechanischem Stress, in SMCs exprimiert und werden daher mit der Etablierung des synthetischen Phänotyps assoziiert. Beide Faktoren wurden in diesem Kontext als Negativ-Regulatoren von Myokardin genannt (Liu, Sinha *et al.* 2005, Liu, Wang *et al.* 2005). Auch Hendrix *et al.* zeigten eine Assoziation der (mal-)adaptiven Differenzierung von SMCs und einer verminderten Myokardin-Expression nach Ligation der linken Arteria carotis communis (Hendrix, Wamhoff *et al.* 2005).

1.8 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Aus den vorliegenden Befunden der Literatur kann abgeleitet werden, dass pathophysiologisch bedingte Remodellierungsprozesse arterieller Gefäße immer mit einer Aktivierung glatter

Abgesehen von der maßgeblichen Rolle von Myokardin während der vaskulären Entwicklung, scheint seine Funktion auch im adulten System für die Erhaltung der vaskulären Integrität wichtig zu sein (Du, Ip *et al.* 2003). Die Destabilisierung der Expression von Genprodukten, die die Kontraktilität der SMCs aufrechterhalten, wie SMA, SM-MHC oder Calponin, resultiert in einer phänotypischen Adaption der SMCs von kontraktile zu synthetisch. Die Inhibition der Myokardin-Aktivität scheint in diesem Zusammenhang vor allem über die Aktivierung von Elk1

Gefäßmuskelzellen einhergehen. So wird angenommen, dass auch durch Bluthochdruck der Phänotyp arterieller glatter Muskelzellen direkt beeinflusst wird – mit entsprechenden negativen Konsequenzen für die Struktur und Funktion der Arterienwände (beispielsweise die Erhöhung der Steifigkeit und Wanddicke). Eine Folge der glattmuskulären Aktivierung scheint der Verlust des kontraktiven Phänotyps bei gleichzeitiger Ausprägung eines synthetischen Phänotyps dieser Zellen zu sein. Während aber der Nachweis solcher Phänotypänderungen im Rahmen von Gefäßerkrankungen selbst vielfach gelungen ist, herrscht insbesondere Unklarheit darüber, welche Mechanismen dafür verantwortlich sind. Vor diesem Hintergrund wird beispielsweise spekuliert, dass sich die Spezifität von SRF durch Aktivierung von dessen Koaktivator Elk1 ändert und so die Expression von Genprodukten gefördert wird, die mit dem synthetischen Phänotyp glatter Gefäßmuskelzellen assoziiert sind. Allerdings ist bisher völlig unklar wie in diesem Zusammenhang die Aktivität des anderen SRF-Koaktivators - Myokardin - reguliert wird, der entscheidend für die Expression von Genprodukten des kontraktiven Apparats der glatten Muskelzellen ist.

Basierend auf diesen Fakten resultierte die Leithypothese dieser Arbeit, dass Bluthochdruck und damit die Steigerung der Wandspannung ausreichend ist, um die Ausprägung des kontraktiven Phänotyps glatter Gefäßmuskelzellen zu inhibieren. Ferner wurde angenommen, dass es zur Etablierung eines SRF/Elk1-abhängigen synthetischen Phänotyps zunächst zu einer Inaktivierung von dessen Koaktivator Myokardin kommen muss. Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente waren daher darauf ausgerichtet, nachzuweisen ob und in welcher Weise eine erhöhte Wandspannung bzw. biomechanische Dehnung glatter Muskelzellen die Aktivität von Myokardin und damit den Phänotyp dieser Zellen beeinflusst. Zu diesem Zweck wurde unter anderem das Expressionsniveau von Myokardin in einem pathophysiologischen Kontext wie Hypertension oder im Rahmen der Arteriogenese bzw. Varikosis *in vivo* analysiert. Um den Effekt der erhöhten Wandspannung auf die Myokardinaktivität genauer zu untersuchen, wurden *in vitro* kultivierte glatte Gefäßmuskelzellen biomechanisch gedehnt und anschließend mit Hilfe molekularbiologischer und proteinbiochemischer Techniken analysiert.

2 Material

Die allgemeinen Chemikalien, wenn nicht anders vermerkt, wurden von Roth (Karlsruhe), Sigma (Steinheim), Roche (Mannheim) oder Merck (Darmstadt) erworben.

Verbrauchsmittel für Techniken der Zellkultur oder Molekularbiologie wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), TPP (Trassdingen, Schweiz), Sarstedt (Hannover), BO Falcon (Heidelberg), Greiner (Frickenhausen), Millipore (Schwalbach), Qiagen (Hilden), Invitrogen (Darmstadt) oder Nunc (Langenselbold) bezogen.

2.1 Operative Eingriffe

Apparatur/Substanz	Katalognummer	Hersteller
Blutdruckmessgerät	LE 5001 Pressuremeter	Panlab, March-Hugstetten
Narkosgerät	HNG 6	Hölzel, Wörth
OP Mikroskop	M650	Wild, Heerbrugg
Isofluran		Baxter, Unterschleißheim
Deoxycorticosteron Actetat	M121	Innovative Research of America, Sarasota, USA
Wundnahtmaterial	EH74356 (7-0) EH74346 (6-0)	Ethicon, Norderstedt
Isotone NaCl Lösung		Braun, Melsungen
Enthaarungscreme		Pilca, Bühl
Kanülen	Hypothermic Needle 27G	Jelco, London, UK
	Venofix A 25G	Braun, Melsungen
Spritzen	300013 (1 ml)	BD Plastipak, Heidelberg
Präparierbesteck	Pinzette, Schere	WPI, Berlin
OP-Besteck	Pinzette, Schere	F.S.T., Essen
Peristaltikpumpe		Ismatec, Darmstadt
Augen- und Nasencreme	Bepanthen	Bayer, Leverkusen
Partikel	3 18	Schmincke, Erkrath

Hautantiseptikum	Kodan tinktur forte	Schülke, Haarlem, Niederlande
Emulsion-Unguentum emulsifans		Apotheke Uniklinikum

2.2 Perfusion isolierter, muriner Gefäße

Apparatur/Substanz	Katalognummer	Hersteller
Inkubator	Function line innova co-48	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Myograph	202CM	Danish Myo Technology, Aarhus, Dänemark
Pressure regulator unit		
Stereomikroskop	M5-51845	Wild, Heerbrugg
Kapillare	Hypo tube S/S 304-RW-31GA #HTX31R60	Small Parts, Nazareth
Pinzetten	Dumont #5	WPI, Berlin
Federschere	McPherson- Vannas Scissors	
CO ₂ -unabhängiges Medium	18045-054	Invitrogen, Darmstadt

2.3 Zellkulturmethoden

Apperatur/Substanzen	Katalognummer	Hersteller
Inkubator	Function line innova co-170	Heraus Instruments New Brunswick Scientific, Nürtingen
Sterilbank	Hera safe	Thermo Scientific, Dreieich
Zentrifuge	Universal 32	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss, Göttingen
Wasserbad	E11	Dinkelberg Analytics, Gablingen
Magnetplatte		IBA, Göttingen

2.4 Zellkulturmedien und verwendete Zellen

		Katalognummer	
Basalmedium für humane, arterielle und venöse SMCs	D-MEM <i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i> von GIBCO BRL (Eggenstein)	21885108	+ 15 % FCS
	Methocel		0,3 % Methocel in D-MEM + 1 % FCS
	Opti-MEM <i>Reduced Serum Medium</i> von GIBCO BRL (Eggenstein)	31985	Ohne weitere Zusätze
Waschmedium	HBSS-/- <i>Hank's balanced salt solution</i> ohne Ca ²⁺ oder Mg ²⁺ von PAA (Cölbe)	H15 008	
Zusätze	FCS Fetales Kälber Serum von life technologies (Darmstadt)	1050000064	
	Penicillin/Streptomycin von life technologies (Darmstadt)	15070063	Je 50 U/ml
	Trypsin/EDTA von life technologies	25300	2,5 mg/ml

2.5 Pufferlösungen

Locke-Ringerlösung	154 mM NaCl
	5,6 mM KCl
	2,4 mM CaCl ₂
	6 mM NaHCO ₃
	5,6 mM Glukose
	pH 7,4

10 × PBS	140 mM TrisHCl 2,7 mM KCl 31,5 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,5
1 × PBST	1 × PBS 0,05 % Tween
10 × TBS	50 mM TrisHCl 150 mM NaCl pH 7,5
1 × TBST	1 × TBS 0,05 % Tween

2.6 Lösungen für fluoreszenzbasierte und morphologische Analysen

Zink-basierte Fixierlösung (Zink-Fixans)	0,1 M TrisHCl 2,8 mM Ca(C ₂ H ₃ O) ₂ 22 mM Zn(O ₂ CH ₃) ₂ 36 mM ZnCl ₂ pH 7,4
Pigment-Zink-Fixans	4 % Guache in Zink-Fixans
BSA-Casein-Blockierlösung	1 M TrisHCl pH 7,6 0,25 % Casein 0,1 % BSA 0,3 M Natriumazid
Aufhellungslösung	1 Vol. Benzylbenzoat 1 Vol. Benzylalkohol
Eindeck-Medium	0,1 M Tris HCl, pH 8,5 10 % Mowiol 4-88 25 % Glycerin 2,5 % DABCO

2.7 Lösungen zur molekularbiologischen Analyse

Pefabloc	15 mM Hepes Puffer, pH 7,4 4 % Pefabloc-SC
Proteaseinhibitormix	1 % Pepstatin A in 20 % DMSO und 80 % 15 mM Hepes, pH 7,4 1 % Leupeptin in 20 % DMSO und 80 % 15 mM Hepes, pH 7,4
Proteinlysepuffer	150 mM NaCl 10 mM TrisHCl, pH 7,4 1 % Triton-X-100 Pefa und Proteaseinhibitormix 20 mM Na ₃ OV ₄ 20 mM NaF
6 × Elutionspuffer nach Immunopräzipitation	350 mM TrisHCl, pH 7,4 10 % SDS 30 % Glycerol 600 mM DTT 0,01 % Bromphenolblau
Lysepuffer I zur Herstellung nukleärer Extrakte	10 mM HEPES 10 mM KCl 0,1 mM EDTA 0,1 mM EGTA 0,15 % Nonidet-P-40 20mM Na ₃ OV ₄ Pefa und Proteaseinhibitormix
Lysepuffer II zur Herstellung nukleärer Extrakte	20mM HEPES 400 mM NaCl 0,01 mM EDTA 0,01 mM EGTA 0,15 % Nonidet-P-40 20 mM Na ₃ OV ₄ Pefa und Proteaseinhibitormix
10 × Laufpuffer der SDS-PAGE	4 mM Tris HCl, pH 7,4 2,5 M Glyzin, 1 % SDS

Transferpuffer für das Nass-Blot-Verfahren	50 mM Glyzin
	3 % Ethanolamine
	20 % Methanol
10 × TBE	90 mM Tris HCl
	73 mM Borsäure
	3 mM EDTA
	pH 7,5

2.8 Nukleotidsequenzen

2.8.1 Humane und murine Primersequenzen

	Sequenz (vorwärts und rückwärts)	Annealing-temperatur	Hersteller
hMyokardin	5'TCCAACGGCTTCTACCACTT 5'CACCTTCTGCTTCTCCACCA	55 °C	Sigma Aldrich, Taufkirchen bei München
hCalponin	5'GAGGAGGGAAGAGTGTGCAG 5'GTTGGCCTCAAAAATGTCGT	53 °C	
hRPL32	5'GTTTCATCCGGCACCAGTCAG 5'ACGTGCACATGAGCTGCCTAC	60 °C	
hVCAM1	5'CATTACAGAGGCCACCACTC 5'CATGACCTGTTCCAGCGAGG	52 °C	
hSM-MHC	5'GCAGGCTGAGATCCTGGTCA 5'TGCTTTTCAGCCTTGTTCT	49 °C	
hMLC	5'GATGTTCCGCCCTTCCCC 5'GCAGCGAGCCCCCTCCTAGT	60 °C	Invitrogen, Darmstadt
hElk1	5'TCAGGAGACCCATCCGTGGC 5'TGGGTCCATCGCTGGGGGAG	60 °C	
hMRTF-A	5'CCCCTGGCAGCACAGCCATC 5'CACTGGTCAGCAGGGGCAGC	60 °C	
mMyokardin	5' CTGTGTGGAGTCCTCAGGTCAAACC 5' GATGTGCTGCGGGCTCTTAAG	55 °C	
mRPL32	5' GGC GCAACAAGAAACCAA 5' ATTGTGCACCAGGA ACTTGC	60 °C	

2.8.2 siRNA

	Sequenz	Hersteller
Kontroll-siRNA	unbekannt	Thermo Scientific, Dreieich
Myokardin siRNA	5'CUUGAAGUCUUAUUAAAUU 5'AAUUAAUAAGACUUCAAG	Sigma Aldrich, Taufkirchen bei München
Elk1 siRNA	5'GGAGUCAUCUCUCCUAUATT 5'UAUAGGAAGAGAUGACUCCT	Qiagen, Hilden

2.8.3 miRNA

	Sequenz	Annealing-temperatur	Hersteller
miR143	unbekannt	60 °C	Qiagen, Hilden
miR145	unbekannt	60 °C	
RNU6	unbekannt	60 °C	

2.9 Antikörper

2.9.1 Primärantikörper

	Katalognummer	Hersteller
Maus anti-human Myokardin	MAB4028	R&D Systems, Wiesbaden
Hase anti-Maus Myokardin (H-300)	sc-33766	Santa Cruz, Heidelberg
Ziege anti-Maus Myokardin (M16)	sc-21561	
Maus anti-Ratte CD-31 (MEC 13.3)	sc-18916	
Hase anti-Maus/ human CHIP (H-231)	sc-66830	
Hase anti-Maus/ human MRTF-A (H-140)	sc-32909	
Hase anti-human SM-MLC	ab64162	abcam, Cambridge, UK
Maus anti-Maus/ human β - Aktin	ab6276	
Hase anti-human Calponin	ab46794	
Hase anti-Maus SMA	ab5694	

Maus anti-Maus/ human PCNA	ab2426-1	abcam, Cambridge, UK
Hase anti-human Ki67	ab833	
Hase anti-Maus/ human MMP9	ab38898	
Hase anti-Maus/ human Histon H3	ab1791	
Hase anti-Maus/ human pSerin	ab9332	
Hase anti-Maus/ human α -Tubulin	#2144	Cell Signalling, Frankfurt am Main
Maus anti-Maus/ human pTyrosin	#9411	
Hase anti-Maus/ human pMLC2	#3671	
Hase anti-Maus/ human pERK1/2	#4370	
Hase anti-Maus/ human MMP2	AB6003	Millipore, Schwalbach

2.9.2 Sekundärantikörper

	Katalognummer	Hersteller
Esel anti-Hase IgG-Cy3	711-166-152	Dianova, Hamburg
Esel anti-Huhn IgG-Cy3	703-165-155	
Esel anti-Ziege IgG-Cy3	705-166-147	
Esel anti-Ratte IgG-DyLight 488	712-485-153	
DAPI	D1306	Invitrogen, Darmstadt

2.10 Stimulantien und Inhibitoren

2.10.1 Stimulierende Pharmaka

	Konzentration	Hersteller
PDGF-BB	10 ng/ μ l	R&D Systems, Wiesbaden

2.10.2 Inhibitoren

	Inhibition von	Konzentration	Hersteller
PD98059	MEK1/2	20 μ M	invivogen, San Diego, USA
Gadolinium	Dehnungsaktivierte Ionenkanäle	50 μ M	Sigma Aldrich, Taufkirchen bei München
BAPTA	Calcium Chelation	20 μ M	
U73122	Phospholipase C	5 μ M	
Natrium-orthovanadat	Phosphatasen	20 mM	
Atrovastatin	HMGCoA-Reduktase	10 μ M	LKT Laboratories, St. Paul, USA
Rosuvastatin	HMGCoA-Reduktase	10 μ M	Santa Cruz, Heidelberg
Epoxomicin	Chymotrypsinartige Proteasom-Aktivität	0,4-10 μ M	Cayman, Hamburg
Lactazystin	β -Untereinheit des Proteasoms	25 μ M, 50 μ M	
R18	Chaperon 14-3-3	1 μ M	R&D Systems, Wiesbaden
Trichostatin-A	HDAC der Klasse I und II	1 μ M	Selleckchem, München
Bortezomib	Chymotrypsinartige Proteasom-Aktivität	0,1-2,5 μ M	

3 Methoden

3.1 *In vitro* Methoden

3.1.1 Präparation und Kultivierung glattmuskulärer, humaner Zellen

Zur Untersuchung mechanistischer Veränderungen auf zellulärer Ebene wie der Nachstellung und Validierung physiologischer Zusammenhänge, wurde ein *in vitro* Modell verwendet. Hierzu wurden glatte Muskelzellen aus Arterien (HuASMCM) sowie Venen (HuVSMC) der Nabelschnur präpariert. Im Folgenden werden die zur Kultivierung und experimentellen Verarbeitung benötigten Methoden dargestellt.

Präparation arterieller und venöser, humaner Muskelzellen aus der Nabelschnur

Um die glatten Muskelzellen der Nabelschnur zu präparieren, wurden zunächst die Arterien freipräpariert. Diese wurden in Gänze vorsichtig auf je eine Knopfkanüle aufgezogen und mit HBSS -/- gespült. Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt, um zum einen das verbleibende Spenderblut und darüber hinaus die Endothelzellschicht zu entfernen. Die Arterien wurden mithilfe eines Skalpell in einer sterilen 10-cm-Petrischale (Sarstedt, Nürnberg) in 2-3- mm lange Stücke geschnitten. Diese wurden einzeln in einer weiteren sterilen 10-cm-Petrischale aufgestellt und bei geschlossenem Deckel für 15 min bei 37 °C und 5 % CO₂ angetrocknet. Die Petrischale wurde im Anschluss mit 20 ml D-MEM Medium (mit 15 % FCS und Antibiotika) aufgefüllt und weiterhin unter den angegebenen Konditionen kultiviert. Die Muskelzellen migrierten in den folgenden 10-14 Tagen aus den Gewebestücken heraus und wurden nach Erreichung der Konfluenz in T75-Kulturflaschen (Sarstedt, Nürnberg) passagiert.

Da die Venen eine sehr viel dünnere Gefäßwand haben und somit nur schwer aufzustellen sind, wurde hier folgende Technik angewendet: Zur Präparation der HuVSMCs wurde die Venen in ca. 3-cm-lange Gefäßstücke geschnitten und der Länge nach geöffnet. Diese wurden in einer sterilen 10-cm-Petrischale für 15 min bei 37 °C und 5 % CO₂ angetrocknet und anschließend mit 20 ml D-MEM mit 15 % FCS und Antibiotika überschichtet. Bis die herausgewachsenen HuVSMCs das erste Mal passagiert werden konnten, wurden diese ca. 14-21 Tage kultiviert.

Kultivierung arterieller und venöser humaner, glatter Muskelzellen

Die HuASMCMs und die HuVSMCs wurden bis zur Weiterverarbeitung in D-MEM mit 15 % FCS bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Im Abstand von zwei bis drei Tagen wurde das Medium ausgetauscht. Bei der Erreichung von ca. 80 % der Konfluenz wurden die Zellen passagiert bzw. in die experimentell notwendige Kulturschale ausgesät. Die glatten Muskelzellen wurden bis maximal Passage fünf

eingesetzt. Zum Ablösen der Zellen wurden diese nach Waschen mit HBSS/- für 1-2 min mit Trypsin/EDTA bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Durch anschließendes leichtes Abklopfen und Abspülen mit D-MEM (mit 15 % FCS) wurden die Zellen in Suspension gebracht. Im Anschluss wurde 5 min bei 1000 × g zentrifugiert und der Trypsin/EDTA-haltige Überstand abgenommen, um das Zellzentrifugat in der gewünschten Menge D-MEM (mit 15 % FCS) zu resuspendieren. Zur Weiterverarbeitung mit einer definierten Zellzahl wurde anhand von 10 µl der Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt und mithilfe dieses Wertes eingestellt.

Herstellung von Kollagen-I aus Rattenschwänzen

Die Rattenschwänze adulter Wistar-Ratten wurden bei -20 °C bis zur Verarbeitung gelagert. Zur Präparation wurden zwei Schwänze unter sterilen Bedingungen für ca. 20 min in 70 % Ethanol bei Raumtemperatur aufgetaut. Alle folgenden Schritte wurden unter Einhaltung der Sterilität durchgeführt. Um die Sehnen freipräparieren zu können, wurde die Haut, das Bindegewebe und die Blutgefäße entfernt. Im Anschluss wurden das freigelegte Sehnenbündel mit den Wirbeln in 70 % Ethanol inkubiert. Nach Brechen der einzelnen Wirbel, konnten das Sehnenbündel heraus gezogen werden, um diese anschließend erneut in 70 % Ethanol für 15 min zu inkubieren. Nach Lufttrocknung unter der Sterilbank für 30 min wurden die Sehnen gewogen. Anschließend wurden Sie in einer Konzentration von 0,5 % in steriler 0,1 % (v/v) Essigsäure bei 4 °C für 48 h inkubiert, wobei die Lösung gelegentlich geschwenkt wurde. Final wurde die Lösung in sterile 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 1 h mit 24.000 × g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand besteht zu 95 % aus Kollagen-I. Für weitere Experimente wurde eine Konzentration von ca. 2 mg/ml verwendet.

Methocelherstellung

Zur Herstellung einer Stammlösung des Methocelmediums wurden 6 g Methylzellulose zusammen mit einem Magnetrührfisch in einer 500-ml-Flasche autoklaviert und anschließend in 250 ml Basalmedium (60 °C) ohne Zusätze gelöst. Um die Lösung der Methylzellulose zu unterstützen, wurde die Suspension für 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde 250 ml Basalmedium (mit 2 % FCS) hinzugesetzt und für eine weitere Stunde bei 4 °C gerührt. Daraufhin wurde die Methylzelluloselösung auf 50-ml-Reaktionsgefäße (Falcon/ Becton-Dickinson, Heidelberg) überführt. Um die nicht-gelöste Methylzellulose zu entfernen, wurden die Röhrchen bei 5000 × g für 1,5 h zentrifugiert. Für die Experimente wurde der klare Überstand der Methylzelluloselösung verwendet.

3.1.2 Methoden in 2-dimensionaler Zellkultur

Migrationsassay

Zur Evaluation der Migrationsfähigkeit der Zellen wurden diese in 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät, worin zuvor sterile Silikonbarrieren definierter Größe platziert wurden. Diese „Silikonmauern“ verhindern die Besiedelung dieser Areale durch Zellen. Nach Adhäsion der Zellen wurde das Medium gewechselt und die Barrieren entfernt. Diese Technik ermöglichte eine glatte und definierte Zellfront, ohne die Zellen wie beim *scratch-wound-assay* zu verletzen. In den folgenden sieben Tagen wurde täglich die kürzeste Distanz zwischen den Grenzen mithilfe eines geeichten Okulars gemessen. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt, um eine weitere Stresskomponente, wie die Anhäufung von Zelldebris, zu vermeiden.

Proliferationsassay

Eine Methode, um die Proliferationsrate von Zellen dokumentieren zu können, ist das tägliche Auszählen der ausgesäten Zellen. Die glatten Muskelzellen wurden abgelöst (siehe 3.1.1) und je 16.000 Zellen pro Vertiefung in 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Auf der Platte wurde eine Stelle amrkiert und diese jeden fotografiert und anhand der vorhandenen Zellkerne die Zellzahl in dem markierten Areal bestimmt.

Biomechanische Dehnung glattmuskulärer Zellen mit dem Flexcell Tension System

Die Erhöhung des Blutdruckes resultiert in einer Steigerung biomechanischer Stimuli, die auf die Gefäßwand appliziert werden. Sowohl die medialen, glatten Muskelzellen als auch die Endothelzellschicht werden einer erhöhten Wandspannung exponiert. Eine Komponente der Wandspannung ist die Dehnung der Zellen. Um diesen biomechanischen Einfluss auf die medialen SMCs *in vitro* zu mimikrieren, wurde zyklische Dehnung auf 2-dimensional kultivierte HuASMCs bzw. HuVSMCs appliziert.

Die HuASMCs bzw. HuVSMCs wurden auf sogenannten Elastomeren (Flexcell International Cooperation, Hillborough, USA) kultiviert, welche mit Rattenschwanz-Kollagen-I oder mit Pronektin beschichtet waren, um die Adhärenz der Zellen zu gewährleisten. Eine Vakuumpumpe applizierte einen Zug in definierter Intensität auf die flexiblen

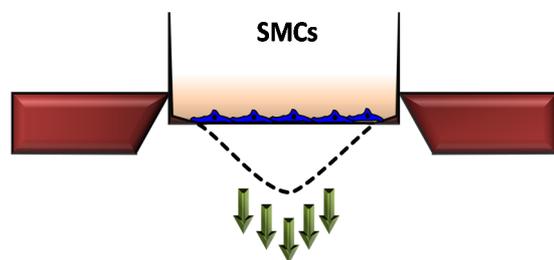


Abbildung 8: Graphische Darstellung der Kultivierung und der mechanischen Dehnung von SMCs mit Hilfe des Flexcell® Systems.

Elastomere und führt so zu einer mechanischen Dehnung der darauf ausgesäten Zellen. Die SMCs

wurden anschließend hinsichtlich gewünschter Zielparameter mittels Immunzytometrie oder Aufarbeitung der mRNA-Expression oder Proteinsynthesen analysiert.

siRNA-basierte Inhibition spezifischer Transkriptionsprodukte

Zur Inhibition einer spezifischen mRNA wurden die Zellen mit siRNA behandelt. Die Sequenz der siRNA ist komplementär zu der mRNA, folglich bildet sich ein Doppelstrang aus, wodurch die Degradation initiiert wird. Somit kann das Protein nicht mehr synthetisiert werden. Mit Hilfe dieser Technik wurden Myokardin-abhängige Veränderungen untersucht. Um die Proteinsynthese von Myokardin zu inhibieren, wurden die Zellen bei 70 % Konfluenz mit HBSS/- gewaschen, mit Opti-MEM versetzt und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. 4 µg der Myokardin-spezifischen siRNA wurde mit 3 µl der MATra-si-Reagenz (IBA, Göttingen) in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß versetzt und auf 200 µl (für eine 6-Loch-Platte) mit D-MEM (ohne Zusätze) aufgefüllt. Das MATra-si Reagenz enthält magnetische Nanopartikel, die Nukleinsäuren binden. Die Suspension bestehend aus D-MEM, siRNA und MATra-si Reagenz wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei im Abstand von 5 min invertiert bzw. gemischt wurde. In dieser Zeit kommt es zur Bindung der siRNA an die magnetischen Nanopartikel. Anschließend wurden 200 µl auf die humanen SMCs einer Vertiefung einer 6-Loch-Platte gegeben und auf einer starken Magnetplatte bei 37 °C und 5 % CO₂ für 20 min inkubiert. Im Anschluss wurde das Transfektionsmedium ersetzt und die Zellen wurden für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die verminderte Expression von Myokardin wurde sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene verifiziert (Abbildung 9).

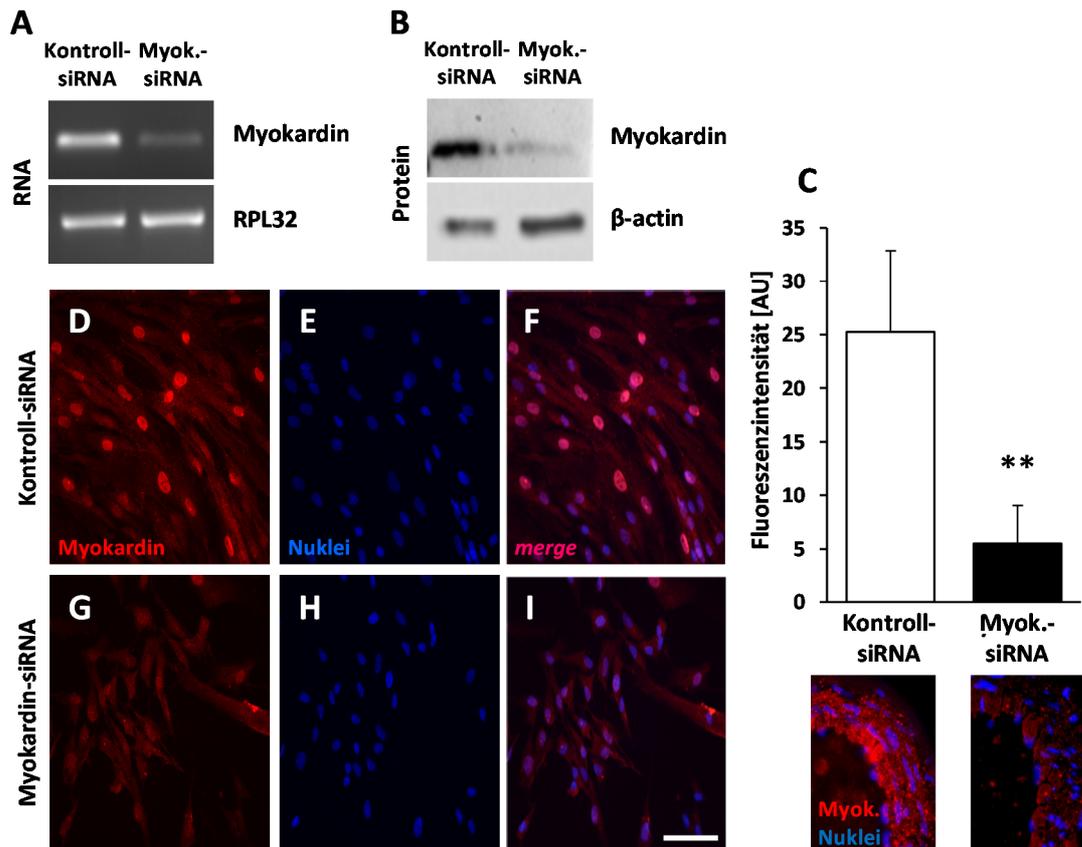


Abbildung 9: Validierung des siRNA-induzierten Knockdowns von Myokardin in HuSMCs

Die Menge der Myokardin-spezifischen mRNA wurde durch den siRNA-vermittelten Abbau des Myokardin-Transkriptes reduziert. Der Knockdown der mRNA (A) von Myokardin führte zu einer Verminderung der Myokardin-Proteinmenge, was durch SDS-PAGE und Western Blot bestätigt wurde (B). Die Reduktion der Proteinsynthese wurde ebenfalls durch Immunzytometrie nachgewiesen (D-I, rote Fluoreszenz, Maßbalken: 100 μm). Nachweis von Myokardin in der Wand einer *A. mesenterica* der Maus nach siRNA-vermitteltem Knockdown (rote Fluoreszenz) (C vgl. F bzw. E vgl. H, **p < 0,01 Kontroll-siRNA vs. Myokardin-siRNA).

3.1.3 Methoden in 3-dimensionaler Zellkultur

Glatte Muskelzellen sind unter physiologischen Bedingungen in Gefäßen mehrschichtig angeordnet. Dahingehend ist die konventionelle, 2-dimensionale Kultivierung der Zellen sehr artifiziell. Die einschichtige Kultivierung von SMCs hat beispielsweise einen Einfluss auf das Proliferations- oder Migrationsverhalten der Zellen. Aus diesem Grund wurden einige funktionelle Experimente unter 3-dimensionalen Kulturbedingungen durchgeführt.

Herstellung glattmuskulärer Sphäroide

Zur Nachstellung der 3-dimensionalen Anordnung der SMCs wurden Sphäroide, bestehend aus 500 bzw. 3000 Zellen, hergestellt.

Nach dem Ablösen der Zellen durch Trypsin/EDTA wurden diese mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ausgezählt und auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Für den nachfolgend beschriebenen Invasionsassay wurden Sphäroide bestehend aus 500 Zellen bzw. zur Immunfluoreszenzanalyse Sphäroide aus 3000 Zellen hergestellt. Die im Folgenden angegebenen Mengen beziehen sich auf einen experimentellen Ansatz mit ca. 200 Sphäroiden. Dazu wurden 100.000 bzw. 600.000 Zellen in 16 ml D-MEM (incl. 30 % FCS) aufgenommen, mit 4 ml Methocel versetzt und vorsichtig horizontal schwenkend vermengt. Anschließend wurde diese Suspension auf zwei 96-Loch-Platten mit einem Rundboden ausplattiert (Greiner, Frickenhausen) und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Nachdem die Integrität der Sphäroide durch mikroskopische Analyse kontrolliert wurde, wurden diese geerntet. Die Sphäroide sollten eine Ball-ähnliche Form haben und einen klaren Randverlauf zeigen. Zur Ernte wurden alle Sphäroide mit einer 1-ml-Pipette aufgenommen, deren blaue Spitze ca. 1 cm abgeschnitten wurde. In einem 50-ml-Reaktionsgefäß (Falcon/ Becton-Dickinson, Heidelberg) wurden diese bei 1000 × g für 5 min zentrifugiert, um das Methocel-haltige Medium abnehmen zu können. Das weitere Verfahren mit den Sphäroiden differiert hier je nach experimentellem Ansatz und wird in den folgenden Abschnitten separat erläutert.

Invasionsassay

Die glattmuskulären Sphäroide wurden in einem Kollagen-I resuspendiert und kultiviert, um deren Verhalten hinsichtlich der Entwicklung von Protrusionen im Gel zu analysieren. Im Folgenden wird der experimentelle Ablauf dieser Methode erläutert werden. Zur Analyse der proteolytischen und migrativen Kapazität der HuASMCs wurden ca. 200 Sphäroide aus je 500 Zellen hergestellt. Die geernteten und zentrifugierten Sphäroide wurden in 2,5 ml eines Gemisches bestehend aus 40 % FCS und 60 % Methocel resuspendiert. Separat wurden 2,5 ml Rattenschwanz-Kollagen-I mit 0,5 ml M199 oder 10 × D-MEM vermengt. Mit ca. 0,5 ml steriler 0,2 M NaOH wurde der pH des Kollagen-I/M199-Gemisches in den alkalischen Bereich gebracht. Beide Suspensionen wurden zu gleichen Teilen zügig aber vorsichtig mit einer 10-ml-Pipette durch Auf-und-Ab-Pipettieren ohne Luftblasen zu erzeugen vermengt. Sodann wurden je 0,5 ml pro Vertiefung einer 24-Loch-Platte ausplattiert und 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, damit die Kollagen-I-Gele auspolymerisieren. Im Anschluss wurden die festen Gele mit 100 µl D-MEM (incl. 15 % FCS) überschichtet, um eine ausreichende Nährstoffversorgung zu gewährleisten aber vor allem um eine Austrocknung der Gele zu verhindern. Eine Unterversorgung der Zellen wurde dadurch verhindert, dass die Methylzellulose selbst bereits in D-MEM gelöst wurde. Der Ansatz wurde weitere 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂

inkubiert, wobei sich in dieser Zeit Ausläufer migrierender Muskelzellen bilden. Sowohl die Länge als auch die Anzahl dieser Zellen wurden mikroskopisch mit Hilfe der morphologischen Analysesoftware AnalySIS von Olympus ausgewertet.

Compaction Assay

Durch die Resuspension von HuASMCs in Kollagen-I, wurde den Zellen eine Matrix angeboten, mit der sie interagieren bzw. die sie binden und so durch die kontraktile Kapazität der SMCs das auspolymerisierte Kollagen-I-Gel komprimieren können. Der Durchmesser des Gels wurde so als Maß für die relative Kontraktionsfähigkeit gemessen und interpretiert.

Hierzu wurden 50.000 Zellen/ml in 0,6 ml M199 oder $10 \times$ D-MEM aufgenommen und mit 5 ml Kollagen-I vermennt. Sodann wurde 0,5 ml pro Vertiefung einer 48-Loch-Zellkulturplatte ausplattiert und für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Gele mit 100 µl D-MEM (mit 15 % FCS) überschichtet und durch Entlangfahren mit einer gelben Spitze am Rand des Gels dieses von der Kulturschale gelöst. Nach vier weiteren Stunden wurde die erste Messung durchgeführt, wobei - mithilfe eines geeichten Okulars - der Durchmesser des Gels bestimmt wurde. Im weiteren Verlauf von 3-5 Tagen wurde so täglich der Geldurchmesser erfasst.

3.2 Analysemethoden

3.2.1 Immunfluoreszenzbasierte Analyse

Um eine spezifische Analyse mit Hilfe von Fluorophor-konjugierten Antikörper durchführen zu können, wurden Gefäße und Sphäroide (bestehend aus 3000 humaner SMCs) zunächst in Zink-Fixans inkubiert, dehydriert und anschließend in Paraffin eingebettet, um daraus Gewebeschnitte für die Immunhistochemie herzustellen.

Fixierung

Nach der Ernte und Zentrifugation der Sphäroide wurden diese einmal mit HBSS/- gewaschen und erneut bei $1000 \times g$ für 5 min sedimentiert. Nach dem Absaugen des überständigen HBSS/- wurden die Sphäroide mit 1 ml Zink-Fixans vermischt und für 16 h bei 4 °C fixiert. Darüber hinaus wurden auch Gefäße nach *in vivo*-Perfusion der Maus mit PBS und Zink-Fixans bzw. *ex vivo*-Perfusion der isolierten, Druck-perfundierten Gefäße für ca. 16 h bei 4 °C in Zink-Fixans nachfixiert.

Einbettung

Anschließend wurde zur Dehydratation der Proben eine Alkoholreihe nach absteigendem Wassergehalt: 70 %, 80 %, 96 %, 99 % Ethanol und abschließend 100 % Isopropanol durchlaufen, wobei diese in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) bei Raumtemperatur je 2 h pro Schritt inkubiert wurden. Die Gewebeproben wurden dabei auf einem Kipptisch bei ca. 20 rpm bewegt. Um die Sphäroide durch die mechanische Belastung nicht zu zerstören, wurden diese ohne Bewegung dehydriert, wobei die Sphäroide über die Inkubationszeit hinweg langsam absanken. Im Anschluss an die Alkoholreihe wurde der Alkoholüberstand restlos abgenommen und die Proben für ca. 16 h in flüssigem Paraffin bei 56 °C inkubiert. Zur Einbettung in Paraffin wurden die Gefäße aufrecht in einem Paraffinblock gestellt und eingebettet. Es wurden Schnitte mit einer Dicke von 5 µm angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträgern aufgenommen und für 16 h bei 42 °C getrocknet, bevor sie für weitere Analysen verwendet wurden.

Zur Einbettung der Sphäroide ließ man das Paraffin nach der Inkubation bei 56 °C im 1,5-ml-Reaktionsgefäß erstarren. Die untere Spitze (1 cm) des Reaktionsgefäßes wurde mit dem Skalpell abgeschnitten und der innere Paraffinkern, der die abgesunkenen Sphäroide enthält, aus der Plastikummantelung befreit. Dieser wurde mit der Spitze nach oben ebenfalls in einem Paraffinblock eingebettet. Microtomschnitte wurden, wie zuvor beschrieben, angefertigt.

Um die Schnitte auf den Objektträgern für die Färbung vorzubereiten, wurde das Paraffin wieder entfernt. Hierzu wurde eine Alkoholreihe nach absteigendem Alkoholgehalt durchlaufen: 100 % Xylol, 100 % Xylol, 99 %, 96 %, 80 %, 70 % Ethanol und aqua dest. Jedes Präparat wurde für je 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Immunfluoreszenzfärbung der Gewebe- und Sphäroidschnitte

Gewebeschnitte oder Sphäroide wurden durch Fluoreszenz-basierten Nachweis definierter Antigene analysiert und die Färbung quantitativ durch morphometrische Verfahren ausgewertet.

Gewebe sowie Sphäroidschnitte wurden für 10 min mit 0,5 % Saponin permeabilisiert. Im Anschluss wurden diese für 1,5 h bei Raumtemperatur mit Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Der Primärantikörper (siehe 2.9.1) wurde entsprechend der individuellen, optimalen Verdünnung in Blockierlösung verdünnt und für ca. 16 h bei 4 °C auf den Proben inkubiert. Es wurde zwei Mal 5 min mit PBST unter Rühren gewaschen und anschließend den passenden Sekundärantikörper (siehe 2.9.2) in Blockierlösung für 2 h bei Raumtemperatur im Dunklen auf die Schnitte gegeben. Danach wurden die Proben zweimal mit PBS für 5 min gewaschen und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur mit dem zellkernspezifischen Farbstoff

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in PBS (2 µg/ml) inkubiert. Es wurde weitere zweimal mit PBS gewaschen, bevor die Präparate in Mowiol eingedeckt und anschließend bei 4 °C gelagert bzw. mit dem Fluoreszenzmikroskop und der Analysesoftware Cell_R von Olympus analysiert wurden.

Immunzytochemie

Die humanen SMCs wurden nach Beendigung des Experiments in eiskaltem Methanol bei 4 °C für 15 min fixiert. Anschließend wurde das überständige Methanol dekantiert und unter dem Abzug für eine weitere Stunde zum Trocknen offen gelagert. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen oder eine starke Eigenfluoreszenz des Hintergrundes, wurden die Zellen mit Blocklösung für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Kipptisch bei 20 rpm inkubiert. Im Anschluss wurde der Primärantikörper (siehe 2.9.1) in der evaluierten, optimalen Verdünnung in der Blockierlösung verdünnt und auf den Zellen für 16 h bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBST wurde der Sekundärantikörper (siehe 2.9.2) in der optimalen Verdünnung in Blockierlösung für 2 h bei Raumtemperatur auf dem Kipptisch bei 20 rpm inkubiert. Anschließend wurden die humanen SMCs mit PBS gewaschen und zur Anfärbung der Nuklei wie beschrieben mit DAPI in PBS für 10 min bei Raumtemperatur versetzt. Zur Lagerung bei 4 °C bzw. zur Analyse am Fluoreszenzmikroskop wurden die Präparate in Mowiol eingedeckt. Zur quantitativen, morphometrischen Auswertung wurde die Software Cell_R von Olympus verwendet. Zur Quantifizierung der Grauintensitäten im Zytoplasma wurde diese in gleichgroßen, definierten regionen in mindestens 5 mikroskopischen Sichtfeldern (MOV) gemessen

3.2.2 Molekularbiologische Analysen

mRNA-Isolation, -Aufreinigung und PCR

Um Veränderungen in der Genexpression untersuchen zu können, wurden die Zellen mit HBSS/- gewaschen und die mRNA mit Hilfe des *RNeasy mini purification* Kits (Qiagen, Hilden) isoliert und aufgereinigt. Die Lyse der Zellen erfolgte mit Hilfe des sogenannten RLT Puffers, dem 10 % β-Mercaptoethanol zugesetzt wurde. Die Zellen wurden zügig abgeschabt und in ein RNase freies 2-ml-Reaktionsgefäß aufgenommen und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren, um die Degradation der RNA zu verhindern. Die Aufreinigung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei die RNA durch 1,5 Volumen eiskaltes 70 % Ethanol gefällt und an die Filtermembran der mitgelieferten Säule gebunden wurde. Zwischen jedem der Schritte wurde bei 8.000 × g für 15 sek zentrifugiert, um den Überstand im mitgelieferten Sammelgefäß aufzufangen. Es wurde einmal mit sogenanntem RW1-Waschpuffer und zwei weitere Male mit Ethanol-haltigen RPE-Waschpuffer gewaschen. Beim letzten Waschschrift wurde für 2 min bei 8.000 × g und anschließend zum Trocknen der Membran

bei maximaler Drehzahl für 1 min zentrifugiert. Die RNA wurde in 30 µl RNase freiem Wasser eluiert. Im Anschluss wurde die RNA-Menge mit Hilfe des NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Dreieich) gemessen.

Entsprechend der erzielten RNA-Menge wurden 300-1000 ng RNA in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde das Kit SensiScript RT (Qiagen, Hilden) verwendet. Die cDNA-Synthese erfolgte exakt nach Herstellerangaben (siehe folgende Tabelle). Die reverse Transkription erfolgte bei 37 °C für 1 h. Anschließend wurde die cDNA wurde 1:5 mit aqua dest. verdünnt.

Vor der Aufreinigung der mRNA speziell aus (murinem) Geweben wurde dies zunächst in RNA*later* (Qiagen, Hilden) bei 4 °C gelagert. Um die Gefäße zu rupturieren wurde dieses in 100 µl RLT (incl. 10 % β-Mercaptoethanol) aufgenommen und mit dem Ultraschallgerät so lange behandelt bis dieses optisch nicht mehr nachweisbar war. Das 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurde währenddessen auf Eis gelagert, um eine Erwärmung zu verhindern, da dies die RNA-Qualität mindert. Anschließend wurde die mRNA folgend dem bereits erläuterten Protokoll isoliert und in cDNA revers-transkribiert. Die folgende Zusammensetzung wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend vor der experimentellen Verwendung 1:5 mit RNase-freiem Wasser verdünnt.

	Eingesetzte Menge	Endkonzentration
RNase-freies Wasser	variabel	
10 × RT Puffer	2 µl	1 ×
dNTP Mix (5 mM je dNTP)	2 µl	0,5 Mm je dNTP
Oligo-dT Primer (10 µM)	2 µl	1 µM
SensiScript Reverse Transkriptase	1 µl	
RNA	variabel	< 50 ng

Eine PCR zur Analyse der mRNA Menge setzte sich wie folgt zusammen:

	Eingesetzte Menge	Endkonzentration
Wasser	35,5 µl	
10 × PCR Puffer	5 µl	1 ×
MgCl ₂	0,75 µl	1,5 mM
dNTPs (20 mM)	1,5 µl	0,6 mM
Primer for/rev	je 1 µl	1 µM
Taq (5 U/µl)	0,2 µl	0,02 U/µl
cDNA (5ng/µl)	5 µl	25 ng

miRNA-Isolation, –Aufreinigung und quantitative real-time-PCR

Zur schonenderen und effektiveren Lyse kürzerer RNA (20-25 Nukleotide), wie microRNA (miRNA), wurden HuASMCs nach dem PBS-Waschschritt in phenolhaltiger QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Hilden) inkubiert. Die Zellen wurden abgeschabt und mit dem Vortex stark vermischt. Zur Lyse der Zellen bzw. der Zellkerne wurden weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Zusetzen von Chloroform wurden beide Phasen mit dem Vortex gemischt und 3 min bei Raumtemperatur ruhenlassen. Zur klaren Trennung der Phasen wurde für 15 min bei 12.000 × g bei 4 °C zentrifugiert. So war eine klare, wässrige, eine weiße und eine rötliche, organische Phase erkennbar. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in eine mitgelieferte Aufreinigungssäule transferiert. Die enthaltene RNA wurde durch das Zusetzen von 1,5 Volumen eiskaltem 100 % Ethanol gefällt. Die folgenden Waschschrte wurden alle durch eine Zentrifugation bei 8.000 × g für 15 sek durchgeführt. Es wurde einmal mit RWT-Waschpuffer und zweimal mit RPE-Waschpuffer gewaschen, wobei das letzte Mal für 2 min, statt 15 sek zentrifugiert wurde. Um die Membran mit der gebundenen RNA zu trocknen, wurde für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und anschließend die RNA in 20 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

Zur Polyadenylierung, Elongation und reversen Transkription der miRNA wurde das miScript Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die folgende Zusammensetzung wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und im Anschluss für 5 min bei 95 °C.

Methoden

5 x miScript Puffer	2 µl
miScript Reverse Transkriptase	1 µl
500 ng total RNA	7 µl

Zur quantitativen Analyse der miRNA wurde eine real-time-PCR (RT-PCR) durchgeführt, wobei RNU6 als nicht regulierte Referenz-miRNA genutzt wurde. Die quantitative Analyse erfolgte durch einen mathematischen Algorithmus (Pfaffl 2001, Becker, Hammerle-Fickinger et al. 2010). Hierbei wird die relative Expression des Zielgens mit Hilfe der RT-PCR Effizienz (E) und dem ΔCP -Wert errechnet. Der ΔCP -Wert ist die Differenz zwischen der internen Kontrolle und dem behandelten Probe, wobei der CP-Wert die durch das RT-PCR-Gerät gemessene Erreichung eines Schwellenwertes darstellt. Die Effizienz wird durch das Testen der Primerspezifität mit einer definierten Menge RNA mit der Formel

$$E = 10^{\left(\frac{1}{\text{Zyklusanzahl}}\right)}$$

ermittelt. Im optimalen Fall wird eine Effizienz von 2 angenommen. Das Verhältnis der relativen Expression zwischen dem Referenzgen und dem Zielgen dient zur Analyse der Expression. Dies wird durch folgende Formel errechnet:

$$\text{ratio} = \frac{(E_{(\text{Zielgen})})^{\Delta CP_{(\text{Zielgen})}(\text{Kontrolle}-\text{Behandlung})}}{(E_{(\text{Referenzgen})})^{\Delta CP_{(\text{Referenzgen})}(\text{Kontrolle}-\text{Behandlung})}}$$

Die RT-PCR wurde nach der folgenden Zusammensetzung durchgeführt.

Wasser	3 µl	
SYBR Green Master Mix	10 µl	
Primer for/rev	je 1 µl	1 µM
cDNA (100pg/µl)	5 µl	0,5 ng

Proteinlyse

Zur Proteingewinnung bzw. Proteinaufreinigung wurden die Zellen zweimal mit kaltem HBSS/-gewaschen und anschließend in 300 µl Proteinlysepuffer für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Abschaben der Zellen mit Hilfe eines Gummischabers wurde die Zellsuspension in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß weitere 15 min auf Eis gelagert, wobei diese im Abstand von 3-5 min mit dem Vortex-Gerät gemischt wurden. Um die Lyse der Zellkerne zu optimieren, wurden die Proben mit dem Ultraschallgerät je zwei Mal für 5 sek behandelt. Verbleibende Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation der Proben für 15 min bei $15.000 \times g$ und $4^\circ C$ zentrifugiert von der Proteinsuspension

getrennt. Der Überstand wurde bis zur Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Wiederholte Auftau- und Einfrierzyklen wurden durch Aliquotieren der Proben vermieden.

Immunopräzipitation

Um zum einen ein definiertes Protein aufzukonzentrieren oder um Proteinmodifikationen nachzuweisen, wurde eine Immunopräzipitation durchgeführt. Hierzu wurde das gesamte durch die Proteinlyse gewonnene Lysat eingesetzt. Dieses wurde mit $8\text{ }\mu\text{g}$ Antikörper (siehe 2.9.1) für ca. 16 h bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter ständiger Bewegung inkubiert. Die Agarosebeads wurden zweimal mit PBS gewaschen, wobei zwischen den Waschsritten für 15 sek bei $8000 \times g$ zentrifugiert wurde. Für Antikörper aus dem Spendertier Hase wurden Agarose-A-Beads (Thermo Scientific, Dreieich) und für Antikörper aus dem Spendertier Ziege oder Maus wurden Agarose-G-Beads verwendet. Das Bead-Sediment wurde in PBS oder Lysepuffer aufgenommen und auf die Proben verteilt. Zur Bildung des Protein-Antikörper-Bead-Komplexes wurden die Proben für weitere 2 h bei Raumtemperatur unter konstanter Durchmischung inkubiert. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt für 15 sek bei $8.000 \times g$ wurde zweimal mit PBS gewaschen. Im Anschluss wird das Zentrifugat in $25\text{ }\mu\text{l}$ $2 \times$ Elutionspuffer aufgenommen und für 10 min bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ denaturiert, um den Protein-Antikörper-Bead-Komplex aufzulösen. Der Überstand wurde anschließend per SDS-PAGE aufgetrennt und nach einem Western Blot auf einer Nitrozellulosemembran per Immunanalytik untersucht.

Nukleäre Proteinextraktion

Zur Trennung zytosolischer und nukleärer Proteinfractionen wurden - mit HBSS/- gewaschene Zellen - in $100\text{ }\mu\text{l}$ Lysepuffer I lysiert und das Lysat in ein $1,5\text{-mL}$ -Reaktionsgefäß aufgenommen und mit dem Vortex-Gerät gemischt. Durch das Auf-und-Ab-Pipettieren mit einer $100\text{-}\mu\text{l}$ -Pipette wurde die Zellsuspension homogenisiert. Im Anschluss wurde bei $12.000 \times g$ für 15 min und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand enthielt die zytosolische Proteinfraction und wurde aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Zentrifugat wurde kurz und vorsichtig mit kaltem PBS gewaschen, um Reste der zytoplasmatischen Fraction zu entfernen. Im Anschluss wurden die verbliebenen Nuklei mit $20\text{-}40\text{ }\mu\text{l}$ Lysepuffer II resuspendiert und mit dem Puffer in $1,5\text{-mL}$ -Reaktionsgefäße auf Eis inkubiert, um etwaige Proteindegradationen oder Konformationsänderungen durch Erwärmung zu vermeiden. Um die Nuklei aufzuspalten, wurden die Proben zwei Mal 5 sek bei 50 Watt mit dem Ultraschallgerät behandelt und im Anschluss sofort wieder auf Eis gestellt. Durch eine weitere Zentrifugation bei $12.000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 15 min wurde die Trennung der restlichen Zellbestandteile vom proteinhaltigen Überstand erreicht. Der Überstand

wurde abgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proteinlysate wurden bis zu deren weiterer Verwendung bei -80 °C gelagert.

Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine (SDS-PAGE)

Um die aufgearbeiteten Proteinlysate hinsichtlich ihres Molekulargewichtes aufzutrennen, wurden die Lysate auf ein eindimensionales, diskontinuierliches Natriumdodecylsulfate-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE) aufgetragen. Falls die Proben eingefroren waren, wurden diese bei 4 °C aufgetaut, mit reduzierendem Roti-Load Puffer (BioRad, München) versetzt und 5 min bei 94 °C inkubiert, wobei die Eluate der Immunopräzipitation bereits gebrauchsfertig in 2 × Elutionspuffer vorlagen. Die Gele wurden in das Blot-Kammersystem (BioRad, München) eingesetzt und mit 1 × Laufpuffer überschichtet. Die Proben wurden in die vorbereiteten Taschen des Sammelgels (4 %) aufgetragen. Zu Beginn wurden konstante 80 V Spannung angelegt. Die negativ-geladenen Proteine werden so zur Anode hin aufgetrennt. Wenn die Proteine an den Übergang von Sammelgel zu Trenngel (12 %) gelangten, wurde die angelegte Spannung auf konstante 130 V erhöht. Im Anschluss wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

Proteintransfer im Nass-Blot-Verfahren

Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurden diese auf die Nitrozellulosemembran transferiert und immobilisiert (Western Blot). Hierzu wurde das SDS-Gel 5 min in Blotpuffer equilibriert und anschließend auf die Nitrozellulosemembran gelegt und mit vier weiteren in Blotpuffer getränkten Filterpapieren und zwei Schwämmen in eine Nass-Blot-Apperatur eingestellt und mit Blotpuffer überschichtet. Bei einer konstanten Stromstärke von 350 mA wurden die Proteine für 1,5 h horizontal übertragen. Um die Temperatur konstant zu halten und Erhitzung zu vermeiden, wurden Kühllakkus in das System eingesetzt. Veränderungen der Proteinsynthese wurden mittels Chemielumineszenz, wie im Folgenden aufgeführt, analysiert. Um die Transfereffizienz zu überprüfen, wurde das SDS-PAGE mit dem Protein-Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau R250 gefärbt, um nicht transferierte Proteinbanden sichtbar zu machen. Dieser Triphenylmethan-Farbstoff lagert sich an alle basischen Seitenketten der Aminosäuren an und färbt so unspezifisch alle vorhandenen Proteine.

Analyse der immobilisierten Proteine

Die Membran wurde mit TBST 5 min unter ständiger Rotation - zur Vermeidung von Austrocknung - gewaschen und im Anschluss für ca. 1 h bei Raumtemperatur blockiert, um unspezifische Bindungen und Hintergrundsignale zu minimieren. Zum Blockieren wurde entweder 5 % BSA in PBS für den

Nachweis phosphorylierter Proteine oder 5 % fettfreies Blotto in PBS (Santa Cruz, Heidelberg) zum allgemeinen Nachweis von Proteinen verwendet. Der Primärantikörper (siehe 2.9.1) wurde in Blockierlösung (in 0,5 % BSA oder 5 % Blotto) verdünnt und für ca. 16 h bei 4 °C auf der Membran inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBST wurde der Sekundärantikörper (siehe 2.9.2), welcher ebenfalls entweder in 5 % Blotto oder in PBS verdünnt wurde, für 2 h bei Raumtemperatur mit den immobilisierten Proteinen auf der Membran inkubiert. Die folgenden zwei Waschschrte erfolgten unter der Verwendung von PBS, da ein Detergenz die enzymatische Umsetzung der Detektionslösung Luminata Forte Western HRP Substrat (Millipore, Darmstadt) durch die an den Sekundärantikörper gekoppelten HRP-Reste beeinträchtigt. Die Detektionslösung inkubierte für 5 min auf der Nitrozellulosemembran, wobei anschließend die Chemilumineszenz-basierten Signale mit Hilfe des Image Quant LAS 4000 mini (GE Healthcare, München) detektiert wurden. Um die Expression des Zielproteins zu quantifizieren, wurde stets ein nicht reguliertes Referenz-Protein analysiert und mit der Expression des Zielproteins verglichen. Zur Analyse der Grauintensitäten wurde die Analysesoftware ImageJ der NIH (Bethesda, USA) verwendet.

3.3 Gefäßperusionsmodelle

Die Ergebnisse der *in vivo* Experimente wurden durch *ex vivo* Ansätze überprüft. So konnten Begleiteinflüsse durch die Behandlungen ausgeschlossen werden, wobei *ex vivo*-Methoden eine detaillierte Aussage über die ausschlaggebenden Veränderungen erlaubten.

Perfusion isolierter muriner Gefäße

C57BL/6 Mäuse wurden durch CO₂-Inhalation oder zervikale Dislokation getötet. Im Anschluss wurden die Arteria femoralis oder Mesenterialarterien 1. und 2. Ordnung ohne umliegendes Bindegewebe entnommen. Die Gefäße wurden in einer Perfusionskammer (DMT, Kopenhagen, Dänemark), die mit Zellkulturmedium D-MEM (mit 15 % FCS) gefüllt war, auf Metallkapillaren aufgezogen. Bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde für 6 h ein normotensiver Kontrolldruck (70 mmHg am Eingang der Kapillare und 50 mmHg am Ausgang der Kapillare) im Vergleich zu einem hypertensiven Druck (120 mmHg und 100 mmHg) angelegt. Dies entspricht in beiden Fällen einem longitudinalen Druckgradienten von 20 mmHg und einer transmuralen Druckdifferenz von 60 mmHg bzw. 110 mmHg bei einer Flussrate von ungefähr 0,07 ml/min. Im Anschluss an die Perfusion wurden die Gefäße für ca. 16 h bei 4 °C in Zink-Fixans fixiert bevor diese immunhistochemisch (siehe 3.2.1) oder molekularbiologisch (siehe 3.2.2) analysiert wurden.

3.4 *In vivo* Methoden

3.4.1 Tiermodelle

Um die Relevanz der experimentellen Daten in einem physiologischen Kontext zu überprüfen, wurden die folgenden *in vivo* Modelle verwendet. Die vorgestellten tierexperimentellen Modelle wurden unter der Leitung von Dr. Anja Feldner durchgeführt.

Bluthochdruckmodell

In der vorliegenden Arbeit wurde in C57BL/6 Mäusen Bluthochdruck erzeugt. Der Anstieg des systemischen Blutdruckes wurde durch die Erhöhung des Gesamtblutvolumens erreicht, indem Wildtyp-Mäusen für zehn Tage ein synthetisches Mineralocorticoid, Deoxycorticosteron Azetat (DOCA; 1 mg/1 g Körpergewicht) in Form einer Tablette, subkutan implantiert wurde (Iyer, Chan et al. (2010). Hierzu wurden die Mäuse Isofluran-narkotisiert (3 % (v/v)), wobei die Narkose stetig durch Zehen-Reflextests geprüft wurde. Die DOCA-Tablette wurde gemäß der Herstellerinstruktionen (Innovative Research of America, Sarasota, Florida, USA) verwendet und zusätzlich wurde dem Trinkwasser 1 % (w/v) NaCl zugesetzt. Zur Schmerzstillung wurde den Mäusen postoperativ 5 mg/kg Rimadyl subkutan in die Nackenfalte injiziert. Diese Behandlung führte durch die Erhöhung des Blutvolumens zu einer Steigerung der Herzvorlast und einer erhöhten transmuralen Druckdifferenz in den Gefäßen. Der systolische wie diastolische Blutdruck wurde mit Hilfe einer Maus-angepassten Blutdruckmanschette - ebenfalls unter Isofluran-Narkose - an jedem dritten Tag gemessen und dokumentiert (Pfisterer, Feldner et al. (2012).

Um Hochdruck-induzierten Veränderungen und weitere spezifische Marker zu analysieren, wurden die Tiere durch zervikale Dislokation oder CO₂-Inhalation getötet und das arterielle Gefäßsystem perfundiert, was dem Ausspülen des Blutes dient. Zur Perfusion wurden, 20 ml erwärmte Locke-Ringerlösung mit Hilfe einer Peristaltikpumpe bei einer Geschwindigkeit von 25 ml/min über den linken Ventrikel, durch das Herz-Kreislaufsystem und final aus dem geöffneten rechten Ventrikel gespült. Im Anschluss wurde auf dieselbe Art mit weiteren 20 ml Zink-Fixans perfundiert. Entnommene Gewebeproben wurden weitere 16 h in Zink-Fixans bei 4 °C inkubiert.

Hindlimb-Ischemia-Modell

Zur experimentellen Initiation Fluss-induzierter Remodellierungsprozesse von Arteriolen (Arteriogenese) wurde die Arteria femoralis von C57BL/6 Mäusen – im Alter von fünf Monaten - unter 3 % (v/v) Isofluran Narkose ligiert. Nach Entfernung des Fells wurde entlang der sichtbaren Femoralarterie ein Schnitt gesetzt. Das Nervenbündel, die Vene und die Arterie wurden identifiziert

und unterhalb des Ursprungs der tiefen Arteria femoralis wurde die A. femoralis etwas freigelegt und mit Hilfe eines seidenen, sterilen Wundnahtfadens abgebunden. Sieben Tage nach Behandlung wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation oder CO₂-Inhalation getötet und - wie zuvor beschrieben - perfundiert, wobei nach dem Spülen mit Locke-Ringerlösung erfolgte dabei eine Perfusion mit Pigmentpartikeln in Zink-Fixans. Diese Art der Perfusion erlaubte eine morphologische Auswertung bzw. die Visualisierung des arteriellen Gefäßsystems. Nach Aufhellung des Gewebes war es möglich Adaptionen wie die Vergrößerung der kollateralen Arteriolen bei der Arteriogenese auszuwerten. So wurde die kapilläre Dichte, deren Durchmesser und die Anzahl mit der Analysesoftware Cell_R von Olympus analysiert (2009). Die Resuspension bzw. Lösen der Pigmentsuspension wurde durch das Ultraschallgerät (je 2 min) erreicht. Ungelöste und großförmige Partikel wurden durch Zentrifugation für 1 min bei 1000 × g getrennt, weshalb nur der Überstand für die Perfusion verwendet wurde (2008). Anschließend an die Perfusion wurde das Gewebe entnommen und 16 h bei 4 °C in der Aufhellungslösung inkubiert (Spalteholz 1914). Um die mit Partikel gefüllten Arterien und Arteriolen auszuwerten, wurde das Gewebe aufgehellt bzw. transparent gemacht, indem der Kontrast zwischen dem Gewebe und den Gefäßen erhöht wurde bzw. der Brechungsindex der Lösung und des Gewebes angeglichen wurde. Die Proben wurden weiterhin in dieser Lösung gelagert bzw. es wurden die remodellierenden Gefäße herauspräpariert, um die RNA-Menge zu isolieren und aufzureinigen.

Ohrmuschelvenenligationsmodell

Das etablierte Modell zur Initiation und Untersuchung der Varizenbildung in der Maus ist die Ligation der Ohrmuschelvene. Männliche NMRI-Mäuse wurden unter 3 % (v/v) Isofluran narkotisiert. Eine Vene erster Ordnung wurde mit Wundnahtmaterial ligiert. Die Veränderung der Venen wurde mit einer hochauflösenden Kamera (Olympus, Hamburg) dokumentiert und mit der Analysesoftware ImageJ (NIH, Bethesda, USA) ausgewertet. Sieben Tage nach der Ligation wurden die Tiere durch CO₂-Inhalation und zervikale Dislokation getötet und retrograd perfundiert. Hierbei wurde in den rechten Ventrikel eingestochen und der linke Ventrikel angeschnitten, um das venöse System zu durchspülen. Nach 20ml Locke-Ringerlösung wurden die Venen mit 20 ml Gouache-Partikel in Zinkfixans perfundiert (Feldner, Otto et al. 2011). Im Anschluss an die Perfusion wurden die Gewebe in Aufhellungslösung für 16 h bei 4 °C inkubiert. Um die Gefäße mit Hilfe von Immunfluoreszenz-techniken spezifisch anzufärben und die Färbeintensität auszuwerten, wurden die Tier mit 20 ml Zink-Fixans perfundiert und anschließend für ca. 16 h bei 4 °C inkubiert.

3.5 Statistik

Die erhobenen Daten wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Der statistische Vergleich zweier Datengruppen wurde mit Hilfe des Student'schen T-Tests durchgeführt, wobei ein p-Wert bis 0,05 als signifikant betrachtet wurde. Drei und mehr Gruppen wurden durch einen ANOVA-Test in Kombination mit einem Bonferroni posthoc-Test für ausgewählte Gruppen statistisch miteinander verglichen. Auch hier wurde ein p-Wert bis 0,05 als statistisch signifikant erachtet. Die Korrelationsanalyse wurde durch die Ermittlung des Pearson-Korrelationskoeffizienten (r) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Funktionelle Konsequenzen des Myokardin-Knockdowns auf vaskuläre glatte Muskelzellen

Zur Untersuchung der Funktion von Myokardin auf zellulärer Ebene wurde die Myokardin-mRNA bzw. deren Translation durch den Einsatz von Myokardin-spezifischer siRNA in HuASMCs posttranskriptionell inhibiert. Die Effizienz des Myokardin-Knockdowns (75 %) wurde sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene verifiziert (siehe Abbildung 9). Dieses Verfahren ermöglichte die Analyse der funktionalen Konsequenzen des Myokardin-Knockdowns in SMCs, wie beispielsweise die der funktionellen Bedeutung von Myokardin für die Migration oder Proliferation. Diese Experimente wurden nach dem siRNA-vermittelten Knockdown von Myokardin zum einen in 2-dimensionaler Kultur durchgeführt, sowie unter Verwendung 3-dimensionaler Sphäroide. Das Sphäroidmodell stellt die mehrschichtige Anordnung der glatten Muskelzellen nach und fördert so ein organotypisches, weitgehend physiologisches Verhalten dieser Zellen.

Durch den siRNA-induzierten Knockdown wurde eine Verminderung der Myokardin-Expression auf mRNA- sowie Proteinebene in HuASMCs erreicht. Zusammenfassend kommt es scheinbar zu einer Verringerung der kontraktilen Kapazität bzw. Bindefähigkeit an Kollagen-I, sowie Proliferation und MMP-9-Proteinsynthese. Darüber hinaus hat der Knockdown von Myokardin eine Verminderung der mRNA- sowie Proteinmenge von Myokardin-Zielgenen (Calponin, SMA, SM-MHC) zur Folge, welche Teile des Kontraktilität-regulierenden Apparates sind.

4.1.1 Der Knockdown von Myokardin hat keinen Einfluss auf die glattmuskuläre Migration

Die HuASMCs wurden in eine Kulturschale ausgesät, in die zuvor eine sterile Silikonmauer definierter Größe platziert worden war, um so eine distinkte Zellgrenze zu schaffen ohne die Zellen zu schädigen. Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion mit der Myokardin-spezifischen siRNA wurden die Silikonbarrieren entfernt, um über drei Tage hinweg den geringsten Abstand der Grenzen zu messen. Diese Analyse ergab keinerlei Änderungen im lateralen Migrationsverhalten der HuASMCs nach Myokardin-Knockdown im Vergleich zu HuASMCs, die mit einer Kontroll-siRNA behandelt waren (Abbildung 10 A).

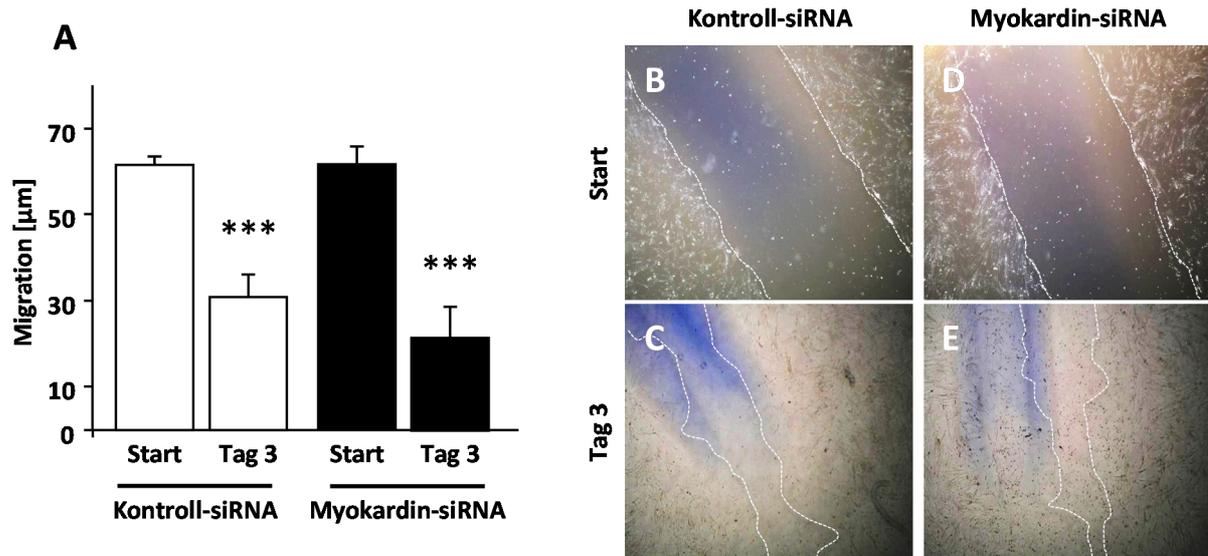


Abbildung 10: Migration von HuASMCs nach Knockdown von Myokardin

Das Migrationsverhalten der HuASMCs nach Myokardin-Knockdown wurde nach Entfernen der Silikonbarrieren täglich gemessen und hinsichtlich des Einflusses von Kontroll-siRNA (A, *** $p < 0,001$ Start vs. Tag 3, $n=3$, vgl. B und C) bzw. Myokardin-siRNA (A, ns $p > 0,05$ Kontroll-siRNA vs. Myokardin-siRNA Tag 3, vgl. C und E) analysiert. Die Distanz der Wachstumsfronten wurde in μm gemessen.

4.1.2 Verminderung der kontraktile Kapazität der Muskelzellen nach Myokardin-Knockdown

Der transkriptionelle Koaktivator von SRF, Myokardin, reguliert die Transkription von Genprodukten des kontraktile Apparates. Nach siRNA-gestütztem Knockdown von Myokardin wurden suspendierte HuASMCs in Rattenschwanz-Kollagen-I aufgenommen, das nach pH-Neutralisation auspolymerisierte. Die SMCs binden das angebotene Rattenschwanz-Kollagen-I und ziehen so durch die glattmuskuläre Kontraktion das Gel zusammen bzw. komprimieren es. Durch die Kontraktionsfähigkeit der SMCs kommt es zu einer Verkleinerung des Durchmessers, was die Gele kompakter erscheinen lässt. Im Verlauf von drei Tagen wurde der Durchmesser des Kollagen-I-Gels gemessen. Der Knockdown von Myokardin hatte eine signifikant verminderte Fähigkeit zur Schrumpfung des Kollagengels durch die glattmuskuläre Kontraktion zur Folge (Abbildung 11 A, vgl. B und C).

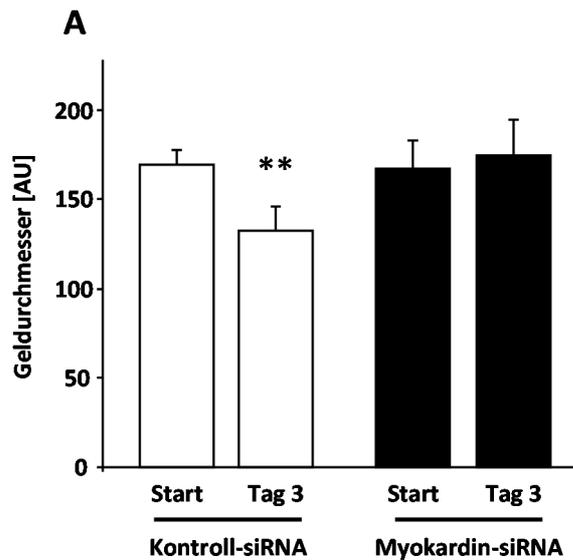
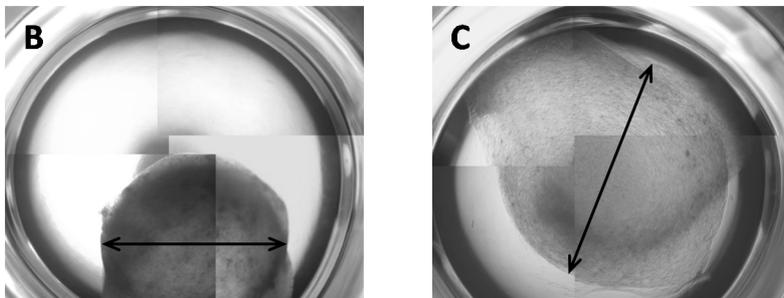


Abbildung 11: Glattmuskuläre Kontraktilität nach siRNA-vermitteltem Myokardin-Knockdown in HuASMCs

Zur Untersuchung glattmuskulärer kontraktile Kapazität in Abhängigkeit von Myokardin wurden HuASMCs mit Myokardin-spezifischer siRNA behandelt und nach 48 h Exposition in einem Kollagen-I-Gel resuspendiert. Darauf folgend wurde täglich der Durchmesser bzw. die Komprimierung unter Kontrollbedingungen (B) bzw. nach Myokardin-Knockdown (C) der Gele in arbiträren Einheiten (AU) gemessen (A, n=5, **p<0,01 Kontroll-siRNA Start vs. Tag 3; ns p>0,05 Myok. siRNA Start vs. Tag 3).



4.1.3 Verminderte Proteinsynthese des kontraktile Apparates sowie eine vermehrte Proliferation nach Myokardin-Knockdown

Um den Verlust der kontraktile Kapazität genauer zu studieren, wurde die Expression von Proteinen des kontraktile Apparates im 3-dimensionalen Sphäroidmodell untersucht. Die immunfluoreszenzbasierte Analyse der Sphäroide zeigte eine reduzierte mRNA-Expression von Calponin, SMA und *smooth muscle myosin light chain* (SM-MLC) auf mRNA- (Abbildung 12 A) sowie in der Analyse der spezifischen Fluoreszenzintensität, die die Proteinsynthese widerspiegelt, (Abbildung 12 C) nach Myokardin-Knockdown.

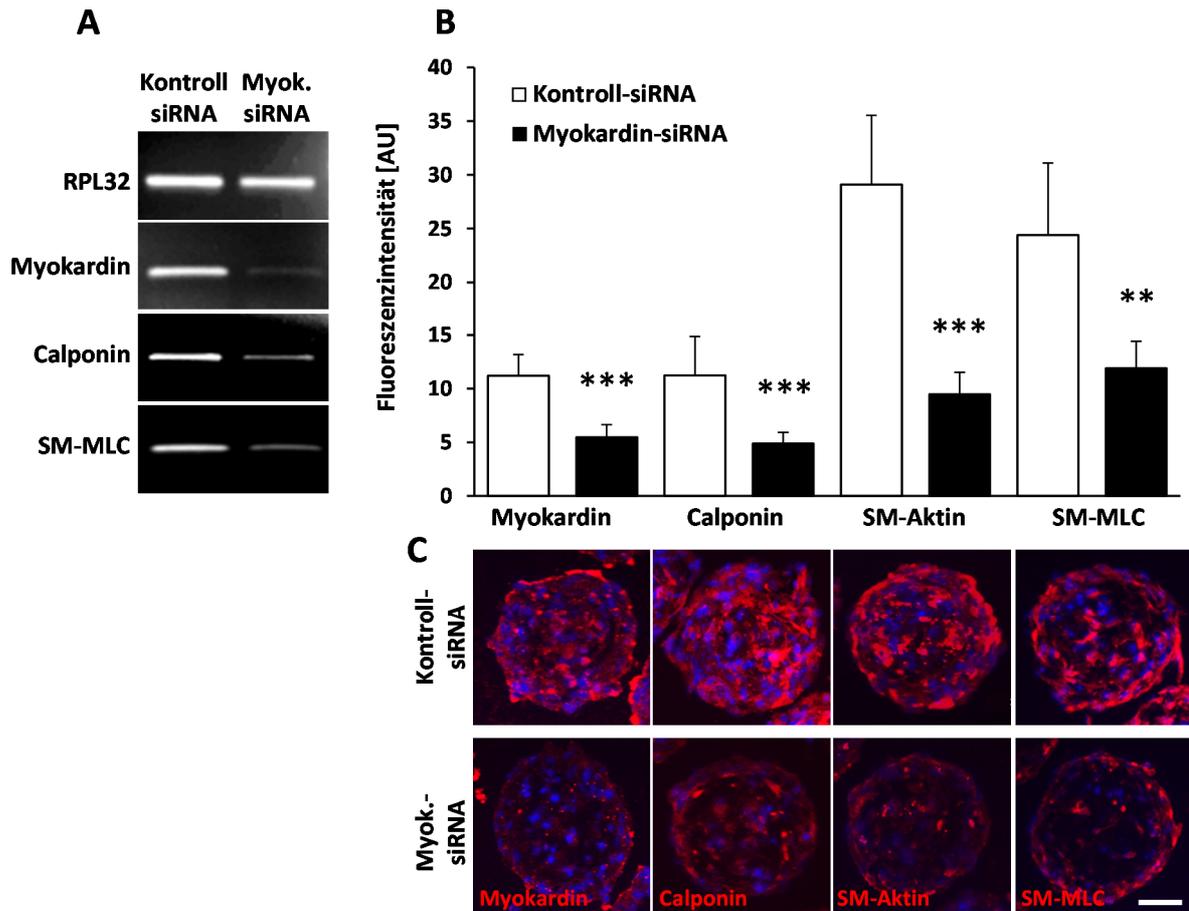


Abbildung 12: Expression von Markergenen des kontraktiven Apparates nach Knockdown von Myokardin

Die Untersuchung 3-dimensionaler Sphäroide zeigt links die Analyse der mRNA-Expression (A) und rechts die Proteinsynthese Kontraktilitäts-assoziiierter Genprodukte (B, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ Kontroll-siRNA vs. Myokardin-siRNA, $n = 4$ mit je 5-10 Sphäroiden pro Gruppe). Die Analyse der Fluoreszenzintensität wurde mittels Grauwertbestimmung gemessen und in arbiträren Einheiten (*arbitrary units*) angegeben (C, Maßbalken: 50 μm).

Der *myocardin-related factor-A* (MRFT-A) sowie der *myocardin-related factor-B* (MRFT-B), sind Strukturhomologe von Myokardin und werden daher unter dem Begriff der Myokardinfamilie zusammengefasst. Um eine Kreuzreaktivität der Antikörper wie auch einen Effekt des Myokardin-Knockdowns auf den Transkriptionsfaktor MRTF-A ausschließen zu können, wurde dessen Proteinsynthese im Sphäroidmodell untersucht. Der Myokardin-Knockdown hatte keinerlei Effekt auf die zelluläre Lokalisation oder Proteinsynthese von MRTF-A. Darüber hinaus kam es auch zu keiner Änderung der mRNA-Expression nach Myokardin-spezifischem Knockdown, sowie nach zyklischer Dehnung sowohl von MRTF-A als auch von MRTF-B (Daten nicht gezeigt).

Zur Untersuchung eines Zusammenhanges zwischen der Expression von Myokardin und der Proliferation kultivierter SMCs wurde in einem 2-dimensionalen Ansatz die relative Proliferation der HuSMCs nach Myokardin-Knockdown analysiert. Das Auszählen der tatsächlichen Zellzahl erwies

sich als schwankend bzw. unpräzise und ließ daher keine genaue Aussage hinsichtlich der Zellzahl bzw. Proliferation der HuASMCs zu. Daher erwies sich die Färbung und Analyse von HuASMC-Sphäroiden in technischer Hinsicht als spezifischer und robuster, vor allem kommt, wie gesagt, dieser experimentelle Ansatz der organotypischen Anordnung der SMCs näher. Interessanterweise, zeigte die Immunfluoreszenzanalyse des Proliferationsmarkers Ki67 eine signifikant vermehrte Anzahl Ki67-positiver Nuklei nach siRNA-basiertem Knockdown von Myokardin (Abbildung 13).

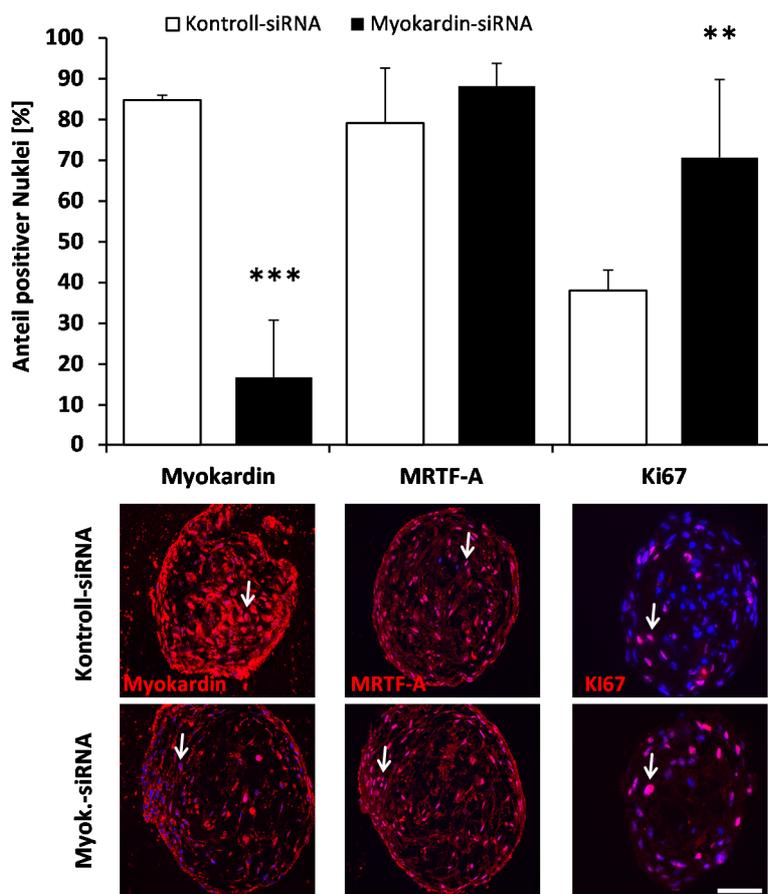


Abbildung 13: Analyse der Proliferationsrate und Expression von MRTF-A nach Myokardin-Knockdown im 3-dimensionalen Zellkulturmodell

Hierzu wurde der prozentuale Anteil positiver Nuklei bestimmt (je hervorgehoben durch Pfeile), wobei jeweils zur Analyse 4-8 unabhängige Sphäroide ausgewertet wurden: Myokardin (** $p < 0,001$ Kontroll-siRNA vs. Myok.-siRNA), MRTF-A (ns $p > 0,05$ Kontroll-siRNA vs. Myok.-siRNA) bzw. Ki67 (** $p < 0,01$ Kontroll-siRNA vs. Myok.-siRNA, $n = 4-8$, Maßbalken: 25 μm).

Da es im Zuge maladaptiver Remodellierungsprozesse zu Umstrukturierungen und zum proteolytischen Abbau der ECM kommt, wurde im nachfolgenden Ansatz die Proteinsynthese der Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2) und -9 (MMP-9) untersucht (Abbildung 14). Der durch siRNA-induzierte Knockdown von Myokardin führt zu einer Reduktion der MMP-9-spezifischer Immunfluoreszenz im 3-dimensionalen Zellkulturmodell, wohingegen bei MMP-2 keine Änderung der Proteinsynthese festgestellt wurde.

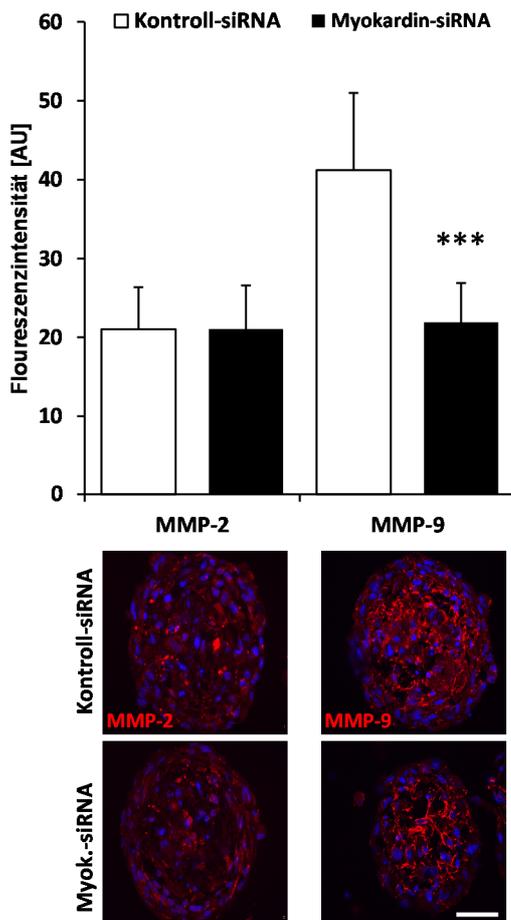


Abbildung 14: Analyse der Proteinsynthese von MMP-2 und MMP-9 nach Myokardin-Knockdown in glattmuskulären Sphäroiden

Der Einfluss der siRNA-induzierten Inhibition von Myokardin auf MMP-2 und MMP-9 wurde durch die Analyse der Grauwerte untersucht und ist daher in AU angegeben. Es wurden hierzu 7-8 unabhängige Sphäroide analysiert und im oberen Graphen die statistische Auswertung dargestellt: MMP-2- (ns $p > 0,05$ Kontroll-siRNA vs. Myokardin-siRNA), bzw. die MMP-9-spezifischen Immunfluoreszenz (***) $p < 0,001$ Kontroll-siRNA vs. Myokardin-siRNA, Maßbalken: 25 μm .

4.1.4 Die Invasion von HuSMCs in ein 3-dimensionales Kollagen-I-Gel ist nach Myokardin-Knockdown vermindert

Zum Studium der glattmuskulären Invasionsfähigkeit wurden 48 h nach dem siRNA-basierten Knockdown von Myokardin 3-dimensionale Sphäroide in Kollagen-I-Gele resuspendiert. Die SMCs bilden „Ausläufer“ oder Protrusionen ausgehend von den Sphäroiden in das Gel hinein. Diese stellen daher migrierende bzw. proliferierende SMCs dar. Nach 24 h wurde die Anzahl und Länge (in μm) der Protrusionen ausgewertet. Durch den Myokardin-Knockdown kam es zu einer signifikanten Verringerung sowohl in der Anzahl der Ausläufer (Abbildung 15 D) als auch in deren Länge (Abbildung 15 E).

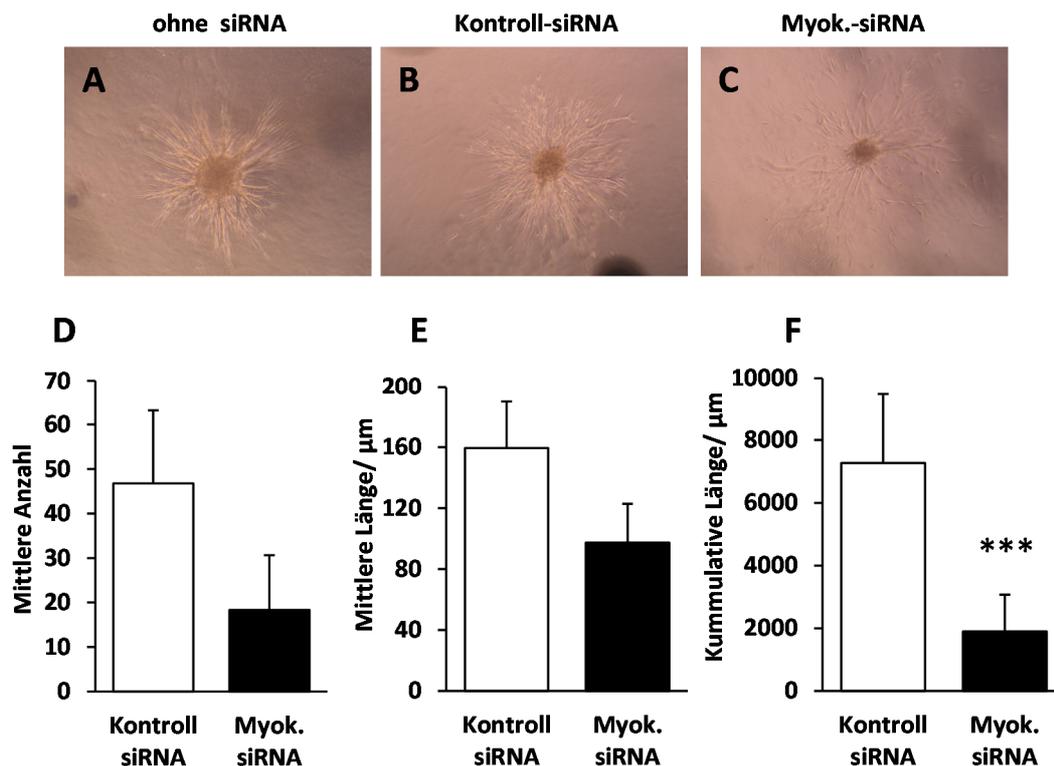


Abbildung 15: Untersuchung der Invasion humaner SMCs in ein Kollagengel nach Myokardin-Knockdown

Zum Studium des Einflusses von Myokardin auf die glattmuskuläre Migration/Invasion wurden HuASMC-Sphäroide in Kollagengele eingebettet und die Anzahl (D), die Länge (in μm , E) sowie die kumulative Länge der glattmuskulären Ausläufer (in μm , F) nach 24 h bestimmt (** $p < 0,001$ bzw. ns $p > 0,05$ Kontroll-siRNA vs. Myok.-siRNA, $n=3$). Es wurden 30 Sphäroide in je drei unabhängigen experimentellen Ansätzen analysiert.

4.2 Myokardin unter dem Einfluss biomechanischer Faktoren *in vivo*

Vaskuläre Remodellierung geht zunächst mit der Verminderung der strukturellen Integrität der Gefäßwand einher, da bedingt durch die Aktivierung der SMCs kommt es zu vermehrter Migration und Proliferation der Media in die sogenannten Neointima. Die bisherigen Daten legen einen Zusammenhang zwischen der Stabilität der Media bzw. der glattmuskulären Aktivierung und der Expression von Myokardin nahe, da nach Inhibition von Myokardin sowohl die Proliferation als auch die Invasion der SMCs steigt. Eine Blockade der Aktivierung der SMCs würde auch die folgende maladapative arterielle Remodellierung möglicherweise erfolgreich verhindern. Bislang ist nur eine Rolle von Myokardin bei der embryonalen glattmuskulären Differenzierung beschrieben, im adulten Organismus insbesondere nach pathologischer Aktivierung ist diese nahezu unbekannt. Aufgrund der bisher erhobenen Daten, schien es möglich, dass Myokardin eine Rolle bei der glattmuskulären Dedifferenzierung im adulten Organismus spielt. Um diese Hypothese *in vivo* zu überprüfen, wurde die Expression und Lokalisation von Myokardin in zwei Tiermodellen arterieller Remodellierung näher untersucht. Sowohl im *hindlimb-ischemia*-Modell als auch im DOCA-Salz-Hypertoniemodell

wird die arterielle Reorganisation - vor allem durch die Erhöhung der Wandspannung im Blutgefäß - verursacht (Lacolley, Regnault et al. 2012).

Interessanterweise, zeigte die Analyse dieser Tiermodelle, dass Myokardin in Folge einer erhöhten Wandspannung abgebaut wird. Diese Inhibition von Myokardin nach biomechanischem Stress wurde sowohl im Kontext vaskulärer Remodellierung im arteriellen System (Arteriogenese, Hypertension) als auch in venösen Gefäßen (Varikosis) nachgewiesen. Um systemische Einflüsse im Tiermodell nach diesen experimentellen Eingriffen ausschließen zu können, wurden Femoralarterien sowie Facialvenen einer erhöhten transmuralen Druckdifferenz und damit einhergehend einer erhöhten Wandspannung ausgesetzt. Auch in diesem *ex vivo*-Modell kommt es zu einer verminderten Myokardin-spezifischen Fluoreszenzintensität und einer Initiation von Remodellierungsprozessen - sowohl in der arteriellen als auch in der venösen Media.

4.2.1 Experimentell induzierte Arteriogenese führt zur Verminderung der Myokardin-Proteinsynthese in SMCs

Durch die Ligation der Arteria femoralis distal der Arteria profunda in C57BL/6 Mäusen, wurde lokal in den kollateralen Arteriolen der Blutfluss erhöht. Die damit einhergehende Erhöhung der Schubspannung induziert eine vermehrte Freisetzung von NO aus den Endothelzellen dieser Gefäße mit der Folge, dass diese dilatieren (flussinduzierte Vasodilatation). Durch den erhöhten Volumendurchsatz steigt gemäß der Laplace-Beziehung die Wandspannung deutlich an, während sich die Schubspannung praktisch normalisiert. Die SMCs werden dabei longitudinal gedehnt werden (Demicheva, Hecker et al. 2008). Sieben Tage nach der Induktion der Arteriogenese wurde zunächst die Morphologie der kollateralen Arteriolen hinsichtlich adaptiver Veränderungen untersucht (Abbildung 16 A). Dabei zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Arteriolendurchmessers im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 16 vgl. B und C). Um das Ausmaß der hierbei zugrunde liegenden Remodellierung zu überprüfen, wurde die Dicke der Media als Maß für die glattmuskuläre Proliferation/Hyperplasie gemessen, die nach Ligation signifikant erhöht war (Abbildung 16 D). Dagegen war die Fluoreszenzintensität von Myokardin in der Media der remodellierender Arteriolen signifikant reduziert (Abbildung 16 E, vgl. F und G).

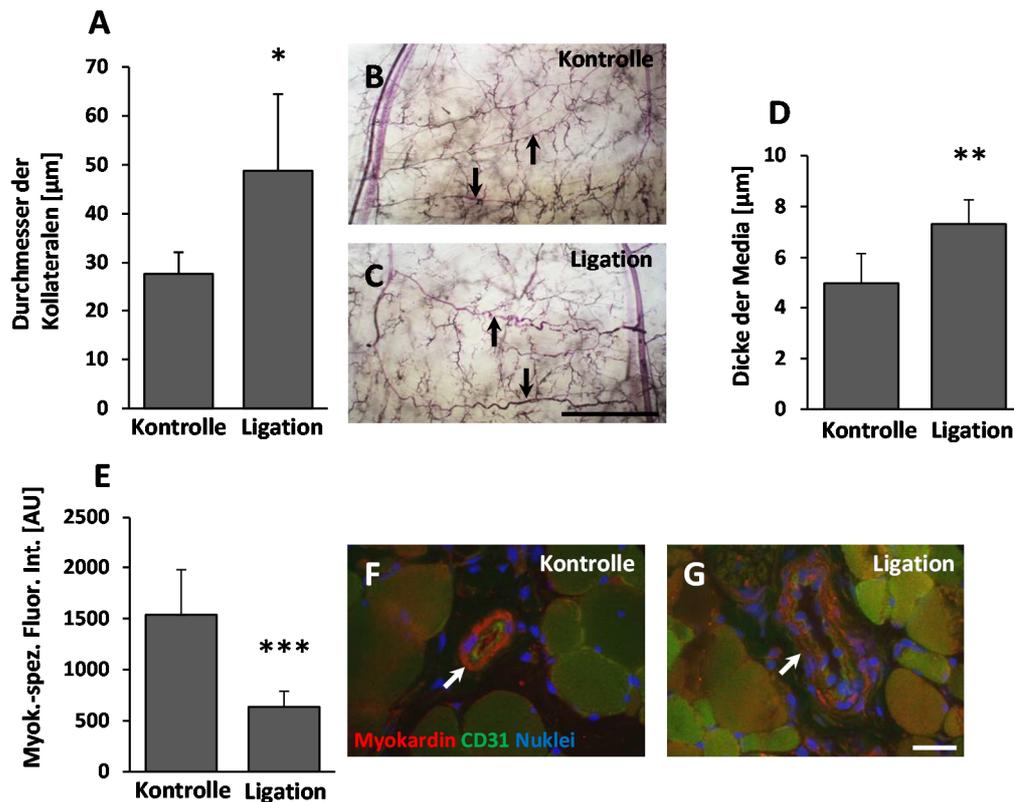


Abbildung 16: Untersuchung muriner Gefäße nach der Induktion von Arteriogenese hinsichtlich vaskulärer Remodellierung und der Myokardin-Menge in der Media

Die arterielle Remodellierung wurde 7 Tage nach Ligation anhand der Messung des luminalen Durchmessers der kollateralen Arterien (A, in μm $*p < 0,05$ Kontrolle vs. Ligation, $n=5$, vgl. B und C, Maßbalken: $2000 \mu\text{m}$) sowie der Dicke der Media (D, in μm , $**p < 0,01$ Kontrolle vs. Ligation) bestimmt. Remodellierende kollaterale Arterien sind durch Pfeile hervorgehoben (vgl. B und C). Die Analyse der Myokardin-spezifischen Fluoreszenzintensität der Media dieser Gefäße (vgl. F und G, hervorgehoben durch Pfeile) wurde mittels Grauintensitätenmessung untersucht (E, $***p < 0,001$ Kontrolle vs. Ligation, $n=5$, Maßbalken: $20 \mu\text{m}$).

4.2.2 Die nukleäre Myokardin-Menge ist nach Erhöhung des Blutdrucks vermindert

Deoxycorticosteron Azetat (DOCA) ist ein synthetisches Mineralocorticoid (Iyer, Chan et al. 2010), das hauptsächlich auf das Epithel des Sammelrohrs der Niere wirkt (Falk 1962). Es kommt zu einer verstärkten Natriumrückresorption, bei gleichzeitig vermehrter Kaliumsekretion. Die erhöhte Natriumaufnahme steigert die Wasserretention und damit kommt es zu einer Steigerung des zirkulierenden Blutvolumens und damit vor allem zu einem ausgeprägten Anstieg des systolischen Blutdruckwertes (Volumenhochdruck, renale Hypertonie). Die Zunahme des Volumens wird durch die gleichzeitige Gabe von NaCl-haltigem Trinkwasser unterstützt. Im Rahmen dieser Blutdruckerhöhung, die ihr Maximum nach etwas zehn Tagen erreicht (Abbildung 17 A), war die Signalintensität des Proliferationsmarkers (PCNA) in der Media der Arteria femoralis dieser hypertensiven Tiere deutlich erhöht (Abbildung 17 B), während die Fluoreszenzintensität von Calponin signifikant gesenkt war (Abbildung 17 C). Darüber hinaus zeigte die Fluoreszenztechnische

Analyse eine signifikant reduzierte Intensität von Myokardin in der Media dieser Gefäße (Abbildung 17 D). Neben der Reduktion der gesamten Fluoreszenzintensität zeigte die Analyse der medialen SMCs eine reduzierte Anzahl gefärbter Nuklei (Abbildung 17, vgl. G und J) in Arterien hypertensiver Mäuse.

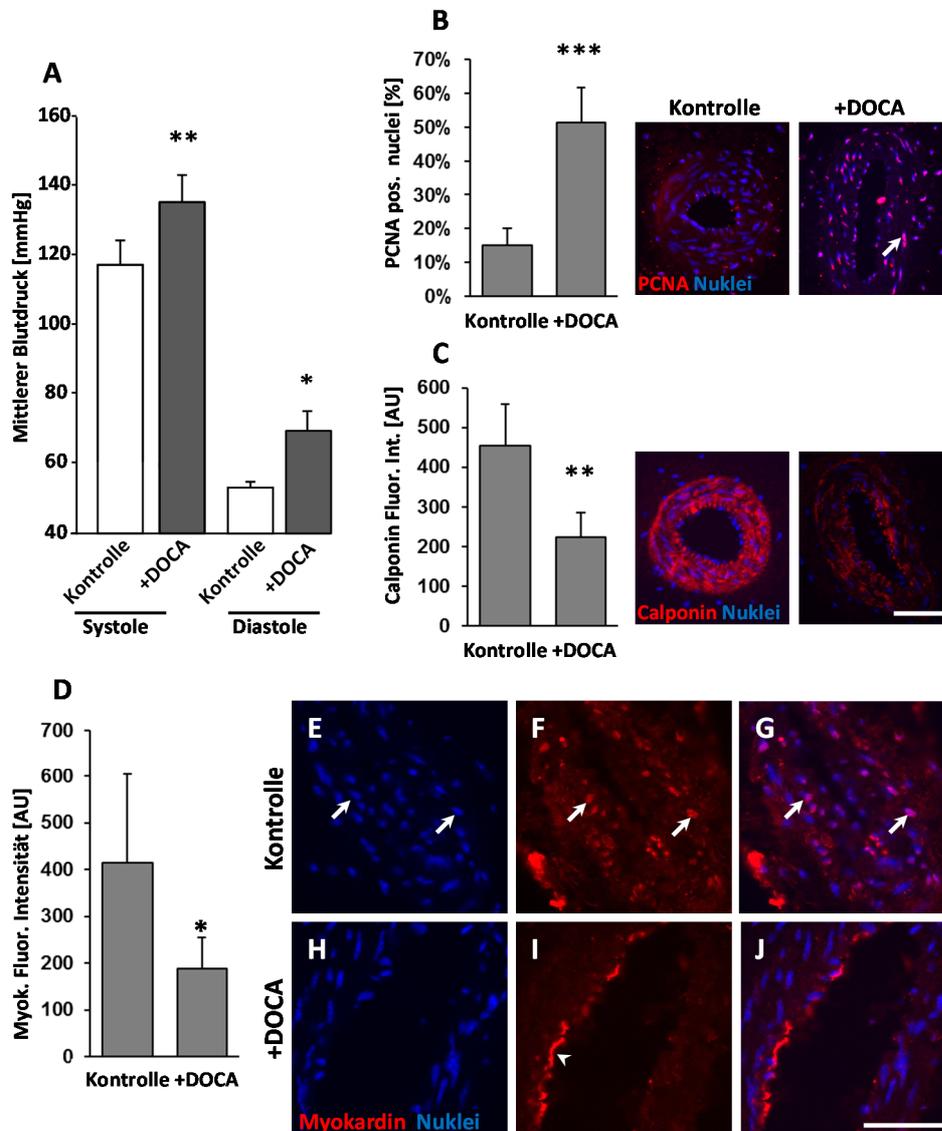


Abbildung 17: Untersuchung der Gefäßremodellierung im murinen Hypertoniemodell nach DOCA-Salz-Behandlung

Der Blutdruck der Kontrolltiere sowie der DOCA-Salz-behandelten Mäusen wurde nach 10 Tagen unter Narkose mithilfe einer Maus-angepassten Blutdruckmanschette gemessen (A, $**p < 0,01$, $*p < 0,05$, $n=5$). Zur Analyse der Proliferation remodellierenden Arteria femoralis wurde der prozentuale Anteil PCNA-positiv gefärbter Kerne in der Media ausgezählt (B, $***p < 0,001$ Kontrolle vs. DOCA). Darüber hinaus wurde die Calponin-spezifische Fluoreszenzintensität mittels Grauwertanalyse gemessen (C, $**p < 0,01$ Kontrolle vs. DOCA, Maßbalken: 50 μm). Links jeweils die graphische Darstellung der statistischen Auswertung und rechts eine repräsentative Aufnahme von insgesamt 5 Tieren je Gruppe. Die Fluoreszenzintensität von Myokardin wurden ebenso mittels Messung der Grauwerte untersucht (D, $*p < 0,05$ Kontrolle vs. DOCA). Die Pfeile heben Myokardin-positiv gefärbte Nuklei hervor (Pfeile G und J, Maßbalken: 50 μm). I: unspez. Färbung von Serumpräzipitat auf Endothelzellen.

4.2.3 Reduktion der Myokardin-Proteinsynthese in der remodellierenden Venenwand

Um zu überprüfen, ob der beobachtete Verlust der Myokardin-Proteinsynthese nur bei arteriellen Remodellierungsprozessen infolge einer Erhöhung der Wandspannung auftritt, wurden zusätzlich vergleichbare Remodellierungsprozesse in Venen untersucht. Ein typischer venöser Remodellierungsprozess ist die Bildung von Varizen (Feldner, Otto et al. 2011), welche biomechanisch über die Erhöhung des hydrostatischen Druckes und damit der Wandspannung induziert sind. Die Untersuchung humaner Varizen zeigte eine Verminderung der Myokardin spezifischen Fluoreszenzintensität im Vergleich zu gesunden Kontrollvenen (Abbildung 18 A). Da dieser Prozess durch unterschiedliche Faktoren begünstigt sein kann, wurde die Rolle der gesteigerten Wandspannung in diesem Kontext genauer untersucht. Um den Einfluss der Wandspannung und damit den Ausschluss systemischer Stimuli des humanen Organismus hierbei zu bestätigen, wurde durch die Ligation der murinen Ohrmuschelvene experimentell eine lokale Erhöhung des Blutflusses im venösen System erzeugt (Feldner, Otto et al. 2011). Die Venen zeigen nach sieben Tagen der Ligation die typische Korkenzieher-artige Struktur von Varizen einhergehend mit einer massiven Durchmesserergrößerung. Die Analyse der remodellierenden Venen bestätigte eine signifikante Reduktion der Myokardin-Proteinsynthese bzw. Fluoreszenzintensität in der einschichtigen, venösen Media (Abbildung 18 B).

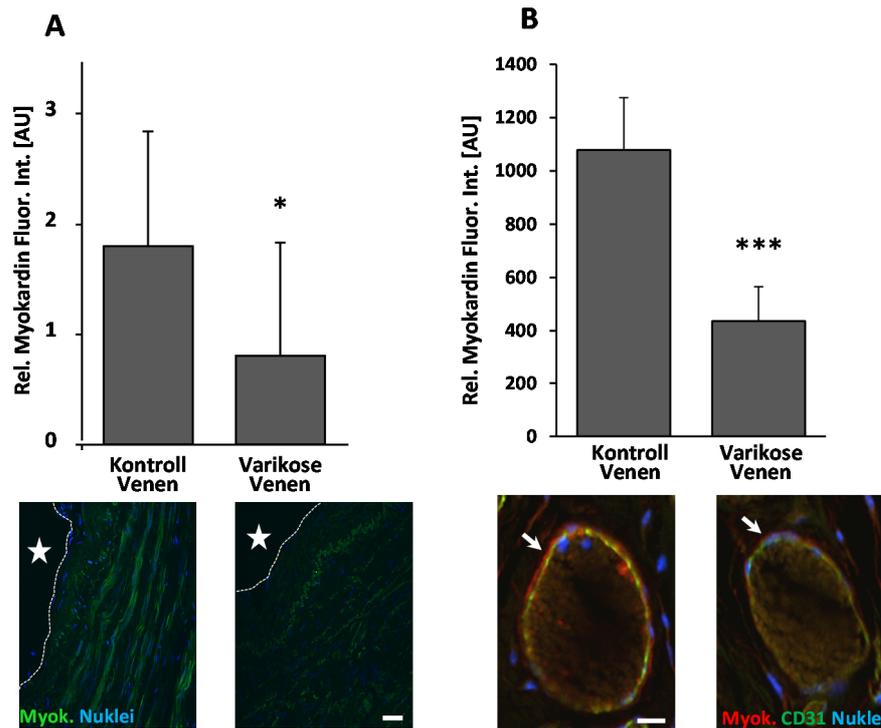


Abbildung 18: Analyse der Myokardinmenge in venösen glatten Muskelzellen humaner Varizen und variköser Venen der Maus

Immunfluoreszenzbasierte Analyse humaner, variköser Venen (A, $*p < 0,05$ Kontrollvene vs. variköse Vene, $n=10$, Maßbalken: $50 \mu\text{m}$, das Gefäßlumen ist markiert durch den Stern). Sieben Tage nach Ligation der Ohrmuschelvene wurden die Mäuse getötet und die Expression von Myokardin in den remodellierenden Venen mittels Immunfluoreszenztechnik analysiert (B, $***p < 0,001$ Kontrollvene vs. Variköse Vene, $n=6$, Maßbalken: $50 \mu\text{m}$).

4.2.4 Die Erhöhung der Wandspannung in perfundierten Gefäßen vermindert die Myokardin-Expression und Proteinsynthese in medialen SMCs

Um zu untersuchen, ob eine Erhöhung der Wandspannung und damit biomechanische Dehnung der SMCs alleine ausreicht, um Myokardin zu reduzieren, wurden isoliert-perfundierte Segmente der murinen Arteria femoralis einem supraphysiologisch erhöhten, longitudinalen Druckgradienten ausgesetzt. Dieses experimentelle System stellt die Druckerhöhung im Bluthochdruck-Tiermodell nach ohne einen Einfluss weiterer humoraler Komponenten miteinzuschließen.

Die Immunfluoreszenzanalyse der Gefäße zeigte eine deutliche Verringerung der Fluoreszenzintensität von Myokardin in der Media (Abbildung 19 G, vgl. E und F). Darüber hinaus war auch die mRNA-Expression von Myokardin signifikant verringert (Abbildung 19 H), sowie die des Myokardin-Zielgens Calponin nach Applikation des erhöhten Druckes (Abbildung 19 I).

Um den Einfluss der Wandspannung auf die Myokardin-Proteinsynthese in der Venenwand zu studieren, wurden isolierte, murine Vena facialis einem erhöhten intravasalen Druck ausgesetzt.

Unter dem Einfluss einer erhöhten transmuralen Druckdifferenz von 16 anstatt 4 mmHg kommt es ebenfalls nach fluoreszenztechnischer Analyse zu einer Verringerung der Fluoreszenzintensität und Proteinsynthese von Myokardin in den venösen SMCs (Abbildung 20 A, vgl. B und C).

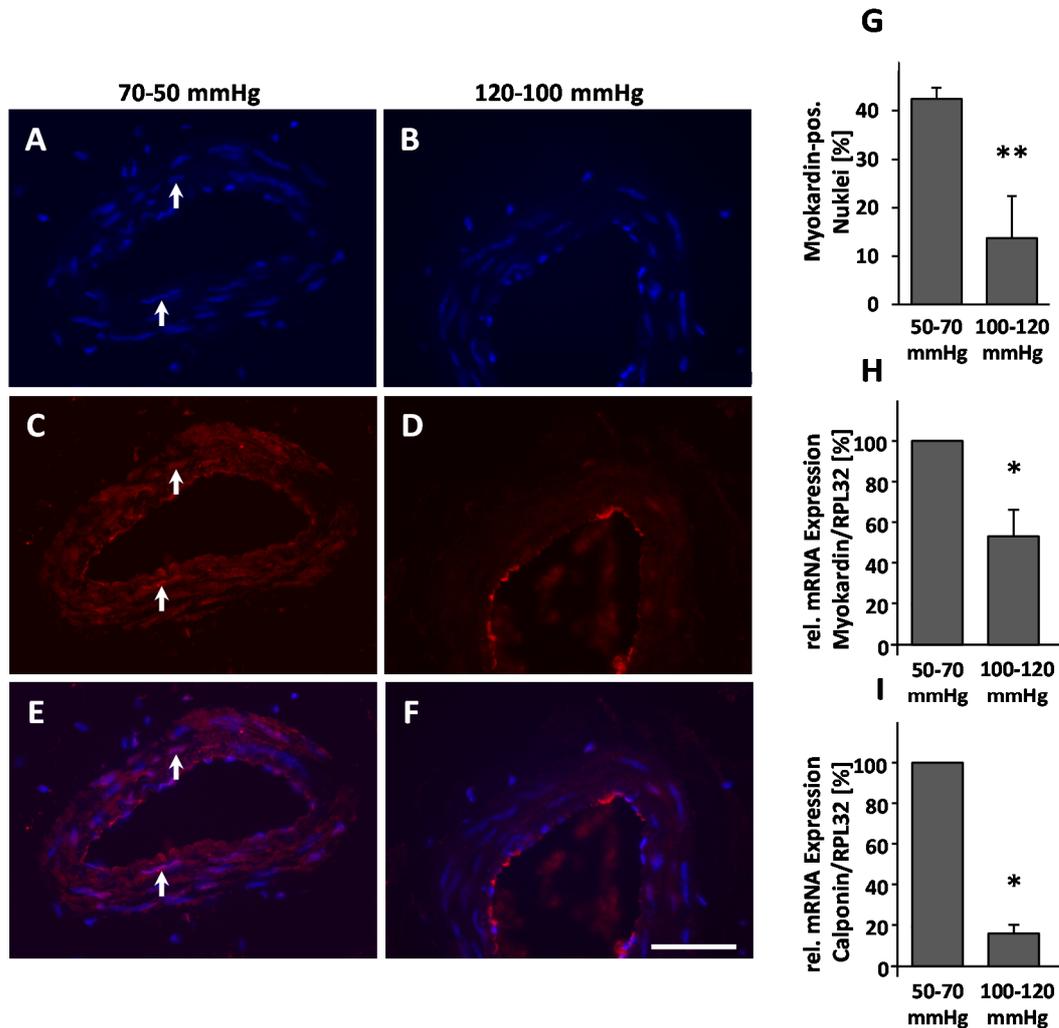


Abbildung 19: Analyse der Myokardin-spezifischen mRNA-Expression und Proteinsynthese in isoliert perfundierten Arteriensegmenten

Um die Erhöhung der Wandspannung im Gefäß nachzustellen, wurden murine Femoralarterien für 6 h mit einem normotensiven longitudinalen Druckgradienten von 70-50 mmHg (A-E) bzw. einem hypertensiven Druckgradienten von 120-100 mmHg (B-F, Maßbalken: 50 µm) perfundiert. Dies entspricht einer transmuralen Druckdifferenz von 60 mmHg bzw. 110 mmHg bei gleichbleibendem Fluss bzw. Schubspannung. Neben dem prozentualen Anteil Myokardin-positiver Nuklei in der Media perfundierter Gefäße (G, $**p < 0,01$ 50-70 mmHg vs. 120-100 mmHg, $n=5-6$) wurde die ebenso die mRNA-Expression von Myokardin und Calponin bestimmt und gegen RPL32 (*housekeeping gene*) abgeglichen (H, $*p < 0,05$ 50-70 mmHg vs. 120-100 mmHg, $n=5$) und (I, $*p < 0,05$ 50-70 mmHg vs. 120-100 mmHg, $n=5$).

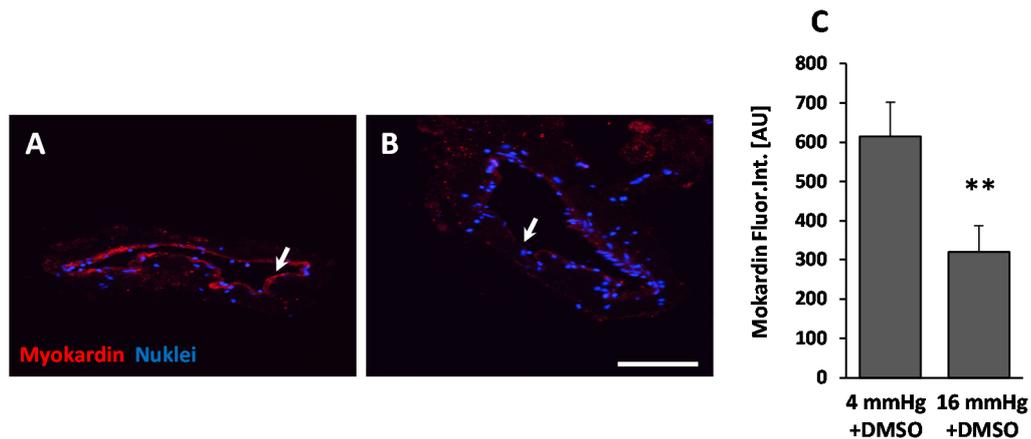


Abbildung 20: Analyse der Myokardin-Expression in der murinen Vena facialis nach erhöhtem Druck

Nach 16 h der Applikation einer erhöhten intravasalen Druckdifferenz von 16 mmHg im Vergleich zu 4 mmHg auf murine Vena facialis (A-B) wurden die Proteinmenge von Myokardin durch die Messung der Grauintensität analysiert (K, ** $p < 0,01$ 4 mmHg vs. 16 mmHg, $n=6$, Maßbalken= 50 μm).

4.3 Lokalisation von Myokardin in kultivierten SMCs

Die bereits vorgestellten Daten zeigen eine Reduktion von Myokardin in der Media biomechanisch gestresster Gefäße. Basierend auf diesen Ergebnissen, wurde die Wirkung zyklischer Dehnung auf die Lokalisation und die Dynamik des nukleären Exportes von Myokardin im Detail untersucht. Darüber hinaus wurden weitere Stimuli zur Initiation und Stimulation des Myokardinabbaus studiert. Die vaskulären Remodellierungsprozesse schließen eine Adaptation der ECM mit ein, wobei noch weitgehend unbekannt ist, ob die Modulation der ECM von den SMCs ausgeht oder diese deren Phänotyp beeinträchtigt. Die arterielle Steifigkeit ist definiert durch eine Balance zwischen dem arteriellen Tonus und der Zusammensetzung der ECM (Gaballa, Jacob et al. 1998). Somit hat indirekt die Beschaffenheit der ECM wiederum einen maßgeblichen Einfluss auf den arteriellen Tonus. Darüber hinaus wird dieser zudem stark durch Vasokonstriktion und Vasodilatation der Gefäße beeinflusst. Die Fähigkeit der Gefäße auf Änderungen des Blutfluss oder -drucks zu reagieren bzw. diesen zu regulieren, hängt daher unter anderem von der Steifigkeit der ECM und der Kontraktilität der SMCs ab. Im Umkehrschluss ist es wahrscheinlich, dass die Motilität und Differenzierung der SMCs auch von der ECM abhängt (Peyton and Putnam 2005).

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen unterschiedlicher *in vitro*-Kulturen, dass Myokardin sowohl in venösen als auch in arteriellen humanen SMCs unter zyklischer Dehnung reduziert war. Die Überexpression von exogenem, GFP-markiertem Myokardin in HuSMCs bestätigte die Reduktion des endogenen Myokardins nach erhöhter Wandspannung, da die biomechanische Dehnung den Abbau des exogenen Myokardin-GFP-Konstruktes ebenfalls induzierte. Vaskuläre Reorganisation

involviert nicht nur durch die ECs oder SMCs der Gefäßwand, sondern auch die umgebende ECM. Zum Studium des Einflusses der Kompaktheit bzw. Rigidität der ECM auf Myokardin, wurden HuASMCs auf Hydrogelen einer definierten Steifigkeit kultiviert. Die Analyse von HuASMCs auf der weicheren Matrix zeigte weniger Myokardin-positiven Nuklei im Vergleich zu SMCs, die auf einem Hydrogel mit einer höheren Steifigkeit kultiviert wurden.

4.3.1 Die Verminderung der Matrixsteifigkeit führt zum nukleären Export von Myokardin

Um überprüfen welchen Einfluss die umgebende Matrixsteifigkeit auf Myokardin und dessen Lokalisation hat, wurden HuASMCs auf Hydrogelen mit einer definierten Rigidität kultiviert. Die Hydrogele bestanden aus Polyethylenglycol und wurden zuvor mit der Fibronectinpeptidsequenz RGD beschichtet, um die Adhärenz der SMCs zu gewährleisten (Peyton, Raub et al. 2006). Die Steifigkeit der Gele wurde vor ihrer Nutzung durch die Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy* (AFM)) kontrolliert. Dieser Grad der Steifigkeit der Gele wird über den *Young's elastic modulus* und in kPa angegeben. Die steiferen Gele haben eine Festigkeit von ca. 30 kPa, wobei die weicheren Gele bei 3 kPa liegen. Zum Vergleich: Eine übliche Zellkulturschale hat eine Steifigkeit von ca. 60 kPa.

Basierend auf der Tatsache, dass Myokardin nur im Kern seine primäre Aktivität entfalten kann, wurde zunächst die Anzahl der Myokardin-positiven Nuklei bestimmt. Unter dem Einfluss einer weicheren Adhäsionsbasis vermindert sich die Anzahl Myokardin-positiver Kerne (Abbildung 21 E, vgl. B und D) im Vergleich zum etwas steiferen Hydrogel.

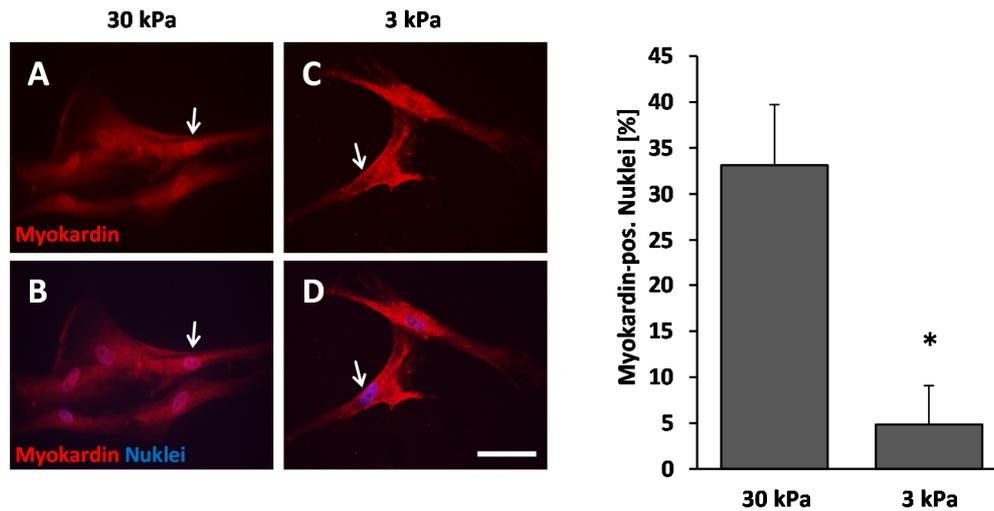


Abbildung 21: Analyse der Lokalisation von Myokardin auf Matrices unterschiedlicher Steifigkeit

HuASMCs wurden für 24 h auf Hydrogelen einer definierten Steifigkeit kultiviert (vgl. A und B mit C und D). Im Anschluss wurde der prozentuale Anteil Myokardin-positiver Nuklei analysiert (vgl. B und D, hervorgehoben durch Pfeile) und rechts graphisch dargestellt (n=4, *p<0,05 30 kPa vs. 0,3 kPa, Maßbalken: 100 μ m).

4.3.2 Zyklische Dehnung induziert den Export von Myokardin aus dem Nukleus

Die zuvor beschriebenen *in vivo* Modelle sowie die *ex vivo* Gefäßperfusion zeigten eine direkte inverse Korrelation zwischen erhöhter Wandspannung und der Myokardin-Expression in SMCs. Um diese Daten *in vitro* zu überprüfen, wurden HuASMCs auf Elastomeren kultiviert, auf die mit Hilfe einer Vakuumpumpe ein definierter Zug appliziert wurde. Durch die kontrollierte Deformation der Elastomere werden die darauf befindlichen Zellen bidirektional und zyklisch gedehnt. Diese Dehnung simuliert insofern eine Komponente einer gesteigerten Wandspannung *in vivo*. Alle in Folge beschriebenen Experimente wurden mit diesem System durchgeführt.

Nach 24 h zyklischer Dehnung von HuASMCs zeigte sich in der Immunfluoreszenz-basierten Analyse eine eindeutige Translokation von Myokardin aus dem Nukleus ins Zytoplasma (Abbildung 22). Diese Ergebnisse konnten mit einer reinen Kultur venöser humaner SMCs aus der Nabelschnur bestätigt werden. Demnach sinkt der Anteil Myokardin-positiver Nuklei von ca. 90 % auf 20 % nach zyklischer Dehnung.

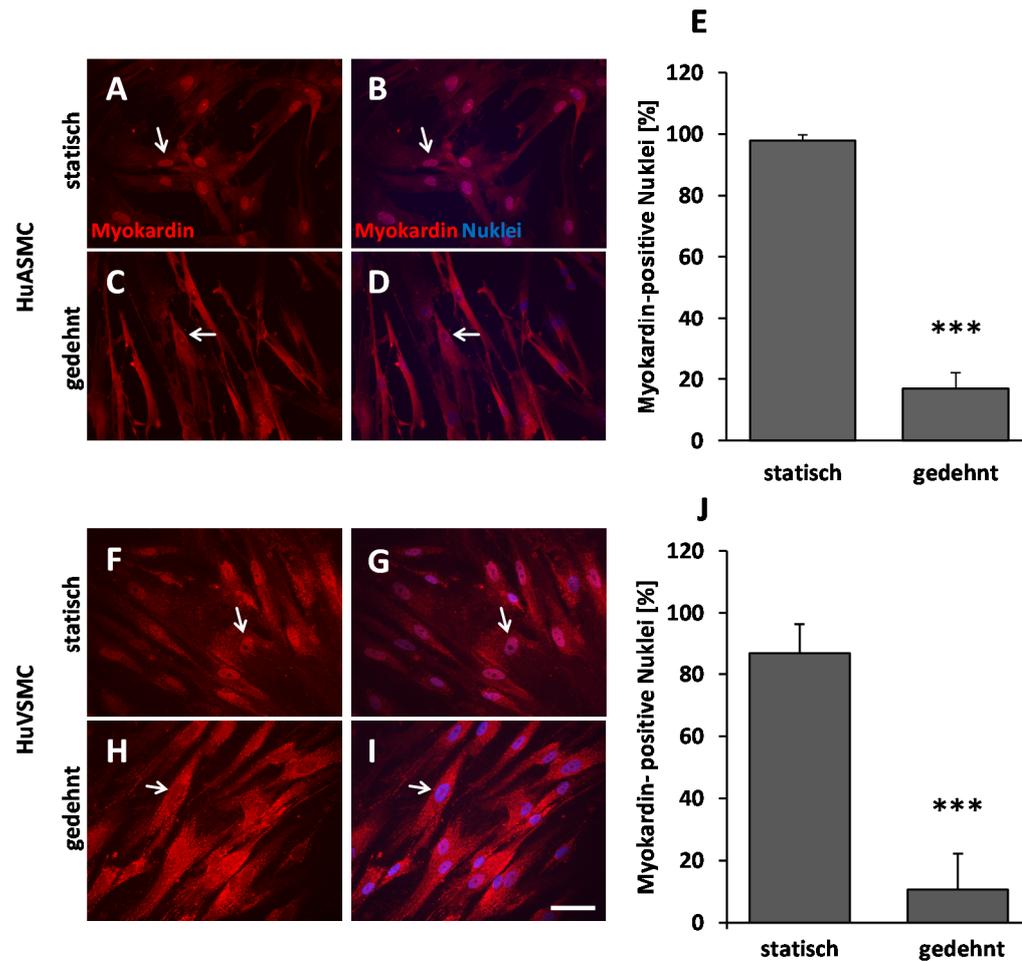


Abbildung 22: Myokardin-Expression in Abhängigkeit biomechanischer Dehnung in humanen, vaskulären SMCs

Sowohl in HuASMCs (A-D) als auch in HuVSMCs (F-I, Maßbalken: 50 μ m) wurde die Lokalisation von Myokardin unter statischen Bedingungen (C+D sowie H+I) als auch nach zyklischer Dehnung (24 h, 13 %) analysiert, wobei hierzu der prozentuale Anteil Myokardin-positiver Nuklei bestimmt wurde. Diese wurden durch Pfeile hervorgehoben. Rechts im Bild ist die graphische Darstellung der statistischen Auswertung gedehnter HuASMCs (E, *** p <0,001 statisch vs. gedehnt) und HuVSMCs (J, *** p <0,001 statisch vs. gedehnt) aufgezeigt.

4.3.3 Verifizierung der dehnungsabhängigen Translokation des GFP-markierten Myokardin-Konstruktes

Die bisherigen *in vivo* und *in vitro* Daten deuten auf eine direkte Beeinflussung der Lokalisation von Myokardin durch zyklische Dehnung hin. Um diese Theorie anhand einer weiteren Herangehensweise zu überprüfen, wurde die DNA-Sequenz für das grün fluoreszierende Protein (GFP) an das N-terminalen Ende mit der DNA-Sequenz humanen Myokardins ligiert und in den Vektor kloniert. Dieses Konstrukt wurde anschließend in HuASMCs transfiziert und die Zellen für 24 h gedehnt. Die Analyse der gedehnten und statisch kultivierten HuASMCs zeigt eine signifikante Translokation des exogenen Myokardins (Abbildung 23 D) anhand der grünen Fluoreszenz aus dem Nukleus nach zyklischer Dehnung (Abbildung 23 C). Unter statischen Bedingungen ist das GFP-fusionierte Myokardin im Kern lokalisiert, was durch die grüne Fluoreszenz nachweisbar ist

(Abbildung 23 D). Nach dem Einfluss von Dehnung ist der Kern negativ für GFP, was darauf hindeutet, dass Myokardin nicht mehr im Kern lokalisiert ist.

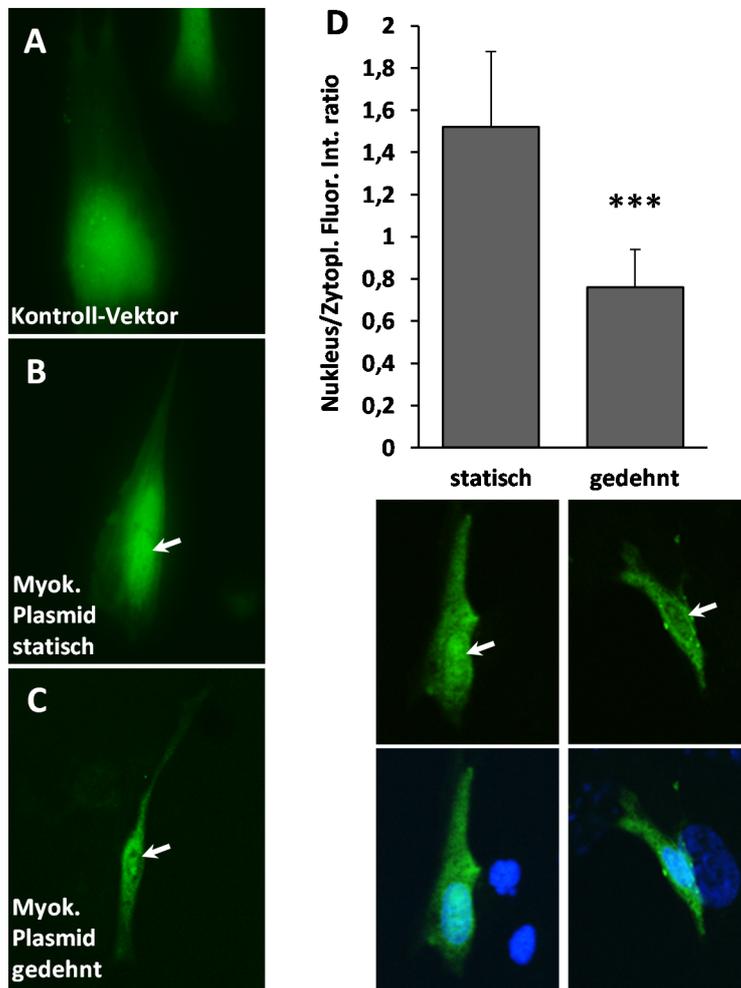


Abbildung 23: Validierung der Myokardin-Translokation nach biomechanischer Dehnung mithilfe eines GFP-getagten Proteins

HuASMCs wurden mit einem Vektor transfiziert, das die Sequenz des humanen Myokardins (GFP-tag) enthält. Nach der Transfektion wurden die Zellen (für 24 h bei 13 %) gedehnt und anschließend hinsichtlich der Lokalisation von Myokardin bzw. der grünen Fluoreszenz analysiert. Links im Bild ist der Kontrollvektor ohne Myokardin-Sequenz (A), die statische Kontrolle (B) und eine Zelle nach Transfektion mit dem GFP-Myokardin-Vektor nach Dehnung (C). Jede analysierte Zelle wurde hinsichtlich des Verhältnis der Fluoreszenzintensität zwischen Nukleus und Zytoplasma durch die Messung der Grauintensitäten ausgewertet und dargestellt (D, *** $p < 0,001$ statisch vs. gedehnt). Die Daten zeigen ein von zwei repräsentativen Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen, wobei acht MOVs ausgewertet wurden.

4.4 Charakterisierung des Einflusses zyklischer Dehnung auf die Myokardin-Aktivität

Im Folgenden wurde der Einfluss der zyklischen Dehnung auf die Lokalisation, die mRNA-Expression sowie Proteinmenge als auch die Funktionalität von Myokardin in HuASMCs analysiert. Die Charakterisierung der notwendigen Dehnungsintensität bzw. –Elongation zeigte eine signifikante Myokardin-Translokation ab einem Schwellenwert von 10 %. Bei einer Dehnungsintensität von 13 % ist die Translokation von Myokardin aus dem Nukleus eindeutig nachweisbar (Abbildung 24), daher wurde für alle weiteren Experimente diese Elongation verwendet.

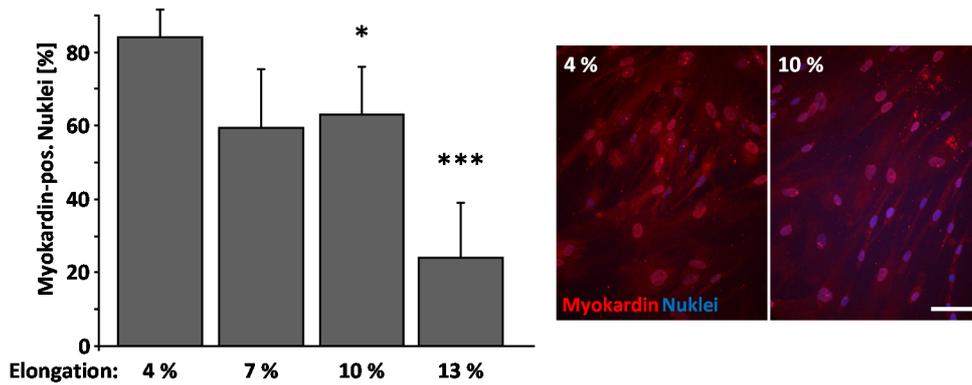


Abbildung 24: Myokardin-Translokation in Abhängigkeit von der Dehnungsintensität

HuASMCs wurden für 24 h gedehnt, wobei sie jeweils einer anderen Dehnungsintensität ausgesetzt wurden. Anschließend wurde die Anzahl der Myokardin-positiven Nuklei ausgewertet (* $p < 0,05$ 4 % vs. 10 % bzw. *** $p < 0,001$ 4 % vs. 13 %, $n=3$).

Die Analyse der Myokardin-spezifischen mRNA-Expression bei konstanter Elongation (13 %) zeigte, dass Myokardin erst nach 24 h signifikant reduziert war (Abbildung 25 A). Auf Proteinebene ist eine dehnungsinduzierte Reduktion von Myokardin durch SDS-PAGE und Western Blot nach 48 h Dehnung (Abbildung 25 B) nachweisbar.

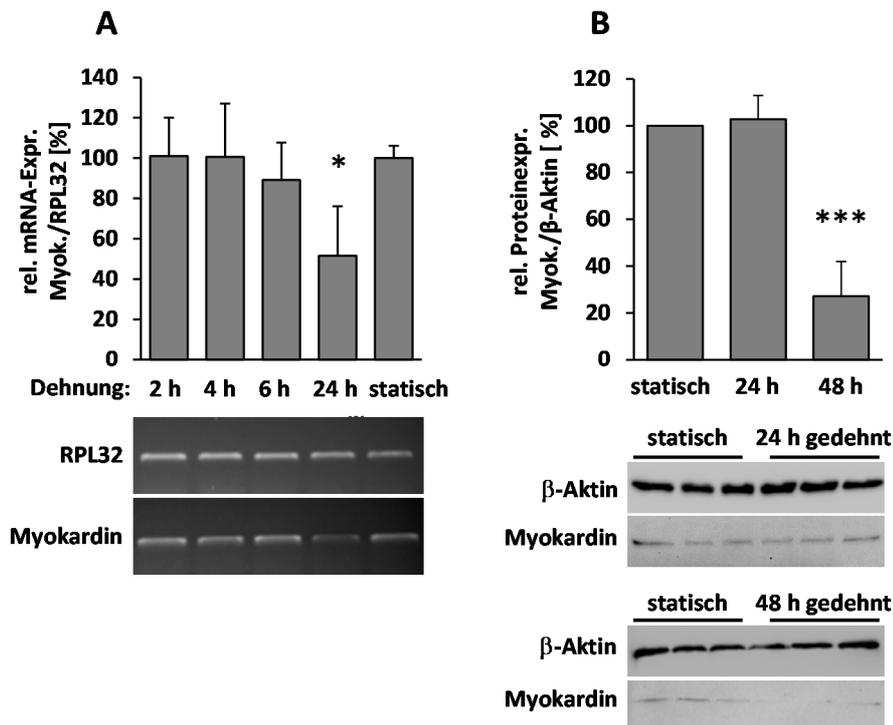


Abbildung 25: Einfluss der Dehnungsdauer auf die mRNA- und Proteinsynthese von Myokardin in HuASMCs

Die Dynamik der Reduktion der mRNA-Expression von Myokardin nach Dehnung wurde mithilfe PCR analysiert und mit RPL32 (*housekeeping gene*) abgeglichen (A, * $p < 0,05$ statisch vs. 24 h gedehnt, $n=3$, 13 % Dehnungsintensität). Die Proteinmenge wurde nach 24 h sowie nach 48 h durch SDS-PAGE und Western Blot untersucht und mit β -Aktin abgeglichen (B, *** $p < 0,001$ statisch vs. 48 h gedehnt, $n=3$). In beiden Graphen wurden die Messwerte jeweils gegen die statische Kontrolle normalisiert und daher in % angegeben.

Die zyklische Dehnung initiierte auch eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression für Myokardin (Abbildung 26 A). Zudem ist die mRNA-Expression der Myokardin-Zielgene, Calponin und SM-MHC, ebenfalls reduziert. Die Korrelationsanalyse zeigte einen direkten Zusammenhang zwischen dem Verlust der mRNA-Expression von Myokardin und Calponin (Abbildung 26 B, $p < 0,001$) bzw. Myokardin und SM-MHC (Abbildung 26 C, $p < 0,05$).

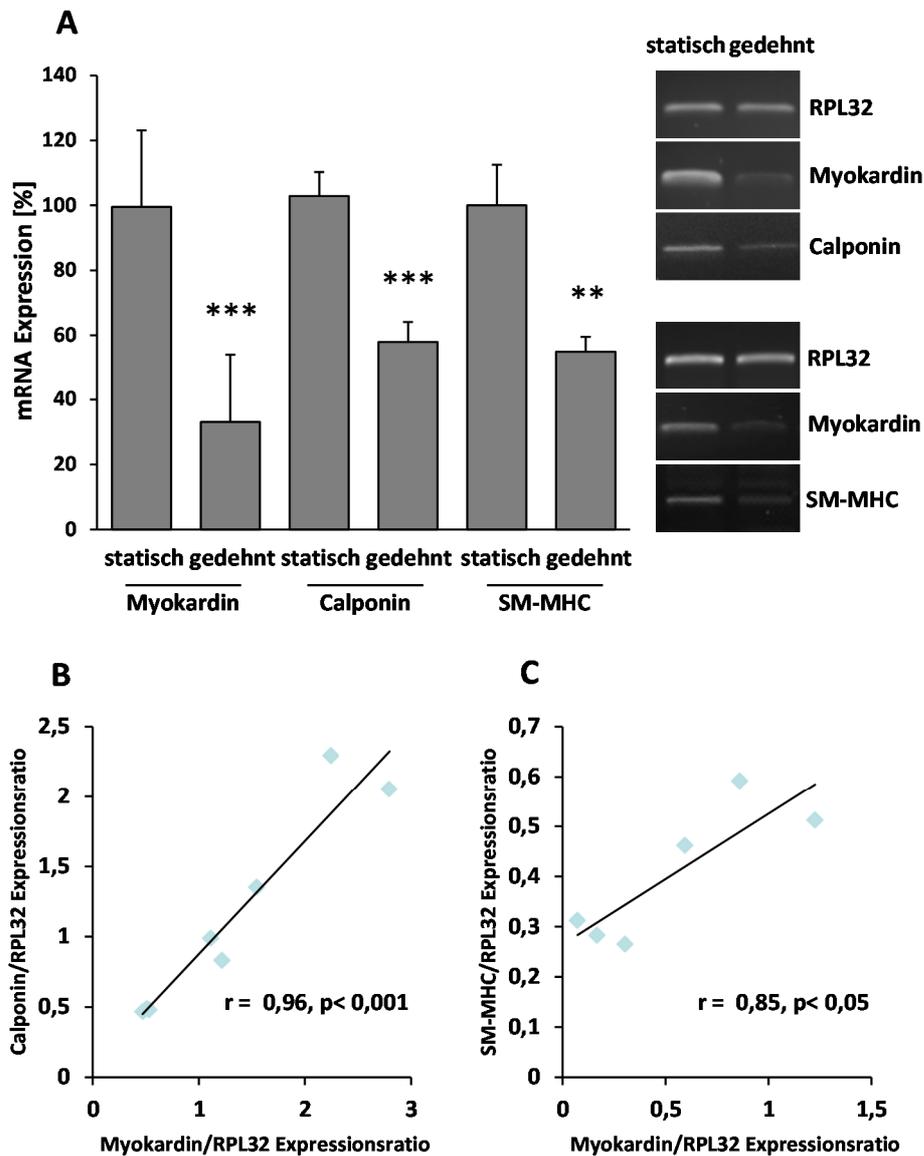


Abbildung 26: Der Einfluss erhöhter Wandspannung auf die mRNA-Expression von Calponin und SMC-MHC in Relation zu Myokardin

Nach Dehnung werden neben Myokardin auch dessen Zielgene Calponin und SM-MHC reguliert. Dies wurde mittels PCR (A) untersucht und mit RPL32 (*housekeeping gene*) normalisiert (A, $**p < 0,01$ statisch vs. gedehnt, $***p < 0,001$ statisch vs. gedehnt, $n = 3-8$). Über den Pearson Korrelationskoeffizienten (r) wurden das direkte proportionale Verhältnis der mRNA-Expression von Myokardin und Calponin (B, $p < 0,001$, $r = 0,96$) bzw. SM-MHC (C, $p < 0,05$, $r = 0,85$) überprüft.

4.5 miR143/145 nach erhöhter Wandspannung

Einige Studien belegen, dass das miRNA-Cluster miR143/145 eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung vaskulärer oder kardialer Myozyten sowie für die Remodellierung adulter vaskulärer SMCs spielt (Cordes, Sheehy et al. 2009, Xin, Small et al. 2009). Die Sequenzen der miR143 und miR145 liegen als Cluster hintereinander und werden daher durch einen gemeinsamen Promoter gesteuert und in einem ähnlichen Muster exprimiert. Der Verlust des Clusters führt zu einer verminderten K⁺- oder Angiotensin II-abhängigen Gefäßkontraktilität (Boettger, Beetz et al. 2009). Böttger *et al.* zeigten weiterhin eine verminderte Anzahl kontraktiler, ruhender SMCs im Vergleich zu einer erhöhten Anzahl synthetischer, aktivierter SMCs in miRNA143/145-Knockout Tieren. Interessanterweise sind die Expressionsmuster von Myokardin und das von miR143/145 sehr ähnlich, wobei dieses auf die SMCs des Gefäßsystems, des Herzens sowie auch des Magen-Darmbereiches beschränkt ist. Um zu überprüfen, ob das Cluster auch mechanosensitiv ist oder gar die Reduktion von Myokardin reguliert, wurde die Expression von miR143/145 in HuASMCs sowie murinen Mesenterialarterien nach Perfusion mit erhöhtem, intravasalem Druck analysiert.

Das muskelzellspezifische Cluster miR143/145 ist durch erhöhte Wandspannung nicht modifiziert. Dies wurde zum einen *in vitro* nach zyklischer Dehnung gezeigt, sowie auch durch die Druckperfusion muriner Gefäße bestätigt. Der Knockdown von Myokardin führt unter statischer Kultivierung zu einer Reduktion von miRNA 145 in HuASMCs, nicht aber von miRNA 143.

4.5.1 Kein Effekt erhöhter Wandspannung auf die Expression von miR143 oder miR145

Um die Dehnungssensitivität der Expression des miRNA-Clusters miR143/145 von zyklischer Dehnung *in vitro* zu überprüfen, wurden gedehnte und ungedehnte HuASMCs hinsichtlich des Expressionsniveaus von miR143 und miR145 untersucht. Da die Dynamik einer eventuellen Regulation der microRNAs nicht bekannt ist, wurden die HuASMCs über einen Zeitverlauf von 0-24 h hinweg gedehnt, wobei unterschiedliche Zeitpunkte analysiert wurden. Zyklische Dehnung zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der miR143 (Abbildung 27 C) und der miR145 (Abbildung 27 D) in HuASMCs.

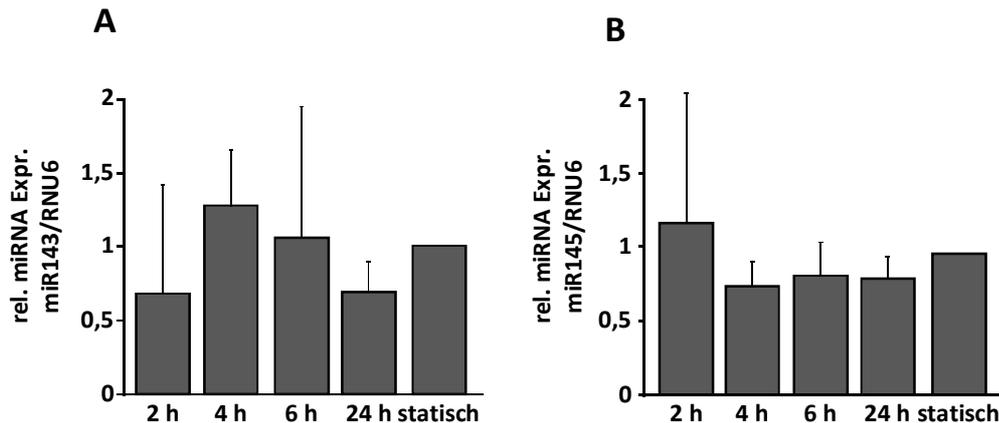


Abbildung 27: *miR143- und miR145-Expression nach zyklischer Dehnung in HuASMC*

Zur Analyse des miRNA-Clusters miR143/145 unter der Einwirkung erhöhter Wandspannung, wurden HuASMCs nach zyklischer Dehnung (13 %) hinsichtlich der Expression von miR143 (A, ns $p > 0,05$, $n = 5$) und miR145 (B, ns $p > 0,05$, $n = 5$) mittels RT-PCR untersucht und mit der unregulierten miRNA RNU6 normalisiert.

Um den Einfluss erhöhter Wandspannung auf die Expression der miR143 bzw. miR145 in einem physiologischen Kontext zu analysieren, wurden murine Gefäße hinsichtlich nach Druckperfusion studiert. Mesenterialarterien von C57BL/6 Mäusen wurden für 6 h bei einem normotensiven Druck von 80 mmHg Einstromdruck und 110 mmHg Ausstromdruck im Vergleich zu einem hypertensiven Druck von 120 mmHg zu 150 mmHg perfundiert. Die transmurale Druckdifferenz lag bei 95 mmHg bzw. 130 mmHg, wobei der Fluss und die Schubspannung gleich waren. Anschließend wurden die miRNA aus dem Gewebe isoliert, aufgereinigt und mit Hilfe der RT-PCR untersucht. Die Erhöhung des Drucks hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der miR143/145 in den Gefäßwandzellen (Abbildung 28).

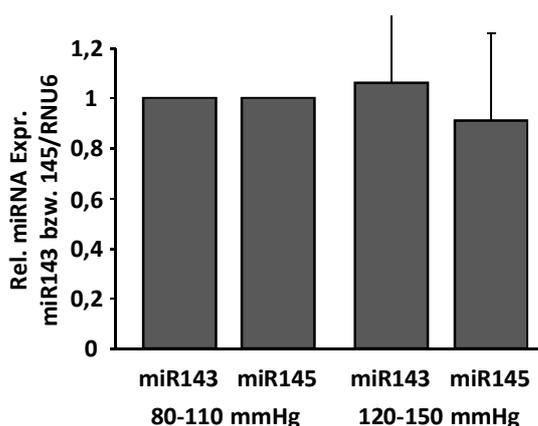


Abbildung 28: *Analyse der Expression von miR143 und miR145 in murinen Mesenterialarterien nach Druckperfusion*

Segmente muriner Mesenterialarterien wurden für 6 h einer erhöhten transmuralen Druckdifferenz von 120-150 mmHg im Vergleich zum Kontrolldruck von 80-110 mmHg exponiert. Anschließend wurden die Gefäße hinsichtlich der Expression von miR143 bzw. miR145 mittels RT-PCR analysiert und mit der unregulierten miRNA RNU6 normalisiert (ns $p > 0,05$ 80-110 mmHg vs. 120-150 mmHg, $n = 4$).

4.5.2 Der Knockdown von Myokardin vermindert die Expression von miR145, nicht aber von miR143

Um eine Abhängigkeit der miRNA-Expression von Myokardin zu überprüfen, wurde in HuASMCs (für 48 h) durch einen siRNA-basierten Ansatz die mRNA von Myokardin inhibiert. Nach dieser Zeit

wurde die Expression von miR143 und miR145 per RT-PCR analysiert. Hierbei zeigte sich, dass der Verlust von Myokardin zu einer signifikanten Reduktion der miR145 *in vitro* führt. Interessanterweise blieb jedoch die Expression der miR143 unbeeinflusst (Abbildung 29).

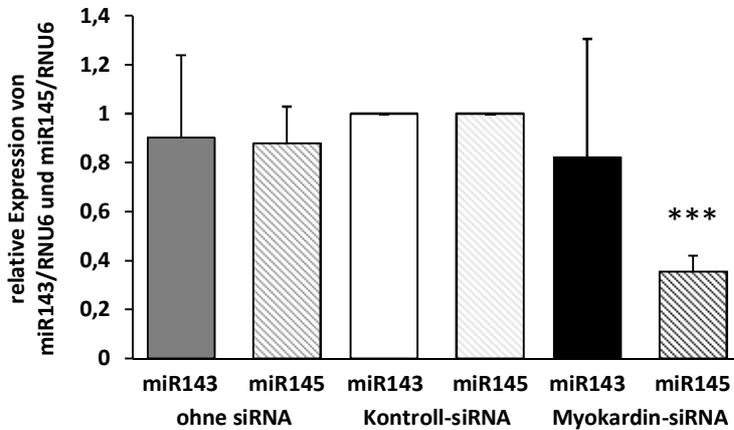


Abbildung 29: Expression des miRNA-Clusters miR143/145 in Myokardin-deplierten HuASMCs

Der Effekt des Myokardin-Knockdowns auf die Expression des miRNA-Clusters wurde mithilfe von RT-PCR und der Normalisierung mit RNU6 analysiert (miRNA 143: ns $p > 0,05$ Kontroll-siRNA vs. Myok.-siRNA; miR145: *** $p < 0,001$ Kontroll-siRNA vs. Myok.-siRNA n=5)

4.6 Aktivierung von ERK1/2 nach zyklischer Dehnung

Eine Reihe unterschiedlicher Zelloberflächenmoleküle werden durch mechanische Dehnung aktiviert, die daraufhin intrazelluläre Signalmoleküle aktivieren bzw. deaktivieren. Ein solches Signalmolekül ist die MAP-Kinase ERK1/2, die durch Phosphorylierung beispielsweise Transkriptionsfaktoren im Nukleus reguliert und somit in die Zellantwort auf einen extrazellulären Stimulus involviert ist. Ein Beispiel für diesen Mechanismus ist die Phosphorylierung des SRF-Assoziationsfaktors Elk1 im Zytosol, das den Import in den Nukleus bedingt (Yoshida, Gan et al. 2008). In phosphoryliertem Zustand bindet Elk1 an SRF und initiiert die Transkription spezifischer Gene.

Um die Rolle von ERK1/2 bei der dehnungsinduzierten Translokation von Myokardin zu untersuchen, wurden HuASMCs zyklisch gedehnt unter gleichzeitiger Inhibition der ERK1/2 Aktivität. Hierzu wurde der MEK1/2 Inhibitor PD98059 eingesetzt, der durch diese Blockade die Phosphorylierung von ERK1/2 verhindert und somit dessen Aktivität hemmt. Taurin *et al.* identifizierten *in vitro* vier Aminosäurereste in der Proteinsequenz von Myokardin, die durch ERK1/2 phosphoryliert werden können (Taurin, Sandbo et al. 2009). Zur Überprüfung einer mechanosensitiven Aktivierung von ERK1/2 und einer darauf folgenden nukleären Phosphorylierung von Myokardin durch ERK1/2, wurden die im Folgenden beschriebenen Experimente im Hinblick auf die Myokardin-Lokalisation durchgeführt.

Hierzu wurde das vorgestellte *in vitro*-Modell von Flexcell® herangezogen. Der dehnungsabhängige Signalweg, der die Translokation von Myokardin kontrolliert, ist bisher noch unbekannt und wurde daher erstmalig in dieser Arbeit untersucht. HuASMCs wurden für 24 h bei 13 % Elongation gedehnt,

um dann folgend mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik die Translokation von Myokardin zu analysieren.

Die vorgestellten Daten deuten auf eine Abhängigkeit der ERK1/2-Aktivität von zyklischer Dehnung in HuASMCs hin. Durch die Inhibition der ERK1/2-Aktivität wird die dehnungsabhängige Translokation von Myokardin aus dem Nukleus verhindert. Die Immunopräzipitation zeigt eine ERK1/2-abhängige Serin-Phosphorylierung von Myokardin durch zyklische Dehnung, welche durch PD98059 verhindert wird. Die Inhibition der Phosphatasen durch Natriumorthovanadat hat eine vermehrte Translokation von Myokardin aus dem Nukleus zur Folge. Die Analyse der Myokardin-Funktionalität durch die Überprüfung der Calponin-spezifischen mRNA-Expression zeigte eine Verhinderung der Reduktion nach zyklischer Dehnung durch PD98059.

4.6.1 Die Inhibition der ERK1/2-Aktivität vermindert die Translokation von Myokardin in HuASMCs nach zyklischer Dehnung

HuASMCs wurden zeitgleich mit der zyklischen Dehnung mit dem Inhibitor der ERK1/2-Aktivität (PD98059) inkubiert. Hierdurch wurde die Zahl der Myokardin-positiver Nuklei nach der Dehnung deutlich erhöht (Abbildung 30 B, vgl. H und I) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abbildung 30 A). Umgekehrt zeigte sich bei der Verwendung von Natriumorthovanadat (Na_3OV_4) – einem Breitbandinhibitor der Phosphatasen – ein deutlich verstärkter Export von Myokardin aus dem Nukleus (Abbildung 30 B, vgl. H und J). Zur Analyse der Wirkung von PD98059 sowie auch von Natriumorthovanadat wurden zum einen die Myokardin-positiv gefärbten Nuklei, als auch Immunfluoreszenzintensität im Zytoplasma gemessen (Abbildung 30 C). Diese Analyse vermittelt eine Aussage über das Verhältnis der nukleären und der zytoplasmatischen Immunfluoreszenz nach Dehnung und Hemmung. Durch die Inhibition der ERK1/2-Aktivität war die zytoplasmatische Fluoreszenzintensität von Myokardin signifikant verringert, wobei die Inhibition der Phosphatasen zu einer Steigerung der Intensität führte (Abbildung 30 D, vgl. H-J).

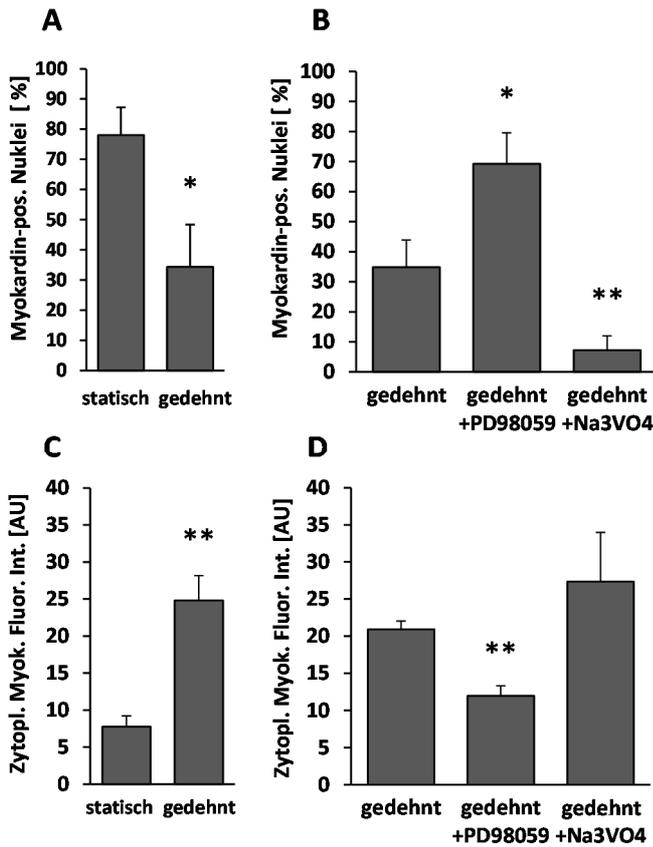
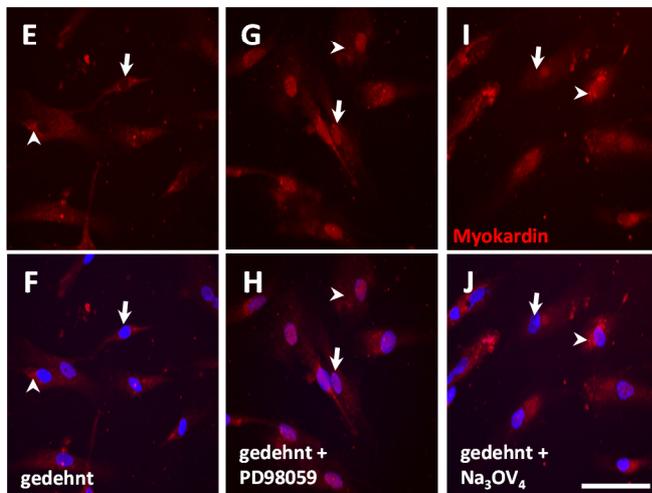


Abbildung 30: Lokalisation von Myokardin in dehnungsstimulierten HuASMCs nach MEK1/2- bzw. Phosphatasen-Inhibition

Um die Abhängigkeit des dehnungsinduzierten nukleären Exportes von Myokardin von ERK1/2 bzw. von Phosphatasen zu untersuchen, wurden HuASMCs während der Dehnung (24 h, 13 %) mit PD98059 (20 μ M, 1 h Vorinkubation) bzw. Na₃VO₄ (20 mM, 1 h Vorinkubation) behandelt. Daraufzufolge wurde der prozentuale Anteil Myokardin-positiver Nuklei bestimmt (A, * $p < 0,05$ statisch vs. gedehnt) bzw. (B, * $p < 0,05$ gedehnt vs. gedehnt + PD98059, ** $p < 0,01$ gedehnt vs. gedehnt + Na₃VO₄, $n = 3$). Darüber hinaus wurde mittels der Analyse der Grauintensitäten die Myokardin-spezifische Immunfluoreszenz im Zytoplasma gemessen Dehnung (C, ** $p < 0,01$ statisch vs. gedehnt) bzw. (** $p < 0,01$ gedehnt vs. gedehnt + PD98059, $n = 3$, vgl. E-F und G-H bzw. D, ns $p > 0,05$ gedehnt vs. gedehnt + Na₃VO₄, vgl. E-F und I-J). Die Pfeile heben die Myokardin-positiven Nuklei hervor, wobei die Pfeilspitzen auf die zytoplasmatische Fluoreszenz hinweisen (vgl. E, G, I bzw. F, H, J, Maßbalken: 100 μ m).



4.6.2 Zyklische Dehnung induziert die Serin-Phosphorylierung von Myokardin in HuASMCs

Da die vorangegangenen Ergebnisse (siehe 4.6.1) eine Abhängigkeit der Myokardin-Translokation von der ERK1/2-Aktivität nahelegen, wurde im nächsten Schritt der Phosphorylierungsstatus von Myokardin analysiert. Mit Hilfe einer Immunopräzipitation wurde der Anteil von Myokardin, welcher an einem Serinrest phosphoryliert wurde, im Vergleich zur Gesamtproteinmenge von Myokardin analysiert (Abbildung 31 A). Unter dem Einfluss der zyklischen Dehnung (24 h) war die Serin-Phosphorylierung von Myokardin signifikant gesteigert (Abbildung 31 B). Dieser Effekt konnte

durch PD98059 vollständig blockiert werden (Abbildung 31 A). Zur Bestimmung der Funktionalität des kernlokalisierten Myokardins nach verminderter ERK1/2 Aktivierung wurde die mRNA-Expression des Myokardin-Zielgens Calponin ausgewertet (Abbildung 31 B). Diese Analyse zeigte eine Aufrechterhaltung der mRNA-Expression von Calponin nach zyklischer Dehnung und simultaner Blockierung der ERK1/2-Aktivität.

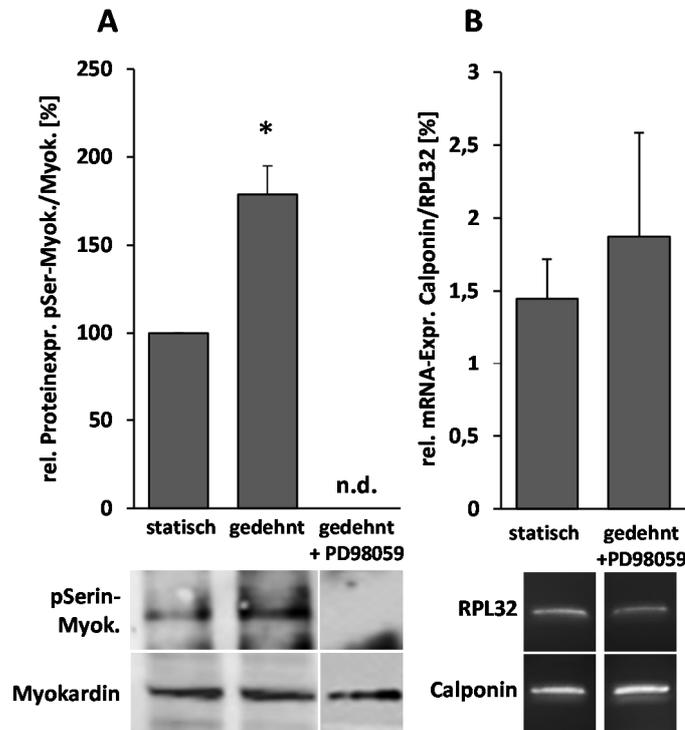


Abbildung 31: Serinphosphorylierung von Myokardin nach erhöhter Wandspannung

Zur Analyse der Phosphorylierung nach zyklischer Dehnung (24 h, 13 %), von Myokardin wurde spezifisch die Serinphosphorylierung von Myokardin - im Vergleich zur Gesamtproteinmenge Myokardins – mittels Immunopräzipitation, SDS-PAGE und Western Blot detektiert (A, * $p < 0,05$ statisch vs. gedehnt, nicht detektierbar (n.d.)), $n=3$). Um die Funktionalität des nukleären Myokardins zu überprüfen, wurde die mRNA-Expression des Zielgens Calponin nach zyklischer Dehnung und zeitgleicher Inhibition mit PD98059 (20 μ M, 1 h Vorinkubation) untersucht (E, ns $p > 0,05$ statisch vs. gedehnt + PD98059, $n=3$).

4.6.3 Zyklische Dehnung steigert die Phosphorylierung von ERK1/2 in HuASMCs

Um einen direkten Zusammenhang zwischen zyklischer Dehnung und der Aktivierung von ERK1/2 zu untersuchen, wurden gedehnte HuASMCs hinsichtlich der Menge von pERK1/2 untersucht. Eine Immunfluoreszenzanalyse zur Detektion ergab, dass nach zyklischer Dehnung die Fluoreszenzintensität von pERK1/2 in HuASMCs (Abbildung 32 E) im Vergleich zur statischen Kontrolle (Abbildung 32, vgl. A und B) deutlich zunahm. Diese signifikante Erhöhung wurde sowohl im Nukleus wie im Zytoplasma nachgewiesen.

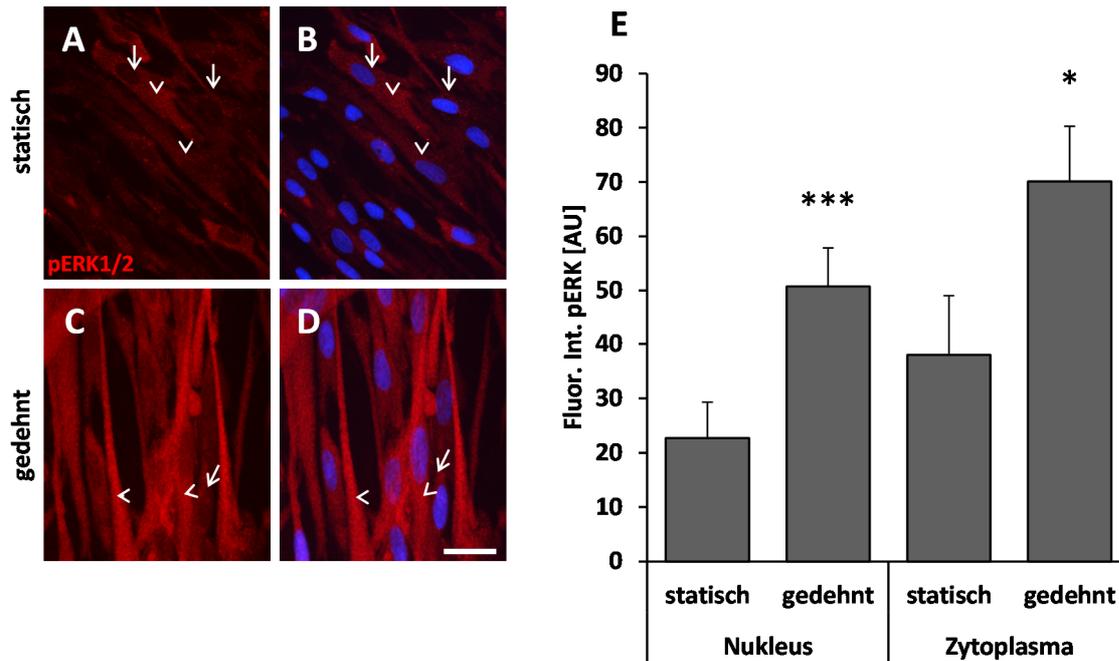


Abbildung 32: Lokalisation und Gehalt von pERK1/2 nach zyklischer Dehnung in HuASMCs

Zur Korrelation der ERK1/2-Aktivität mit dem Einfluss erhöhter Wandspannung, wurden HuASMCs nach zyklischer Dehnung mit hinsichtlich der Präsenz von pERK1/2 untersucht. Diese wurde durch die Messung der Grauintensität der pERK1/2-spezifischen Fluoreszenzfärbung ermittelt. Die statistische Auswertung (E) stellt die zytoplasmatische (E, vgl. A+B und C+D, * $p < 0,05$ statisch vs. gedehnt, $n=3$, hervorgehoben durch Pfeilspitzen) und nukleäre (E, vgl. A+B und C+D, *** $p < 0,001$ statisch vs. gedehnt, $n=3$, hervorgehoben durch Pfeile, Maßbalken: 100 μm) Intensität unter statischen Bedingungen bzw. nach 24 h zyklischer Dehnung gegenüber.

4.7 HDAC/14-3-3-vermittelter Export von Myokardin

Die Klasse II Histon Deacetylasen (HDAC4, 5, 7 und 9) sind gewebespezifisch in Skelett-, Herz- und glatter Muskulatur, dem Immun- sowie dem vaskulären System exprimiert. Klasse II HDAC-defiziente Mäuse zeigen Defekte im kardiovaskulären System, wie beispielsweise der Verlust der Integrität endothelialer Interaktionen und damit die Ruptur der Blutgefäße in HDAC7-defizienten Mäusen (Chang, Young et al. 2006) oder kardiale Defekte in HDAC9-defizienten Mäusen, die jedoch lebensfähig sind (Parra and Verdin 2010, Kim and Bae 2011). HDACs teilen eine gemeinsame Regulator-domäne für die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren, Koaktivatoren oder Korepressoren (Verdin, Dequiedt et al. 2003) und auch eine C-terminale katalytische Domäne (Backs, Worst et al. 2011). Die zelluläre Lokalisation der Klasse II HDACs wird durch eine konservierte Serin-reiche Domäne reguliert. Diese Region ist es auch, die durch Phosphorylierung aktiviert wird und die Bildung des Heterodimers und die Bindung an das Chaperon 14-3-3 initiiert. Durch diese Interaktion ist es möglich mit Hilfe der HDACs nukleären Export von Transkriptionsfaktoren zu steuern. Da HDACs zudem als Bindungspartner von SRF-assoziierten Faktoren beschrieben sind (Paroni, Fontanini

et al. 2007, Paroni, Cernotta et al. 2008), war es naheliegend, den Einfluss auf die dehnungsabhängige Translokation von Myokardin zu untersuchen.

4.7.1 Die Inhibition der HDACs und des Chaperons 14-3-3 verhindert den nukleären Export von Myokardin nach zyklischer Dehnung

Trichostatin-A (TSA) ist ein potenter HDAC-Inhibitor, der bereits im Kontext therapeutischer Ansätze, z. B. gegen die neointimale Hyperplasie, beschrieben wurde (Kee, Kwon et al. 2011). Die Inhibition der HDAC-Funktion durch TSA führte zu einer signifikant erhöhten Anzahl Myokardin-positiver Nuklei in dehnungsstimulierten HuASMCs (Abbildung 33). Die Blockade der 14-3-3-Aktivität durch das antagonistische Peptid R18 (Kaiser and Ottmann 2010) resultierte ebenfalls in einer signifikant vermehrten Anzahl Myokardin-positiver Nuklei im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle.

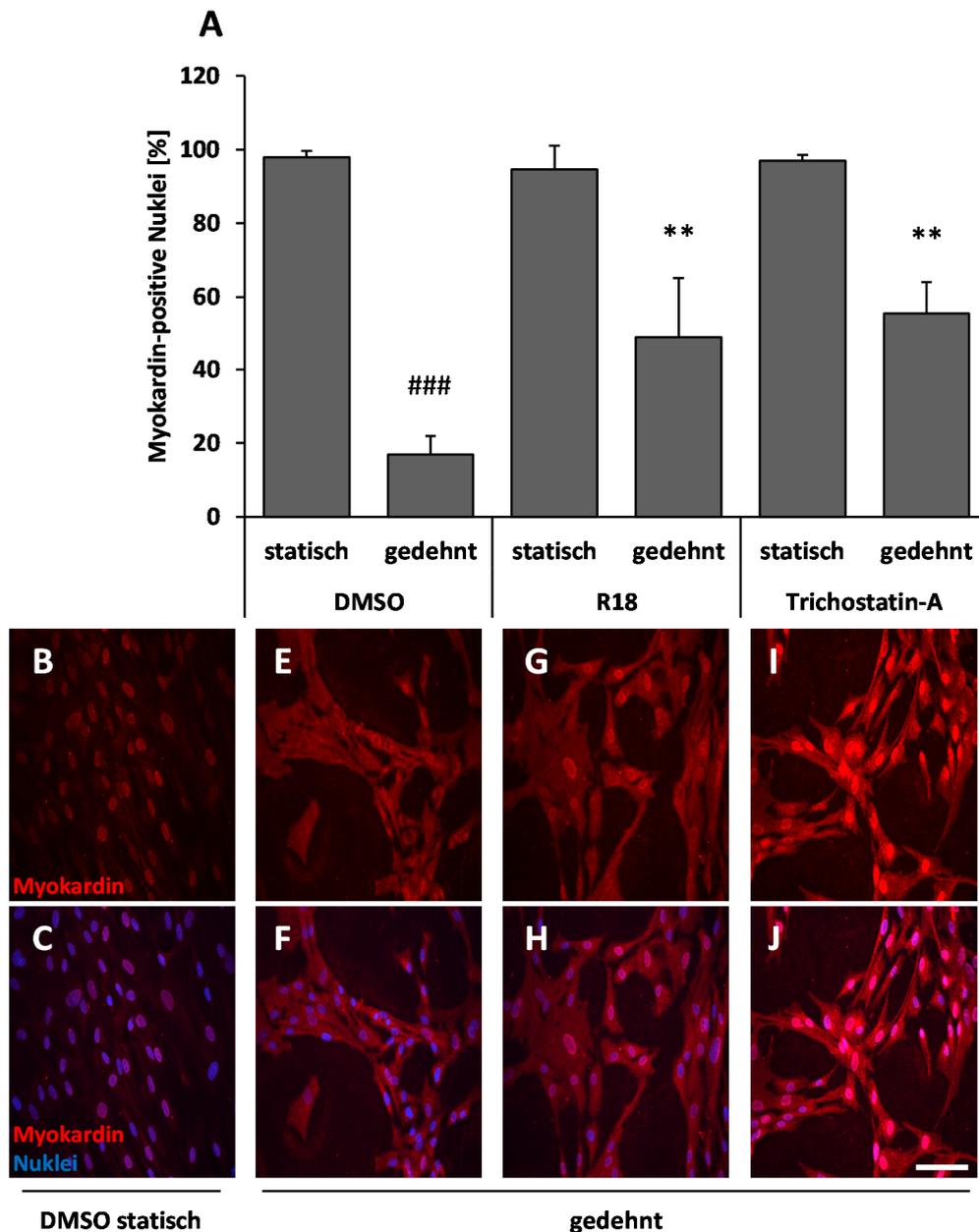


Abbildung 33: Hemmung der HDAC- bzw. 14-3-3-Aktivität hinsichtlich der Lokalisation von Myokardin nach zyklischer Dehnung in HuASMCS

Das Peptid R18 (1 μ M, 1 h Vorinkubation) ist ein synthetischer Inhibitor des kleinen Chaperonproteins 14-3-3 und Trichostatin-A (1 μ M, 1 h Vorinkubation) inhibiert Klasse I und II HDACs. Nach der Dehnung (24 h, 13 %) wurde der prozentuale Anteil der Nuklei ermittelt, die durch Myokardin-spezifischer Immunfluoreszenz gefärbt wurden (A, vgl. B-F und G+H, ### $p < 0,001$ statisch +DMSO vs. gedehnt +DMSO, ** $p < 0,01$ gedehnt +DMSO vs. gedehnt +R18) bzw. (A, vgl. E+F und I+J, ** $p < 0,01$ gedehnt +DMSO vs. gedehnt +TSA, Maßbalken: 100 μ m).

Jedoch war unklar, ob beiden Inhibitoren die Bindung von Myokardin und SRF an der CaRG-Box stabilisieren und damit die Funktionalität von Myokardin erhalten oder ob Myokardin ohne Funktion im Nukleus verbleibt. Daher wurde die mRNA-Expression des Myokardin-Zielgens Calponin nach Dehnung und simultaner Behandlung mit TSA oder R18 getestet, wobei sich zeigte, dass das Expressionsniveau durch TSA oder R18 nach zyklischer Dehnung nicht erhalten blieb.

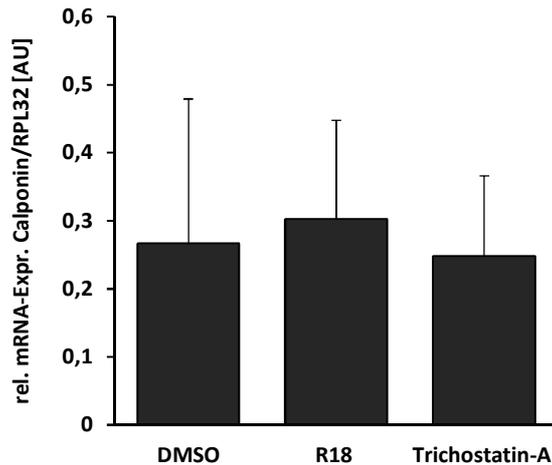


Abbildung 34: *Calponin-mRNA-Expression nach Inhibition des Myokardin-Exports und zyklischer Dehnung*

Zur Analyse der Myokardin-Funktionalität nach Inhibition des Chaperons 14-3-3 oder HDACs (je 1 μ M, 1 h Vorinkubation) wurde die Calponin-spezifische mRNA-Expression mittels PCR analysiert und mittels RPL32 normalisiert. (ns $p > 0,05$ gedehnt +DMSO vs. gedehnt + R18 bzw. gedehnt +TSA, $n=3$).

4.8 Validierung der Rolle von Calcium im Rahmen der dehnungsinduzierten Translokation in HuASMCs

Ein biomechanischer Reiz, wie die Erhöhung der Wandspannung, wird über unterschiedliche Mechanismen von der Zellmembran in das Zellinnere weitergeleitet. Dabei könnte auch ein Einstrom von Calcium aus dem Extrazellulärraum über spannungsabhängige L-Typ Kanäle eine Rolle spielen. Calcium ist ein Faktor, der durch hämodynamische Stimuli induziert wird.

Die KCl-induzierte Depolarisation der glattmuskulären Membran führt zu einer Translokation von Myokardin aus dem Nukleus unter statischer Kultivierung. Allerdings scheint dieser Effekt unabhängig von der Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels zu sein. Weder die Komplexierung der intrazellulären Calciumionen, noch die Inhibition von PLC hat eine Auswirkung auf die Lokalisation der Myokardin-spezifischen Fluoreszenzintensität.

4.8.1 Stimulation mit KCl führt zu einer verringerten Anzahl Myokardin-positiver Nuklei in HuASMCs

Um eine mögliche Korrelation zwischen der intrazellulären Calciumkonzentration und der Lokalisation von Myokardin zu überprüfen, wurden HuASMCs mit KCl stimuliert. Durch KCl kommt es zu einer Membrandepolarisation und durch die Aktivierung der spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanälen zu einem Calciumeinstrom in die Zelle (Kalthof, Bechem et al. 1993, Janssen, Tazzeo et al. 2004). Nach 24 h zeigte die Immunfluoreszenzanalyse einen signifikant verringerten Anteil Myokardin-positiver Nuklei (100 μ M KCl, Abbildung 35, vgl. B und D bzw. 50 μ M KCl vgl. B und F) in KCl-stimulierten HuASMCs im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Darüber hinaus ist eine Akkumulation von Myokardin-spezifischer Fluoreszenzfärbung im Zytoplasma nachweisbar (Abbildung 35, vgl. B, D und F). Mit diesen KCl-Konzentrationen depolarisiert das Membranpotential

auf Werte um -11 mV bzw. -28,5 mV (nach der Nernst-Gleichung), wobei die Aktivierungsschwelle der spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanäle bei -40 mV liegt.

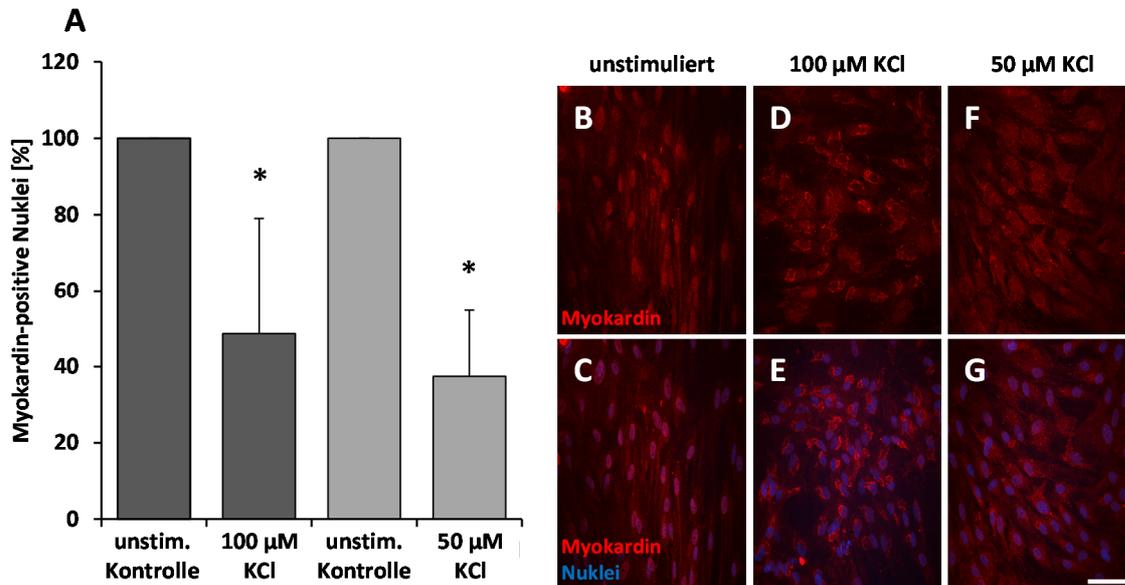


Abbildung 35: Myokardin-Translokation nach Stimulation mit KCl

Die Inkubation von HuASMCs mit KCl hat eine Membrandepolarisation und auch eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration zur Folge. Um einen Einfluss der intrazellulären Calciumkonzentration auf die Lokalisation von Myokardin zu untersuchen, wurden HuASMCs für 24 h mit KCl (100 bzw. 50 μ M) inkubiert. Anschließend wurde mittels Immunfluoreszenz die mögliche Translokation von Myokardin (vgl. D und F, Maßbalken: 100 μ m) untersucht und durch die Auswertung des prozentualen Anteils Myokardin-positiver Nuclei analysiert (A, * $p < 0,05$ unstimulierte Kontrolle vs. 100 μ M KCl, $n = 3$) bzw. (A, * $p < 0,05$ unstimulierte Kontrolle vs. 50 μ M KCl, $n = 3$).

4.8.2 Kein Einfluss auf die Lokalisation von Myokardin durch die Inhibition von TRP-Kanälen *in vitro* und *ex vivo*

Gadolinium ist ein potenter Calciumantagonist bzw. ein Inhibitor der zellulären Calciumaufnahme durch dehnungsabhängige TRP-Kanäle (Bourne and Trifaro 1982, Wolfle, Navarro-Gonzalez et al. 2010). Die Stimulation von HuASMCs durch zyklische Dehnung und Gadolinium zeigte keinen Effekt auf die Lokalisation von Myokardin bzw. es kam nicht zu einer Inhibition des nukleären Exportes nach Dehnung (Abbildung 36, vgl. B und F bzw. D und H). Die Perfusion isolierter Femoralarterien von TRPC3/TRPC6-defizienten Mäusen mit einem supraphysiologisch erhöhten intravasalen Druckgefälle von 150 mmHg zu 120 mmHg zeigte ebenfalls keine Regulation der Myokardin-spezifischen Fluoreszenzintensität durch Gadolinium in der Media (Abbildung 36 B).

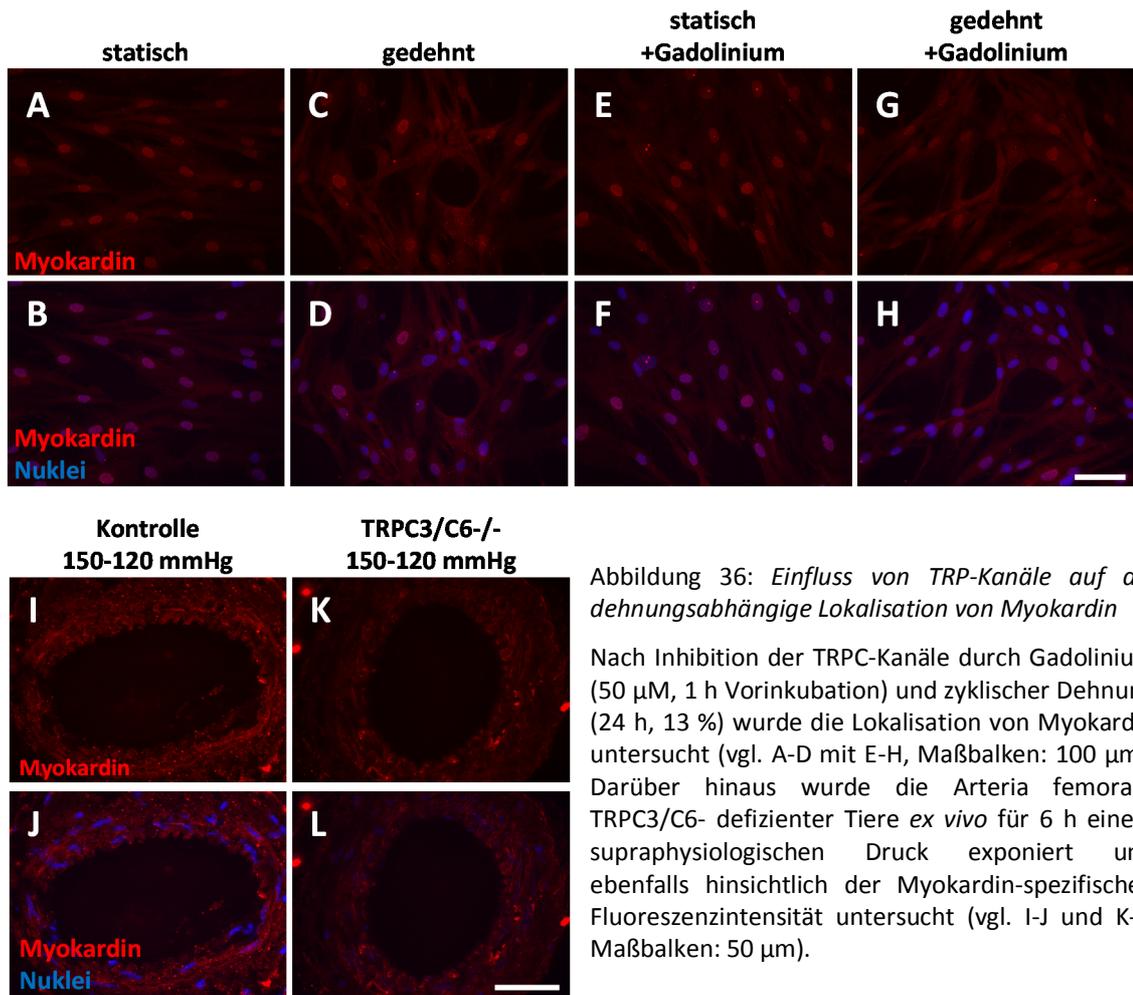


Abbildung 36: Einfluss von TRP-Kanäle auf die dehnungsabhängige Lokalisation von Myokardin

Nach Inhibition der TRPC-Kanäle durch Gadolinium (50 μ M, 1 h Vorinkubation) und zyklischer Dehnung (24 h, 13 %) wurde die Lokalisation von Myokardin untersucht (vgl. A-D mit E-H, Maßbalken: 100 μ m). Darüber hinaus wurde die Arteria femoralis TRPC3/C6-defizienter Tiere *ex vivo* für 6 h einem supraphysiologischen Druck exponiert und ebenfalls hinsichtlich der Myokardin-spezifischen Fluoreszenzintensität untersucht (vgl. I-J und K-L, Maßbalken: 50 μ m).

4.8.3 Keine Beeinflussung der Myokardin-Translokation durch Komplexierung des intrazellulären Calciums nach zyklischer Dehnung von HuASMCs

BAPTA ist ein Calciumionenchelator und verhindert durch die Komplexierung von Calcium dessen intrazelluläre Wirksamkeit. Mit Hilfe der Carboxylsäure BAPTA wurde sowohl bereits vorhandenes und die Ausschüttung von weiterem Calcium aus dem SR während der Dehnung verhindert. Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die dehnungsinduzierte Translokation von Myokardin aus dem Nukleus (Abbildung 37, vgl. A-C), was durch eine fluoreszenztechnische Analyse nachgewiesen wurde.

Im Gegensatz zur Komplexierung des intrazellulären Calciums durch BAPTA, kann der PLC-Inhibitor U73122 verwendet werden, um die IP_3 -abhängige Freisetzung von Calcium aus dem SR zu vermindern (Mogami, Lloyd Mills et al. 1997). Jedoch zeigte die Analyse der Stimulation mit U73122 keinen signifikanten Effekt auf die Lokalisation von Myokardin-spezifischer Fluoreszenz nach Dehnung (Abbildung 37, vgl. E-H).

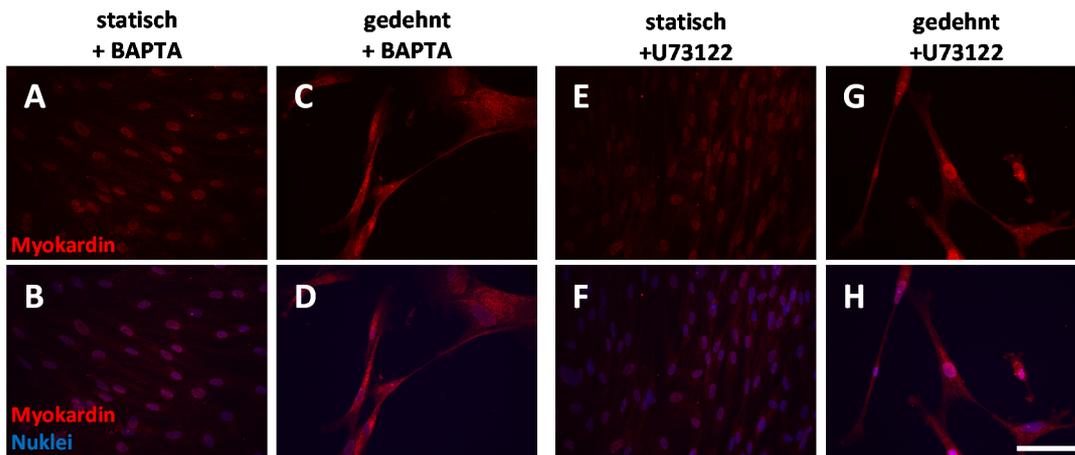


Abbildung 37: Wirkung des Calciumchelators BAPTA und des PLC-Inhibitors U73122 auf den Export von Myokardin nach zyklischer Dehnung

HuASMCs wurden mit dem Calciumchelator BAPTA (5 μ M, 1 h Vorinkubation, A-D) bzw. dem PLC-Inhibitor U73122 (5 μ M, 1 h Vorinkubation, E-H) versetzt und zyklisch gedehnt (24 h bei 13 % Elongation) bzw. statisch inkubiert. Anschließend wurde die Lokalisation von Myokardin betrachtet.

4.8.4 PDGF-BB hat keinen Einfluss auf die nukleäre Lokalisation von Myokardin

Die Aktivierung des PDGF-Rezeptors durch PDGF-BB führt zur Aktivierung von MEK1/2 und ERK1/2 (Aplin, Stewart et al. 2001, Yoshida, Gan et al. 2007). Darüber hinaus führt die Ausschüttung von PDGF-BB zu einer erhöhten glattmuskulären Proliferation, sowie zur Änderung des glattmuskulären Phänotyps hin zum synthetischen (Cattaruzza, Nogoy et al. 2012). Daher ist es möglich, dass PDGF-BB auch die Translokation von Myokardin aus dem Nukleus stimulieren kann. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden HuASMCs unter statischen Bedingungen mit PDGF-BB für 24 h inkubiert. Diese induzierte allerdings keinerlei Veränderung in der Anzahl Myokardin-positiver Nuklei (Abbildung 38 vgl. B und D).

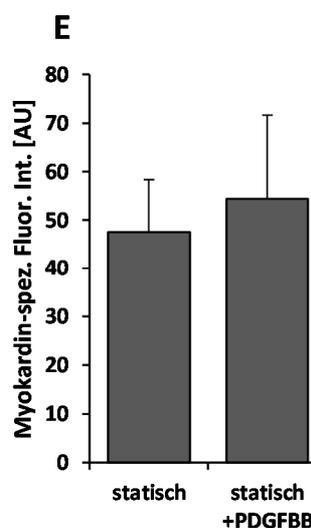
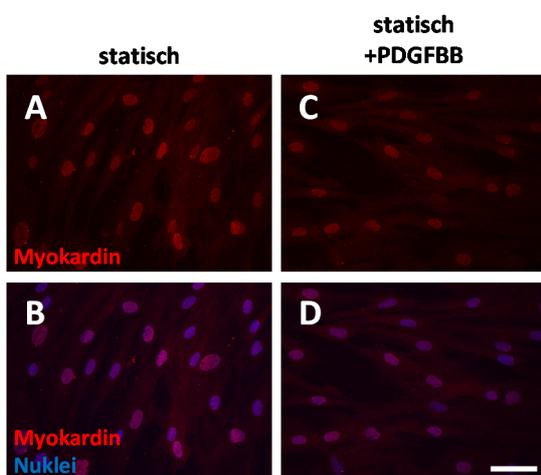


Abbildung 38: Einfluss einer PDGF-BB Stimulation auf die Myokardin-Lokalisation in HuASMCs

HuASMCs wurden mit rekombinantem PDGF-BB (10 ng/ μ l) für 24 h bei 37 $^{\circ}$ C und 5 % CO₂ stimuliert und anschließend mittels spezifischer Immunfluoreszenzfärbung hinsichtlich der Lokalisation von Myokardin untersucht (E, ns statisch vs. statisch +PDGF-BB, n= 3).

4.9 Untersuchung der Rolle des UPS auf die Degradation von Myokardin

Die posttranslationale Regulation des Proteoms wird unter anderem durch die Markierung eines Proteins zum Abbau ermöglicht. Ein Mechanismus hierfür ist die Aktivierung des Ubiquitin-Proteasomsystems (UPS). Die Ubiquitylierung eines spezifischen Proteins wird über die drei Enzymklassen E1-, E2- und E3-Ligase vermittelt (Calise and Powell 2013). Die Kombination der Ligasen und die Auswahl der einzelnen E3-Ligase vermitteln die Spezifität der Proteinmarkierung und damit die anschließende Degradation. Ein aktivierter Ubiquitinrest an einem internen Lysin des Zielmoleküls gilt als Akzeptor für weitere Ubiquitinreste (Willis, Townley-Tilson et al. 2010). Diese Polyubiquitinkette ist die Erkennungssequenz für das 26S-Proteasom zur Degradation des Proteins zu Peptiden und Aminosäuren (Hegde 2010). Die Rolle des UPS bei der Entwicklung des kardiovaskulären Systems ist unumstritten - die E3-Ligase FBW7, beispielsweise, ubiquitiniert den Notch-Rezeptor, wenn dieses nicht an seinen Liganden gebunden ist (Kim, Jung et al. 2011, Wang, Fukushima et al. 2011). Ein weiteres Beispiel ist die Polyubiquitinierung und damit Initiation der Degradation von VEGF-Rezeptor 2 durch die E3-Ligase Nedd-4 (Willis, Townley-Tilson et al. 2010). Im Kontext der Myokardin-gesteuerten glattmuskulären Entwicklung wird den E3-Ligasen CHIP und UBR5 eine regulierende Funktion zugeschrieben (Xie, Fan et al. 2009, Hu, Wang et al. 2010). Um diese Daten im Kontext der Myokardin-Translokation nach biomechanischer Dehnung zu überprüfen, wurde daher abschließend die Rolle des UPS bei der Degradation von Myokardin im Zytoplasma analysiert.

Dabei ergab sich, dass die Inhibition der β -Untereinheiten des Proteasoms *in vitro* in HuASMCs sowie auch *ex vivo* in der Perfusion isolierter Mesenterialarterien zu einer Akkumulation von Myokardin-Fluoreszenzintensität im Zytoplasma führt. Diese ist sowohl unter statischen Bedingungen als auch nach 24 h zyklischer Dehnung nachweisbar. Darüber hinaus ist die Expression der E3-Ligase CHIP in gedehnten HuASMCs signifikant erhöht.

4.9.1 Die Inhibition des Proteasoms führt zur Akkumulation von Myokardin im Zytoplasma dehnungsstimulierter HuASMCs

Die Aktivität des Proteasoms wurde in diesem Experimentaltel durch unterschiedliche Inhibitoren blockiert. Diese differieren in ihrer Spezifität hinsichtlich der enzymatischen Aktivität des 26S-Proteasoms – Kaspase-ähnliche β 1-Untereinheit, Trypsin-ähnliche β 2-Untereinheit, und Chymotrypsin-ähnliche β 5-Untereinheit (Gallastegui and Groll 2010). Bortezomib inhibiert die Chymotrypsin-ähnliche Proteasomaktivität, wobei mit steigender Konzentration von Bortezomib ein Anstieg der Myokardin-spezifischen Fluoreszenzintensität im Zytoplasma von gedehnten HuASMCs messbar war (Abbildung 39 A). Auch unter statischen Bedingungen führt Bortezomib zu einer

Akkumulation von Myokardin außerhalb des Nukleus. Lactacystin ist ein irreversibler Inhibitor der Trypsin-ähnlichen und Chymotrypsin-ähnlichen Proteasomaktivität, indem es N-terminal an einen Threoninrest der entsprechenden β 2- bzw. β 5-Untereinheit bindet (Fenteany, Standaert et al. 1995, Tomoda and Omura 2000). Der Einsatz von Lactacystin in gedehnten HuASMCs hat eine vermehrte Fluoreszenzintensität im Zytoplasma zur Folge (Abbildung 39 B), jedoch nicht signifikant erhöht im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Epoxomicin inhibiert mit unterschiedlicher Spezifität alle drei der Enzymaktivitäten des 26S-Proteasoms (Meng, Mohan et al. 1999). Auch der Einsatz von Epoxomicin führt zu einer signifikanten, konzentrationsabhängigen Akkumulation der Myokardin-spezifischen Fluoreszenzintensität im Zytoplasma der gedehnten HuASMCs (Abbildung 39 C).

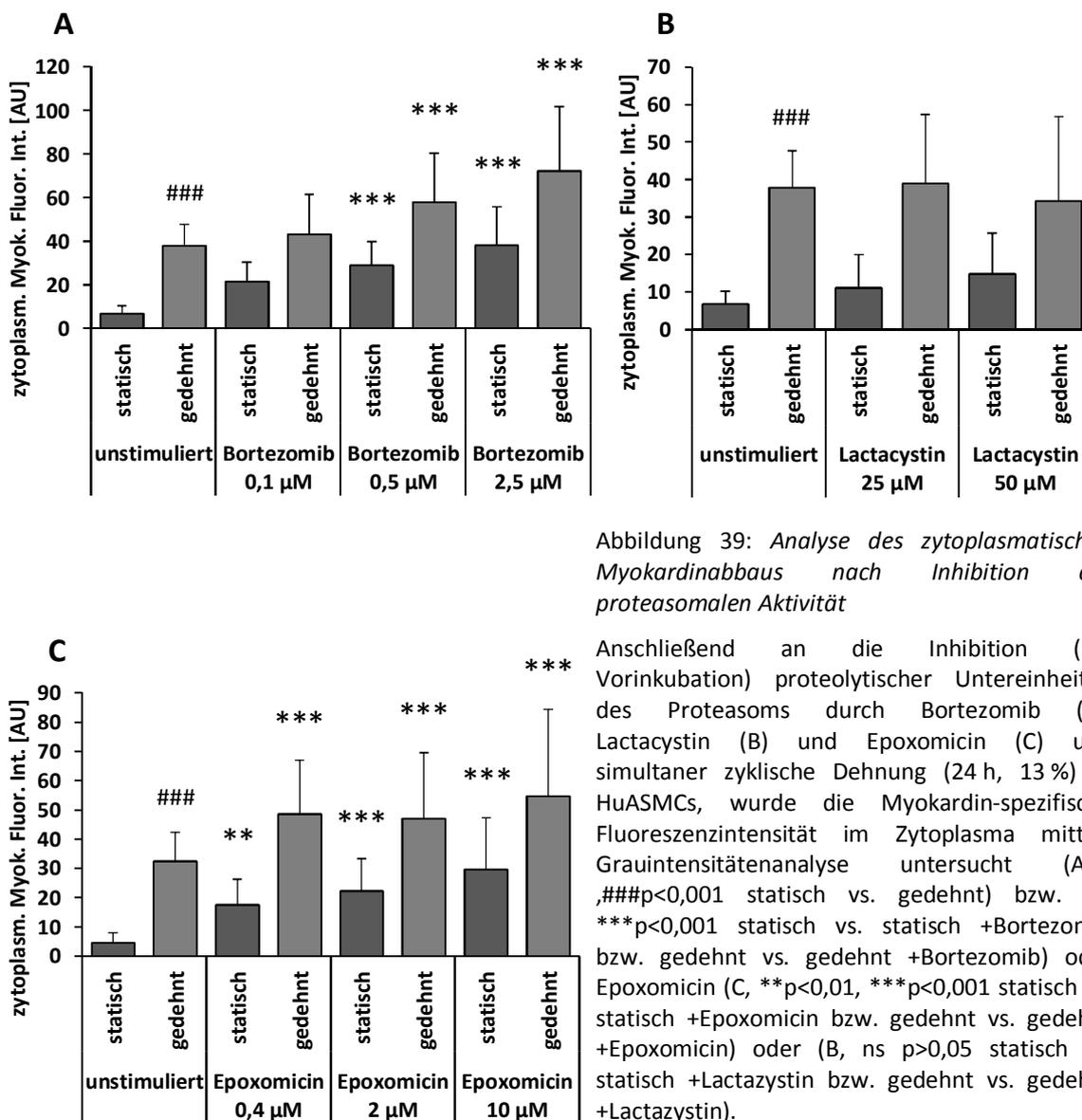


Abbildung 39: Analyse des zytoplasmatischen Myokardinabbaus nach Inhibition der proteasomalen Aktivität

Anschließend an die Inhibition (1 h Vorinkubation) proteolytischer Untereinheiten des Proteasoms durch Bortezomib (A), Lactacystin (B) und Epoxomicin (C) und simultaner zyklische Dehnung (24 h, 13 %) in HuASMCs, wurde die Myokardin-spezifische Fluoreszenzintensität im Zytoplasma mittels Grauintensitätenanalyse untersucht (A-C, ### $p < 0,001$ statisch vs. gedehnt) bzw. (A, *** $p < 0,001$ statisch vs. statisch + Bortezomib bzw. gedehnt vs. gedehnt + Bortezomib) oder Epoxomicin (C, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ statisch vs. statisch + Epoxomicin bzw. gedehnt vs. gedehnt + Epoxomicin) oder (B, ns $p > 0,05$ statisch vs. statisch + Lactacystin bzw. gedehnt vs. gedehnt + Lactacystin).

4.9.2 Bortezomib inhibiert den Abbau von Myokardin *ex vivo*, wobei die Proteinsynthese von CHIP nach zyklischer Dehnung in HuSMCs steigt

Um die Inhibition des Abbaus von Myokardin durch erhöhte Wandspannung in einem physiologischeren Kontext zu überprüfen, wurden isolierte Segmente der Arteria femoralis der Maus mit einem supraphysiologischen Druck perfundiert. Daher wurde ein normotensiver Kontrolldruck von 70 mmHg zu 50 mmHg einem hypertensiven Druck von 120 mmHg zu 100 mmHg gegenübergestellt. Die physiologische transmurale Druckdifferenz betrug dabei 60 mmHg im Vergleich zur supraphysiologischen transmuralen Druckdifferenz von 110 mmHg. Die Perfusion der Arteriensegmente mit einem hypertensiven Druck führt in DMSO-behandelten Kontrollarterien zu einem Abbau von Myokardin in medialen SMCs (Abbildung 40 B) im Vergleich zur normotensiven Perfusion (Abbildung 40 A). Durch die Inhibition proteasomaler Aktivität wird die dehnungsinduzierte Reduktion von Myokardin verhindert, wobei die Fluoreszenzintensität im Zytoplasma erhalten bleibt (Abbildung 40 C).

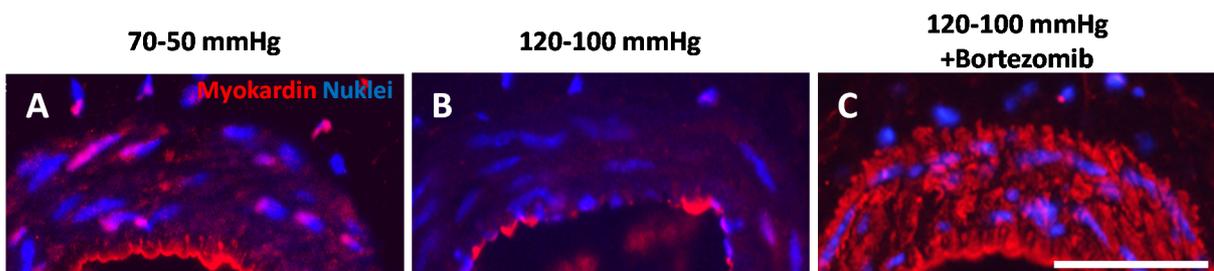


Abbildung 40: *Perfusion isolierter Femoralarterien mit simultaner Inhibition der proteasomalen Aktivität*

Isolierte murine Femoralarterien wurden für 6 h einer erhöhten Wandspannung exponiert. Die Kontrollen wurde bei 70-50 mmHg perfundiert (A) bzw. ein hypertensiver Druckgradient wurde durch die Perfusion mit 120-100 mmHg Ausstromdruck erzeugt (B), wobei unter diesen supraphysiologischen Druckverhältnissen die Wirkung von Bortezomib (2 μ M, 1 h Vorinkubation) auf die Myokardin-Fluoreszenzintensität in der Media getestet wurde (C). (C, Maßbalken: 50 μ m).

Da die Inhibition der proteasomalen Aktivität durch Bortezomib den Abbau von Myokardin verhindert und darüber hinaus unter dem Einfluss erhöhter Wandspannung die Fluoreszenzintensität von Myokardin erhalten bleibt, wurde letztlich die Funktionalität von Myokardin unter diesen Bedingungen geprüft, indem die mRNA-Expression von Calponin analysiert wurde (Abbildung 41).

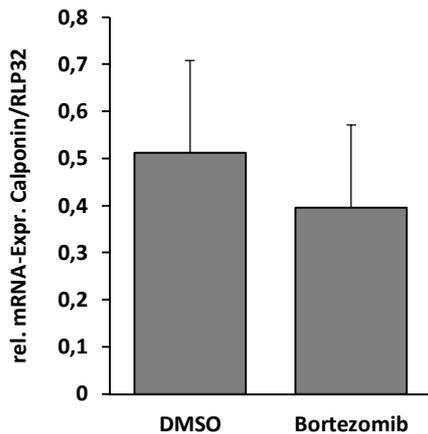


Abbildung 41: Einfluss der Inhibition proteasomaler Aktivität auf die mRNA-Expression von Calponin nach zyklischer Dehnung

HuASMCs wurden für 24 h bei 13 % Elongation gedehnt und entweder mit DMSO (1 h Vorinkubation) oder Bortezomib (2 μ M, 1 h Vorinkubation) behandelt. Anschließend wurde mittels PCR die Calponin-spezifische mRNA-Expression analysiert und durch RPL32 normalisiert (ns $p > 0,05$ gedehnt +DMSO vs. gedehnt +Bortezomib, n=6).

Um den postulierten Zusammenhang zwischen der gesteigerten Wandspannung und der Expression der E3-Ligase CHIP herzustellen, wurde diese immunfluoreszenztechnisch untersucht. Die Analyse der CHIP-spezifischen Fluoreszenzintensität zeigte tatsächlich einen Anstieg dieser nach zyklischer Dehnung (Abbildung 42 A) in HuASMCs (vgl. D und E).

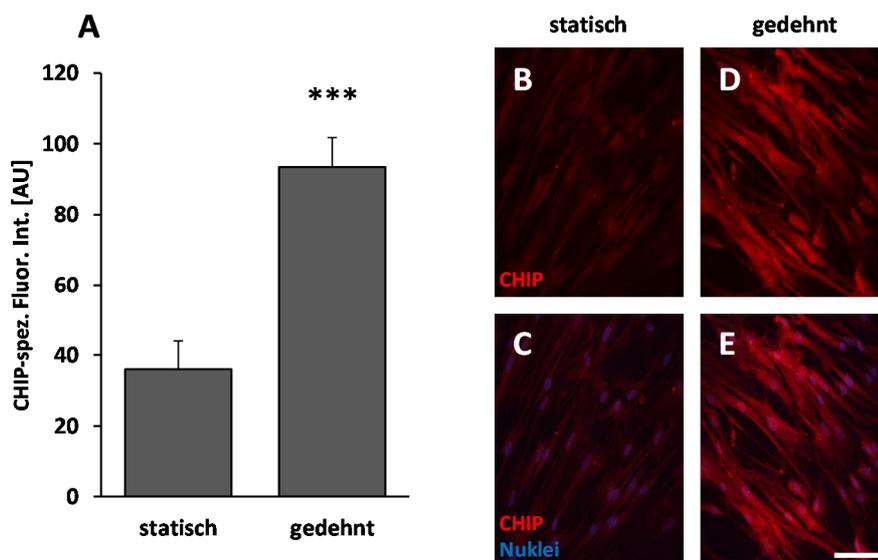


Abbildung 42: Expression und Lokalisation der E3-Ligase CHIP in Abhängigkeit von zyklischer Dehnung in HuASMCs

Die E3-Ligase CHIP ist ein Teil des UPS, wobei diese zytoplasmatische Proteine zum Abbau markiert. Daher wurde deren Gehalt unter dem Einfluss zyklischer Dehnung (24 h, 13 %) mittels CHIP-spezifischer Immunfluoreszenz untersucht und durch die Messung der Grauintensität quantifiziert (A, *** $p < 0,001$ statisch vs. gedehnt, n=3, Maßbalken: 100 μ m, vgl. C und E).

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Rolle von Myokardin – einem transkriptionellen Koaktivator des Transkriptionsfaktors SRF - bei der Initiation vaskulärer Remodellierungsprozesse studiert. Ausgehend von der Untersuchung der glattmuskulären Expression von Myokardin im Kontext arterieller Hypertonie, Arteriogenese und Varikosis, wurde dessen Regulation bei erhöhter Wandspannung bzw. Dehnung analysiert. Einerseits lag der Fokus auf der Analyse der zellulären Lokalisation von Myokardin, andererseits auf dessen Funktion, die durch die Bildung des ternären Komplexes mit SRF charakterisiert ist und damit die Expression Kontraktilitäts-vermittelnder Genprodukte kontrolliert. Darüber hinaus lag ein weiterer Schwerpunkt auf der Aufklärung des Mechanismus, der dem dehnungsinduzierten Export von Myokardin aus dem Nukleus humaner arterieller glatter Muskelzellen zugrunde liegt. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten in der Summe einen bisher unbekanntem Zusammenhang zwischen biomechanischer Dehnung glatter Muskelzellen und dem Export aus dem Zellkern bzw. der Degradation von Myokardin im Zytoplasma darstellen, der den Verlust des kontraktiven glattmuskulären Phänotyps erklärt. Als Konsequenz dieser relativen Myokardin-Defizienz wird ein aktivierter, synthetischer Phänotyp vaskulärer glatter Muskelzellen und nachfolgend die Initiation (mal)adaptiver, vaskulärer Remodellierungsprozesse gefördert.

5.1 **Der Einfluss erhöhter Wandspannung auf die Myokardin-Expression und die Reorganisation der Media**

Im Rahmen der Arbeit wurden drei *in vivo*-Modelle vaskulärer Remodellierung für die Untersuchungen herangezogen. Zunächst die durch Bluthochdruck induzierte Remodellierung der Arterienwand. Die Steigerung des Blutdrucks und die damit einhergehende Erhöhung der arteriellen transmuralen Druckdifferenz wurde durch eine Steigerung des zirkulierenden Blutvolumens (DOCA-Salz-Modell) hervorgerufen, was sowohl die diastolischen als auch die systolischen Blutdruckwerte erhöht (Pfisterer, Feldner et al. 2012, Salmon, Gomez et al. 2012). Zudem wurden Remodellierungsprozesse kollateraler Arteriolen im Rahmen der Arteriogenese untersucht. Hier wurden nach Verschluss einer größeren Leitungsarterie bereits ausgebildete Arteriolen im adulten Organismus zu Arterien umstrukturiert, um einer Unterversorgung einer distalen Körperregion entgegenzuwirken. Die vaskuläre Remodellierung kollateraler Arteriolen wird durch einen erhöhten Blutfluss initiiert, der durch die endotheliale Ausschüttung von NO zu einer Vasodilatation der Kollateralen führt. Gleichzeitig erhöht sich durch die Radiusvergrößerung die für die folgenden Umbauprozesse entscheidende Wandspannung (Demicheva, Hecker et al. 2008, Limbourg, Korff et al. 2009). Als drittes Modell wurde die Remodellierung der Venenwand betrachtet, die jedoch

bezüglich Initiation und Verlauf noch unvollständig untersucht ist. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass auch hier eine gesteigerte transmurale Druckdifferenz die maladaptive Reorganisation der venösen SMCs initiiert und die Bildung variköser Venen mit der typischen Korkenzieher-ähnlichen Morphologie hervorruft (Feldner, Otto et al. 2011).

Obwohl diese Modelle durch unterschiedliche Kombinationen biophysikalischer Parameter initiiert werden, liegt allen eine Erhöhung der Wandspannung zugrunde (Lazzeri, Valente et al. 2012). Diese wird gemäß dem Laplace-Gesetz entweder durch die Steigerung der transmuralen Druckdifferenz (bei Bluthochdruck), die NO-induzierte Vasodilatation und gleichzeitige Vergrößerung des Radius/Abnahme der Wanddicke (bei Arteriogenese) oder durch die Erhöhung des hydrostatischen Druckes (bei Varikosis) verursacht.

In vitro wurde erhöhte Wandspannung durch (zyklische) Dehnung - eine zentrale Komponente erhöhter Wandspannung - in humanen arteriellen bzw. venösen glatten Muskelzellen simuliert. Dies ermöglicht eine isolierte Betrachtung der Wirkung dieser biomechanischen Kraft auf den glattmuskulären Phänotyp. Zusammenfassend zeigen eigene Untersuchungen gedehnter vaskulärer SMCs einen Verlust von Myokardin im Zellkern. Sowohl in dem vorgenannten *in vitro*-Modell, als auch in den verschiedenen *in vivo*-Modellen, sowie in isolierten perfundierten Blutgefäßen, die einem supraphysiologischen Druck ausgesetzt wurden, resultierte die gesteigerte Wandspannung bzw. Dehnung der glatten Muskelzellen in einer verminderten Expression von Myokardin bzw. Reduktion der Proteinmenge auch im Zytoplasma. Die Funktionalität von Myokardin ist unter diesen Bedingungen reduziert, was beispielsweise durch die verminderte Expression des Myokardin-Zielgens Calponin gezeigt wurde. Gleichzeitig war die Proliferation der glatten Muskelzellen in den remodellierenden Blutgefäßen *in vivo* verstärkt, was ebenso wie der Verlust von Calponin, prototypisch für diesen Umbauprozess ist (Ward, Pasterkamp et al. 2000, Zeidan, Nordstrom et al. 2000). Die beobachtete Reduktion der Calponin-Expression im Zuge biomechanisch-bedingter vaskulärer Remodellierungsprozesse ist kongruent zu Untersuchungsergebnissen von perfundierten Segmenten der Aorta des Kaninchens. Hier kommt es durch die Steigerung des intraluminalen Drucks zur Reduktion von Calponin und Komponenten des kontraktilen Apparates in der Media (Birukov, Bardy et al. 1998).

Das in der Literatur oft als Marker glattmuskulärer Differenzierung verwendete Calponin ist ein negativer Regulator der kontraktilen Kapazität von glatten Muskelzellen, ein Effekt der über dessen Hemmung der Aktin-aktivierten Myosin-ATPase vermittelt wird. Dieser Effekt wird durch Phosphorylierung von Calponin über Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinasen bzw. die Proteinkinase C (PKC) aufgehoben (Carmichael, Winder et al. 1994), (Winder, Allen et al. 1993).

Ein Zusammenhang zwischen vaskulären Remodellierungsprozessen und veränderter Myokardin-Expression wurde bislang nur im Kontext der Neointimabildung gezeigt – eine Form des Gefäßwandumbaus, die mit einer massiven Einwanderung glatter Gefäßmuskelzellen in die Intima und deren Proliferation beispielsweise nach Verlust des Endothels einhergeht. Diese kann im Zuge der Arteriosklerose, nach perkutaner transluminaler Angioplastie ohne (Joung, Kwon et al. 2012) oder mit Platzierung eines gefäßweiternden Stents (In-Stent-Restenose) (Park, Kang et al. 2012) oder im Rahmen des Einsatzes von Venen als arteriellem Bypass (Anwar, Shalhoub et al. 2012, Shukla and Jeremy 2012, Weaver, Shukla et al. 2012) auftreten. Die Expression von Myokardin-Zielgenen, wie SM22, ist in diesen neointimalen glatten Muskelzellen reduziert, was in diesem Kontext auf eine Reduktion der Myokardin-Aktivität hindeutet. Auch Ergebnisse auf Basis anderer Neointimamodelle (ApoE-Defizienz-induzierte Arteriosklerose-assoziierte Neointimabildung; durch Endothelzellentfernung induzierte Neointimaformation; Ligation der A. carotis communis) zeigen eine verminderte mRNA-Expression von Myokardin (Minami, Kuwahara et al. 2012) sowie von dessen Zielgenen wie Calponin, SMA, SM-MHC oder SM22 (Althoff, Juarez et al. 2012, Kiyam, Limbourg et al. 2012).

Die Neointimaformation ist allerdings in vielen Punkten von den in dieser Arbeit untersuchten biomechanisch induzierten Umbauprozessen der Media zu unterscheiden: Beispielsweise hat die Ligation der A. carotis zur Induktion einer Neointimabildung durch eine unphysiologische Unterbrechung des Blutflusses bzw. der durch Schubspannung stimulierten endothelialen NO-Synthese keine nennenswerte Steigerung der Wandspannung zur Folge. Auch die auf einer Verletzung des Endothels basierenden Modelle der Neointimabildung unterscheiden sich von den durch biomechanische Kräfte hervorgerufenen vaskulären Adaptionsprozessen. So führt eine aktive Schädigung des Gefäßendothels zur Aktivierung des Immunsystems, wobei zudem aus Blutplättchen, die an der verletzten, intimalen Oberfläche aggregieren, im Rahmen der Hämostasereaktion freigesetzte Wachstumsfaktoren die Neointimabildung beschleunigen (Louis and Zahradka 2010). In diesen Modellen beeinflusst auch die Sezernierung von Wachstumsfaktoren wie VEGF (Alvarez Arroyo, Caramelo et al. 1998, Celletti, Waugh et al. 2001) oder PDGF-BB (Emaduddin, Ekman et al. 1999, Ronnstrand and Heldin 2001)) können auch Peptidhormone wie Angiotensin-II (Wilson, Saward et al. 1999, D'Amore, Black et al. 2005)) die Migration und Proliferation der glatten Muskelzellen induzieren bzw. verstärken.

Während die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *in vivo*-Modelle vorrangig zu einer Änderung biomechanischer bzw. hämodynamischer Umgebungsparameter führen, mussten auch hier sekundäre Faktoren als Auslöser der für Myokardin beobachteten Effekte berücksichtigt werden. So

spielen hier auch humorale Faktoren (Mulvany 2002, Lehoux, Castier et al. 2006, Iyer, Chan et al. 2010, Lu and Kassab 2011), wie beispielsweise der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Folge der erhöhten Wandspannung (Birukov 2009), die schubspannungsabhängige Freisetzung von NO aus Endothelzellen (Hahn and Schwartz 2009) sowie von Gewebshormonen wie Sphingosin-1-Phosphat (Igarashi and Michel 2009, Schuchardt, Tolle et al. 2011) oder Endothelin-1 eine wichtige Rolle für die Differenzierung der glatten Gefäßmuskelzellen. Daher ist es möglich, dass neben dem direkten biomechanischen Einfluss, die Lokalisation und Expression von Myokardin in den glatten Muskelzellen der Media auch von solchen humoralen Faktoren beeinflusst wird. Allerdings hatte die Stimulation humaner arterieller glatter Muskelzellen mit S1P, Noradrenalin, ET-1, PDGF-BB, einem NO-Donor (NONOate), ROS oder Hyperglykämie keinen Effekt auf die Myokardin-Expression oder Lokalisation (Daten nicht gezeigt). Daher ist es wahrscheinlich, dass eine Erhöhung der Wandspannung ein ausreichender Stimulus für die Verminderung der Myokardin-Expression bzw. dessen Export aus dem Zellkern ist und insofern entscheidend zum Verlust des kontraktiven Phänotyps dieser Zellen beiträgt.

Neben der Wandspannung wurde in dieser Arbeit auch der Einfluss der Wandsteifigkeit auf den glattmuskulären Phänotyp untersucht. So ist ein langfristiger Nebeneffekt maladaptiver Remodellierungsprozesse eine höhere Steifigkeit der Gefäßwand – ein Parameter, der selbst wiederum Einfluss auf den Phänotyp der glatten Gefäßmuskelzellen hat. Beispielsweise nimmt die Gefäßwanddicke der Arteria carotis im Alter von 20 bis zu einem Alter von 90 Jahren um das Zwei- bis Dreifache zu (Lakatta and Levy 2003). Diese Dickenzunahme ist beim Menschen ebenso wie bei Ratten (Michel, Heudes et al. 1994) mit einem Anstieg der Wandsteifigkeit verbunden. Dabei wird die erhöhte Gefäßsteifigkeit sowohl durch eine vermehrte Deposition von Kollagen verursacht, die im Alter zunimmt, als auch durch Bluthochdruck und den dadurch bedingten Umbau der Gefäßwand (Intengan and Schiffrin 2001, Safar, Chamiot-Clerc et al. 2001, Arribas, Hinek et al. 2006) mit der entsprechenden Redifferenzierung der glatten Gefäßmuskelzellen. Die erhöhte Rigidität der Blutgefäße basiert einerseits daher auf der Anpassung der ECM sowie der Adaption der glattmuskulären Differenzierung (Stegemann, Hong et al. 2005, Palatini, Casiglia et al. 2011). Der vermehrte Kollagenanteil (Remodellierung der ECM) wird in Leitungs- bzw. Widerstandsgefäßen hypertensiver Patienten (Rizzoni, Muiesan et al. 1998, Intengan, Deng et al. 1999, Olsen, Christensen et al. 2005) genauso nachgewiesen wie in tierexperimentellen Hypertoniemodellen (Intengan, Thibault et al. 1999, Rossi, Cavallin et al. 2002).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen hinsichtlich der Dedifferenzierung kultivierter glatter Gefäßmuskelzellen, dass eine weichere Adhäsionsbasis – zur Simulation einer (adaptierten) ECM - (Hydrogel-Modell: (Missirlis, Tirelli et al. 2005, Missirlis and Hubbell 2010) zu einer verminderten

Lokalisation von Myokardin im Kern dieser Zellen führt. Dieser Befund widerspricht teilweise publizierten Ergebnissen: Safar *et al.* beschreiben eine erhöhte Steifigkeit der Blutgefäße als eine Folgeerscheinung des Alterungsprozesses (Safar, Boudier *et al.* 2001), welcher eher mit einer Verminderung der Kontraktilität der glatten Gefäßmuskelzellen einhergeht (Hausman, Martin *et al.* 2012). In der Folge steigt der systolische Blutdruckwert langsam aber kontinuierlich mit dem Alter an während der diastolische Druckwert zunächst kompensatorisch mitsteigt, um dann wieder abzusinken bzw. konstant zu bleiben (Palatini, Casiglia *et al.* 2011).

Problematisch bei den vorgenannten Messungen der generellen Gefäßsteifigkeit ist, dass dabei nicht zwischen der Steifigkeit der ECM und der der Zellen differenziert werden kann. Ein Weg die Steifigkeit einzelner Zellen *in vitro* zu messen, ist die Nutzung der Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy* (AFM)). Bei der Analyse einzelner vaskulärer glatter Muskelzellen von drei unterschiedlichen Primatenarten wiesen die Zellen adulter Tiere einen höheren elastischen Modulus ($41,7 \pm 0,5$ kPa) als die von juvenilen Tieren ($12,8 \pm 0,3$ kPa) auf (Qiu, Zhu *et al.* 2010), d.h. sie setzten ihrer Verformung einen größeren Widerstand entgegen, was sich in einem höheren elastischen Modulus widerspiegelt, bzw. waren steifer. Demnach wird nicht nur die Steifigkeit von Blutgefäßen insgesamt bzw. die der ECM durch die glatten Gefäßmuskelzellen reguliert, sondern diese reagieren umgekehrt auch auf die Steifigkeit der ECM. Vor diesem Hintergrund wurde mehrfach belegt, dass eine erhöhte Matrixsteifigkeit - im Einklang mit den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit - mit einer vermehrten Expression glattmuskulärer Differenzierungsmarker einhergeht (Peyton, Raub *et al.* 2006, Adelow, Segura *et al.* 2008, Peyton, Kim *et al.* 2008, Park, Chu *et al.* 2011, Fioretta, Fledderus *et al.* 2012). Es besteht also offensichtlich eine Art dynamischer Interaktion zwischen der ECM, die durch ihre Komposition und Kompaktheit den glattmuskulären Phänotyp beeinflusst, und den glatten Gefäßmuskelzellen, die durch die Freisetzung v. a. von Matrixmetalloproteinasen die Zusammensetzung der ECM kontrollieren (Gjorevski and Nelson 2009).

Diese erhöhte proteolytische Aktivität ist eine entscheidende Voraussetzung für die Migration der glatten Muskelzellen während des Umbauprozesses der Gefäßwand und führt zu einer partiellen Auflösung deren Matrixstruktur, die wiederum die Steifigkeit der ECM verändert. In diesem Zusammenhang postuliert Prof. Dr. Daniel Tschumperlin (Harvard University, School of Public Health, Boston, USA; pers. Korrespondenz) eine dynamische Matrixsteifigkeitsänderung, die von der Modulation der Zell-Zell-Interaktion als Antwort auf die Steifigkeit der Matrix selbst abhängt. De facto migrierten die kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen entlang eines Steifigkeitsgradienten von weich nach fest und änderten dabei ihren Phänotyp. So verringerte sich beispielsweise die Expression von SMA je weicher die Matrix wurde. Unter diesen Bedingungen ergibt sich also eine

Korrelation zwischen einer steifer werdenden Matrix und dem kontraktilen Phänotyp der glatten Gefäßmuskelzellen. Daraus lässt sich ableiten, dass deren Phänotyp bzw. Expressionsmuster auf die Steifigkeit der Matrix reagiert. Jedoch scheint dies keine definierte und endgültige Anpassung zu sein, sondern eher eine graduelle Differenzierung in Abhängigkeit von der Umgebungssteifigkeit. Tendenziell scheinen zumindest *in vitro* weichere Matrices die Proliferation der Zellen zu begünstigen – eine Umgebung, die auf Grund der erhöhten proteolytischen Aktivität v. a. während der Initiation vaskulärer Remodellierung existiert. Das Ende eines solchen Prozesses geht mit einer durch Wanddicke und Matrixkomposition verursachten Versteifung der Gefäßwand einher, was zur Hemmung der Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen beitragen könnte. Über die genaue Steifigkeit der Gefäßwand zum Zeitpunkt ihrer strukturellen Reorganisation ist allerdings noch nichts bekannt. Daher gibt es auch keine eindeutigen Untersuchungen hinsichtlich einzelner Stadien und der damit verbundenen Steifigkeit. Die Anpassung der Steifigkeit der ECM und der glatten Gefäßmuskelzellen scheint aber zumindest initial ein dynamischer und interaktiver Prozess zu sein.

Eine Änderung der Matrixsteifigkeit und Organisation wird maßgeblich durch die Expression und den Aktivitätszustand der Matrixmetalloproteinasen bestimmt (Jacob 2003). Ihre Expression ist in aktivierten vaskulären SMCs gesteigert, was zur Neointimabildung in *ex vivo* kultivierten Gefäßen bzw. bei der Restenose nach Gefäßverletzung oder Traumatisierung beiträgt (George, Zaltsman et al. 1997). Insbesondere die Gelatinaseaktivität von MMP-9 trägt durch die Veränderung der Zell-Matrix-Interaktion zur Migration und intimalen bzw. medialen Hyperplasie bei (Newby and Zaltsman 2000, Johnson and Galis 2004, Rodriguez-Pla, Bosch-Gil et al. 2005, Thomas and Newby 2010). Ebenso steigert mechanische Dehnung die mRNA-Expression von MMP-9 und MMP-2 in arteriellen glatten Muskelzellen (Grote, Flach et al. 2003, Feldner, Otto et al. 2011) sowie von MMP-2 in venösen SMCs (Feldner, Otto et al. 2011). Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass der Knockdown von Myokardin in humanen arteriellen glatten Muskelzellen zu einer Reduktion der MMP-9- nicht aber MMP-2-spezifischen mRNA-Expression führt. Funktionell kommt es zu einer reduzierten Einwanderung der Zellen in 3-dimensionale Kollagen-I-Gelen, die nicht auf eine eingeschränkte Migrationskapazität per se, sondern mutmaßlich auf eine verminderte proteolytische Aktivität in den Myokardin-depletierten Zellen zurückzuführen ist. Suh *et al.* zeigten in diesem Zusammenhang, dass die pharmakologische Inhibition der MMP-9-Aktivität mit 3,4,5-Trihydrobenzaldehyd über die Phosphorylierung von ERK1/2 zu einer Reduktion der Migration humaner arterieller SMCs führt (Suh, Cho et al. 2008). Es ist also sehr wahrscheinlich, dass Myokardin die proteolytische Aktivität aktivierter glatter Gefäßmuskelzellen moduliert. Jedoch muss konstatiert werden, dass die physiologische Bedeutung der Myokardin-abhängigen MMP-9-Regulation nicht abschließend geklärt werden konnte. So gibt es zwar SRF-Bindungsmotive im MMP-9-Promoter (Gilles, Bluteau et al.

2009), die Relevanz dieser putativen transkriptionellen Regulation wird vermutlich aber nur mit Hilfe adäquater *in vivo*-Experimente beantwortet werden.

5.2 Myokardin-abhängige Kontrolle des glattmuskulären Phänotyps

Die Architektur der arteriellen Gefäßwand ist nicht unveränderlich. So passen sich Arterien veränderten hämodynamischen Kräften durch entsprechende Remodellierung an. Zum einen erfährt, wie bereits beschrieben, die ECM eine Umstrukturierung. Darüber hinaus ändern die glatten Muskelzellen der Media ihren Phänotyp von kontraktile, differenziert und ruhend zu synthetisch, dedifferenziert und aktiviert (Tuna, Bakker et al. 2012). Ihre Kontraktilität ist die Grundlage des myogenen Tonus bzw. der aktiven Konstriktion gegen den dehnenden Blutdruck, der die Höhe des diastolischen Blutdruckwerts bestimmt. Einer aktuellen Theorie zufolge (Hayashi and Naiki 2009) kommt es bei chronischer Blutdruckerhöhung zur Initiation eines zunächst noch adaptiven Umbaus der Gefäßwand, indem deren Verdickung dem biomechanischen Stress einer vergrößerten transmuralen Druckdifferenz entgegenwirkt. Die Gefäßwand reagiert also zunächst auf die veränderten Umgebungsbedingungen und versucht diese auszugleichen, was die vaskuläre Remodellierung per se somit als notwendig und hilfreich in der Konterkarierung chronisch veränderter biomechanischer Einflüsse macht. Sobald jedoch die Schub- und Wandspannung aber einen gewissen Schwellenwert hinsichtlich Intensität und Dauer überschreitet, wirkt sich dieser Adaptationsprozess nachteilig für die strukturelle und funktionelle Integrität des Blutgefäßes aus (Na, Trache et al. 2008). Das maladaptive *inward remodeling* mit einem entsprechenden Anstieg bzw. einer Fixierung des Bluthochdrucks ist die Folge. Allerdings scheint die Gefäßwand nur so langfristig in der Lage zu sein, einen ausreichenden passiven Widerstand gegenüber dem erhöhten transmuralen Druckgradienten aufzubauen und dadurch die limitierte kontraktile Kapazität (Tsamis and Stergiopoulos 2007) der glatten Gefäßmuskulatur nachhaltig zu unterstützen: Der Anstieg des intravaskulären Druckes erhöht die Wandspannung, die wiederum die vaskuläre Hypertrophie und Hyperplasie initiiert (Owens and Schwartz 1982, Lombardi, Owens et al. 1989), somit die Gefäßwandverdickung bedingt, die wiederum der erhöhten Wandspannung entgegenwirkt (Mulvany 2002).

Der mit solchen Umbauprozessen assoziierte synthetische Phänotyp glatter Muskelzellen zeichnet sich durch einen Verlust der Expression von Genprodukten des kontraktilen Apparates (Owens 1995, Owens, Kumar et al. 2004, Gomez and Owens 2012), durch eine Steigerung der Migration und Proliferation (Lacolley, Regnault et al. 2012) sowie eine modifizierte Matrixproteinsynthese aus (Kiyon, Limbourg et al. 2012). Die erhöhte Wandspannung führt aber auch, wie in dieser Arbeit

gezeigt, zu einer Reduktion der Myokardin-spezifischen mRNA-Expression sowie einem Abbau des Proteins in nativen ebenso wie in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen mit der Konsequenz einer verringerten Expression und Proteinsynthese prototypischer Myokardin-Zielgene wie z.B. Calponin, SMA oder SM-MHC. Entsprechend resultiert der Myokardin-spezifische Knockdown ebenfalls in der Verminderung der Expression dieser Genprodukte in HuASMCs. Diese Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass die biomechanische Dehnung der SMCs ausreichend ist, um die Expression von Myokardin sowie dessen Funktion zu inhibieren. Konsekutiv kommt es zur Phänotypänderung von kontraktilem ruhend zu synthetisch aktiviert.

Diese regulative Funktion von Myokardin für die Aufrechterhaltung des kontraktilem Phänotyps bei der Initiierung vaskulärer Remodellierungsprozesse war bisher unbekannt. Lediglich die Stabilisierung der Expression von Genprodukten des kontraktilem Apparates durch Myokardin war primär aus Arbeiten mit glattmuskulären Zelllinien bekannt Long *et al.*, korrelierten die Überexpression von Myokardin mit einer Steigerung der Expression von Genprodukten des kontraktilem Apparates in BC₃H1-Zellen (SMC-ähnliche Zelllinie, ursprünglich aus einem murinen Gehirntumor) (Long, Bell et al. 2008). Damit postulierte er die Stimulation des differenzierten Phänotyps durch die vermehrte Expression von Myokardin. Einen ähnlichen Zusammenhang wurde auch durch Liu *et al.* in der Zelllinie A7r5 (eine Zelllinie embryonaler SMCs aus der Ratten-Aorta) untersucht (Liu, Wang et al. 2005). Nahezu zeitgleich mit Long *et al.* zeigten Huang *et al.* mithilfe induzierbarer, glattmuskulenzell-spezifischer Myokardin-defizienter Mäuse eine Abnahme des kontraktilem Phänotyps der glatten Gefäßmuskelzellen im Laufe der Embryonalentwicklung (Huang, Cheng et al. 2008). Während diese Arbeiten vor allem den entwicklungsbiologischen Einfluss von Myokardin auf die glattmuskuläre Differenzierung beschrieben, zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erstmalig einen Zusammenhang zwischen erhöhter Wandspannung, einer verminderten mRNA-Expression bzw. Proteinsynthese von endogenem Myokardin und dem Verlust des kontraktilem glattmuskulären Phänotyps unter Verwendung primärer Zellen.

Die Phänotypänderung der glatten Gefäßmuskelzellen ist jedoch nicht nur mit der Inhibition von Myokardin und damit der Dissoziation von Myokardin von SRF, sondern auch mit der Bildung des ternären Komplexes zwischen SRF und Elk1 assoziiert (Salmon, Gomez et al. 2012). Beide transkriptionellen Koaktivatoren, Myokardin und Elk1, konkurrieren auf ähnliche Weise um eine Bindungsstelle am SRF, ändern die Expression der SRF-Zielgene aber ganz unterschiedlich (Marais, Wynne et al. 1993, Miano 2003). So führt die Phosphorylierung von Elk1 durch pERK1/2 zur Verminderung der Expression von Markergenen der glattmuskulären Differenzierung, wie SM22 und SMA, da Elk1-SRF nicht wie Myokardin-SRF die CARG-Box-Sequenz bindet, sondern an die sog. ETS-Sequenz (Odrowaz and Sharrocks 2012). In der Literatur wird die Bindung von Elk1 an SRF als

kompetitiv gegenüber der Bindung von Myokardin an SRF beschrieben (Wang, Wang et al. 2003, Yoshida, Gan et al. 2008). Dieser Theorie zufolge kommt es zur einer Verdrängung von Myokardin aus dem ternären Komplex durch phosphoryliertes Elk1 (pElk1) (Zhou, Hu et al. 2005). Im Gegensatz dazu stellen die eigenen Resultate eine Kompetition von Elk1 und Myokardin um die Bindung an SRF zumindest unter dem Einfluss erhöhter Wandspannung in Frage. Einerseits zeigt die zyklische Dehnung humaner kultivierter arterieller glatter Muskelzellen keinen Effekt auf die mRNA-Expression von Elk1 (Daten nicht gezeigt). Wäre die Stabilität der Bindung von Myokardin an SRF von Elk1 abhängig, wäre es naheliegend, dass auch die Expression von Elk1 dehnungssensitiv ist. Weitere Analysen zeigten jedoch, dass auch ein Knockdown von Elk1 in dehnungsstimulierten humanen, glatten Muskelzellen erhaltenden keinen Effekt auf die mRNA-Expression oder den nukleären Export von Myokardin hat (Daten nicht gezeigt). Dies erhärtet die Annahme, dass unter diesen Bedingungen Elk1 und Myokardin nicht miteinander um die Bindung an SRF konkurrieren. Denn wäre die dehnungsinduzierte Dissoziation von Myokardin und SRF abhängig von Elk1 bzw. müsste dieser eine Verdrängung durch pElk1 vorausgehen und daher dürfte der dehnungsinduzierte Export von Myokardin aus dem Zellkern in Elk1-defizienten glatten Gefäßmuskelzellen nicht stattfinden. Darüber hinaus ist bekannt, dass Elk1 durch die Stimulation mit PDGF-BB und damit durch die Aktivierung von pERK1/2 phosphoryliert und ebenfalls aktiviert wird (Aplin, Stewart et al. 2001, Yoshida, Gan et al. 2007). Die Stimulation von glatten Gefäßmuskelzellen mit PDGF-BB in dieser Arbeit hatte jedoch keinen Effekt auf die Lokalisation von Myokardin.

Eine alternative Erklärung für die verminderte Synthese Kontraktilitäts-assoziiierter Genprodukte in PDGF-BB-stimulierten glatten Gefäßmuskelzellen ist die Interaktion von Elk1 mit MRTF-A. MRTF-A ist ebenfalls an der Aufrechterhaltung der Kontraktilität von Kardiomyozyten und vaskulärer SMCs durch die Regulation der Expression von SMA, SM22 oder Telokin, involviert (Muehlich, Wang et al. 2008, Kuwahara, Kinoshita et al. 2010). Die Komplexierung von MRTF-A und SRF kann ebenfalls durch PDGF-BB-Stimulation aufgehoben (Yoshida, Gan et al. 2007). Dies könnte darauf hindeuten, dass unter diesen Stimulationsbedingungen nicht die Funktionalität von Myokardin Elk1-abhängig ist, sondern die von MRTF-A. Im Gegensatz dazu zeigen eigene Daten, dass sowohl der Knockdown von Myokardin als auch die zyklische Dehnung der humanen arteriellen glatten Muskelzellen keinen Effekt auf die Proteinsynthese oder Lokalisation von MRTF-A hat (Daten nicht gezeigt). Die Aussagekraft dieser Befunde ist allerdings dahingehend limitiert, da noch detaillierte Untersuchungen zur Abhängigkeit der MRTF-A Aktivität von Elk1 ausstehen.

5.3 Dehnungsregulierte Signalwege und ihr Einfluss auf den nukleären Export von Myokardin

Diese Arbeit zeigt, dass biomechanische Dehnung von vaskulären glatten Muskelzellen oder eine erhöhte Wandspannung in Arterien den nukleären Export von Myokardin zur Folge hat. Die genauere Analyse der hierbei beteiligten Signalwege ergab, dass dieser Export von Myokardin aus dem Zellkern durch Hemmung der Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2 verhindert werden kann während die Blockade anderer Mitglieder dieser Proteinkinase-Familie diesen Effekt nicht hatte (Daten nicht gezeigt). Infolge der zyklischen Dehnung wird nicht nur die Gesamtmenge des phosphorylierten ERK1/2 (pERK1/2) gesteigert, sondern dieses auch vermehrt in den Nukleus importiert. Es lag insofern nahe zu vermuten, dass die aktivierte Proteinkinase Myokardin im Zellkern an einem Serin-Rest phosphoryliert, was dessen Ausschleusung aus dem Zellkern und Inaktivierung der Myokardin-Funktionalität im Zytoplasma zur Folge hat. Diese Interpretation der Ergebnisse wird u.a. durch die Aufrechterhaltung der Expression des Myokardin-Zielgens Calponin in gedehnten glatten Gefäßmuskelzellen gestützt, in denen die Aktivierung der MAP-Kinase blockiert worden war. Die Inhibition von ERK1/2 verhindert insofern nicht nur den Export von Myokardin aus dem Zellkern bei zyklischer Dehnung, sondern Myokardin scheint zudem aktiv an SRF gebunden zu bleiben und hält so die glatten Gefäßmuskelzellen in einem primär differenzierten Zustand.

Die Aktivierung bzw. der nukleäre Import von ERK1/2 nach mechanischer Dehnung wurde bereits in unterschiedlichen Zusammenhängen gezeigt: In alveolaren Epithelzellen (G-Protein-vermittelt) (Correa-Meyer, Pesce et al. 2002), in vaskulären Endothelzellen (Traub and Berk 1998, Ikeda, Takei et al. 1999) und in Ratten-Kardiomyozyten (Yamazaki, Tobe et al. 1993). Eine Phosphorylierung und damit Aktivierung von ERK1/2 in dehnungsstimulierten vaskulären SMCs wird durch Signalkaskaden vermittelt, die ihren Ursprung an häufig an Zelloberflächenmolekülen, wie G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Ionenkanälen oder Wachstumsfaktorrezeptoren haben. So wird in alveolaren Epithelzellen und vaskulären SMCs beispielsweise durch die erhöhte Wandspannung eine G-Protein-abhängige Signalkaskade stimuliert, die zur Aktivierung von ERK1/2 führt (Numaguchi, Eguchi et al. 1999). Xu *et al.* untersuchten hypertensive Ratten hinsichtlich des Aktivierungsgrades der MAP-Kinasen (Xu, Liu et al. 1996). Hier korreliert der Anstieg des systemischen Blutdrucks mit einer vermehrten Phosphorylierung von ERK1/2 und der N-terminalen c-Jun-Kinase (JNK).

Die Aktivierung dieser MAP-Kinasen erfolgt in der Regel sehr schnell. Im Fall der hypertensiven Ratten war schon am ersten Tag eine Steigerung der MAP-Kinaseaktivität in der Wand der Aorta, A. carotis bzw. A. femoralis nachweisbar. *In vitro*, d.h. in kultivierten Zellen, erfolgt die Aktivierung bereits nach 15-60 min, wobei diese interessanterweise auch von der Frequenz der Dehnungszyklen

abhängt und erst bei einem Schwellenwert von 0,1 Hz erfolgt (Correa-Meyer, Pesce et al. 2002, Hsu, Lee et al. 2010). Die frühe Aktivierung von ERK1/2 und JNK kann somit als erste Reaktion auf veränderte biomechanische Parameter und als Initiationsschritt der Reorganisation in der Media bezeichnet werden. Darüber hinaus ist ERK1/2 auch durch Wachstumsfaktoren wie PDGF-BB stimulierbar (Kingsley, Huff et al. 2002, Eskildsen-Helmond and Mulvany 2003), die insbesondere bei der Neointimabildung eine wichtige Rolle spielen.

Die Stimulation der HuASMCs mit PDGF-BB hatte keinen Effekt auf die Lokalisation von Myokardin und ist daher als relevanter Stimulus für dessen nukleären Export in glatten Gefäßmuskelzellen ausgeschlossen (siehe 5.2). Der siRNA-vermittelte Inhibition des Rezeptors für PDGF-BB hat aber keinen regulativen Einfluss auf die Proteinsynthese von Myokardin in murinen vaskulären SMCs (Kiyan, Limbourg et al. 2012), wobei allerdings der Phosphorylierungsstatus von Myokardin in diesem Zusammenhang unklar ist. Auch die Hemmung des Rho-Kinase-Signalwegs, d.h. von RhoA und ROCK (Daten nicht gezeigt), die in den $G\alpha_q$ - ebenso wie in den $G\alpha_{12/13}$ -Signalweg involviert sind, blockierte die Translokation von Myokardin in das Zytoplasma der zyklisch gedehnten, arteriellen glatten Gefäßmuskelzellen nicht. Demnach scheinen klassische G-Protein-vermittelte Signalwege keinen direkten Einfluss auf die Myokardin-Lokalisation bzw. Aktivität in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen zu haben. Allerdings wurde in anderen Arbeiten gezeigt, dass der Import von MRTF-A in den Zellkern und dessen Export ins Zytoplasma RhoA-abhängig sein kann (Lockman, Hinson et al. 2004) und die Aktivität von MRTF-A in glatten Gefäßmuskelzellen während der Neointimabildung durch den $G\alpha_{12/13}$ -Signalweg gesteuert wird (Althoff, Juarez et al. 2012).

Eine Hemmung der Phospholipasen C, deren β -Isoform über den $G\alpha_q$ -Signalweg aktiviert wird, hatte ebenfalls keinen Effekt auf die Translokation von Myokardin nach zyklischer Dehnung. Das von der PLC produzierte IP_3 vermittelt über die Calciumfreisetzung aus dem SR die Calcium/Calmodulin-abhängige Aktivierung der Phosphatase Calcineurin (Schofl, Mader et al. 1999, McCullar, Larsen et al. 2003, Hyduk, Chan et al. 2007). Auch die Inhibition von Calcineurin mithilfe von Cyclosporin A hatte keinen Effekt auf den Export von Myokardin aus dem Zellkern in dehnungsstimulierten glatten Muskelzellen (Daten nicht gezeigt). Insgesamt deuten diese negativen Daten darauf hin, dass die klassischen G-Protein-vermittelten Signalwege für die dehnungsinduzierte Myokardin-Translokation weniger relevant sind. Gleichzeitig muss aber konstatiert werden, dass diese Signalkaskaden für die Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen im Rahmen der Neointimaformation hochrelevant zu sein scheinen, wie eine Studie von Althoff *et al.* zeigt (Althoff, Juarez et al. 2012). Diese Arbeit zeigte, dass $G\alpha_{12/13}$ -defiziente Mäuse eine Reduktion der Expression von Myokardin-Zielgenen, wie SM-MHC, Calponin und SMA aufweisen, wobei die Noradrenalin oder

KCl-induzierte Kontraktion und damit die generelle Funktionalität der Arteria carotis in diesen Tieren nicht beeinträchtigt ist. $G\alpha_{q/11}$ -defiziente Mäuse zeigen zunächst zwar keine Veränderung der o.g. Expressionsmuster, bilden aber keine Neointima nach Verschluss der A. carotis in proximalen Teil der Arterie (*flow cessation model*). Im Gegensatz zu den $G\alpha_{12/13}$ -defizienten Mäusen zeigen die $G\alpha_{q/11}$ -Knockout Tiere in diesem Kontext auch keine Veränderung der SMA- und SM22-Expression. Es findet also praktisch keine Dedifferenzierung oder Remodellierung statt. Interpretiert werden diese Befunde dahingehend, dass die Aktivierung von RhoA und SRF ohne den $G\alpha_{12/13}$ -Signalweg blockiert ist, was zur Inhibition der MRTF-A-Aktivität sowie reduzierten Expression von SMC-Differenzierungsmarker führt. Der $G\alpha_{q/11}$ -vermittelte Weg führt hingegen über die Aktivierung von ERK1/2 zur Phosphorylierung und Aktivierung von Elk1. Es wäre allerdings gleichzeitig möglich, dass die Myokardin-Aktivität in der $G\alpha_{q/11}$ -defizienten Maus durch das Ausbleiben der ERK1/2-Aktivierung nicht beeinflusst wird und im Zellkern verbleibt, was ebenso die stabile SMA und SM22-Expression erklären würde. Allerdings ist das in der diskutierten Arbeit verwendete Neointimamodell nicht mit den in dieser Arbeit verwendeten Modellsystemen in Gänze vergleichbar.

Neben den G-Protein-abhängigen Signalkaskaden aktiviert eine biomechanische Dehnung glatter Gefäßmuskelzellen auch andere mechanosensitive Rezeptorkomplexe wie heterodimere Integrine (Dabiri, Lee et al. 2012), Bestandteile des Zytoskeletts (Ingber 2006) oder Ionenkanäle (Martinac 2004). So gibt es eine ganze Reihe von zum Teil sehr unterschiedlichen Ionenkanälen, die dehnungssensitiv Einfluss auf die glattmuskuläre Kontraktilität ausüben: Spannungs- oder Calcium-abhängige Kaliumkanäle wie K_v7 oder BK (Mackie and Byron 2008, Takahashi and Naruse 2012), dehnungs- oder Diacylglycerol-aktivierbare Calciumkanäle wie *stretch activated channels* (SACs) (Guibert, Ducret et al. 2008) oder TRP-Kanäle der C-Subfamilie (Beech, Muraki et al. 2004, Sharif-Naeini, Dedman et al. 2008) bzw. nichtselektive TRP-Kanäle der V-Subfamilie (Hartmannsgruber, Heyken et al. 2007) sowie weitere nichtselektive Ionenkanäle, die sowohl permeabel für Calcium- als auch für Natriumionen sind (Lee, Baek et al. 2007) sowie mechanosensitive Natriumkanäle (Strege, Mazzone et al. 2007). Jedoch zeigen eigene Ergebnisse durch die Analyse isoliert-perfundierter Arterien aus TRPC3/C6-Doppelknockout-Mäusen im Vergleich zu den Gefäßen aus Wildtypmäusen keinen Unterschied in der druck- bzw. dehnungs-induzierten Verminderung der Myokardin-Proteinsynthese. Auch die generische Hemmung aller Mitglieder der TRPC-Familie aber auch von SACs durch Gadolinium in kultivierten arteriellen glatten Muskelzellen hatte keinen Effekt auf die Depletion von Myokardin im Zellkern und im Zytoplasma dieser Zellen nach Dehnung. Aufgrund dieser Ergebnisse ist eine Beteiligung von TRPC-Kanälen an der dehnungsvermittelten Translokation von Myokardin aus dem Zellkern in das Zytoplasma wenig wahrscheinlich.

Neben einem Einstrom von Calcium aus dem Extrazellularraum durch die vorgenannten Ionenkanäle wurde auch der Effekt eines Calciumeinstroms über die spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanäle auf die Myokardin-Translokation in das Zytoplasma untersucht, da dies eine klassische Reaktion glatter Gefäßmuskelzellen auf einen Deformationsreiz darstellt. Die durch KCl-Exposition (Depolarisation) hervorgerufene Aktivierung dieser Ionenkanäle führte bereits unter statischen Bedingungen zu einem Export von Myokardin aus dem Zellkern in den humanen kultivierten glatten Muskelzellen. KCl induziert durch die Depolarisation der Membran eine Öffnung von Calciumkanälen und damit einen langsamen Calciumeinstrom, wobei dieser intrazelluläre Calciumanstieg bzw. diese Calciumoszillationen zur glattmuskulären Kontraktion führen (Perez and Sanderson 2005, Perez and Sanderson 2005). Weitere Experimente zeigten jedoch, dass der Calciumeinstrom allein nicht Ursache für die Myokardin-Translokation sein kann. So hatte die Bindung des intrazellulären Calciums durch BAPTA keine Wirkung auf den Myokardin-Export nach zyklischer Dehnung (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus kam es auch nicht zur Blockade des KCl-induzierten Exports von Myokardin aus dem Zellkern nach Inhibition der ERK1/2-Aktivierung durch PD98059 (Daten nicht gezeigt), was für die Aktivierung eines alternativen Signalwegs zur Myokardin-Translokation spricht. Ein in diesem Zusammenhang interessanter Aspekt der Behandlung mit KCl ist dessen Wirkung auf die Aktivierung von HDACs. So fördert ein starker Calciumeinstrom die Aktivität von HDAC4 über die Stimulation der Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CamKII) (McKinsey and Kass 2007). Dies wurde an einer anderen Stelle durch die Stimulation und simultaner Inhibition der HDAC-Aktivität mithilfe der Kontraktilität glatter Muskelzellen der Atemwegen bzw. des Darms (Assem el, Peh et al. 2008) sowie in einem neuronalen Kontext (Akiba, Cave et al. 2010) gezeigt. Über diesen Weg könnte die stimulierende Wirkung der Depolarisation der glatten Gefäßmuskelzellen auf den Export von Myokardin aus dem Zellkern erklärt werden, der wie in dieser Arbeit gezeigt über das Zusammenspiel von HDAC4/5 und dem Chaperon 14-3-3 realisiert wird. Zudem würde dies auch erklären, warum die Hemmung der ERK1/2-Aktivierung keinen Effekt auf die Lokalisation von Myokardin bei KCl-Exposition hatte.

Bezüglich des Einflusses der MAP-Kinasen auf die transkriptionelle Funktionalität von Myokardin zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine dehnungsinduzierte Translokation von pERK1/2 in den Nukleus, die zur Phosphorylierung von Myokardin an einem Serinrest führt. Diesen Befund unterstützend identifizierten Taurin *et al.* insgesamt vier mögliche Phosphorylierungsstellen (S^{812} , S^{859} , S^{866} , Thr^{893}) in der Transaktivierungsdomäne (TAD) von Myokardin (Taurin, Sandbo et al. 2009). Die Myokardin-TAD liegt C-terminal und ist nicht an der Bildung des ternären Komplexes beteiligt. Daher ist sie frei zugänglich, wenn Myokardin an SRF und die CARG-Box gebunden ist

(Wang, Wang et al. 2003). Darüber hinaus zeigten Aplin *et al.*, dass die Translokation von pERK1/2 Integrin-vermittelt ist und zu einer Phosphorylierung von Elk1 führt (Aplin, Stewart et al. 2001). Zusammen mit eigenen Ergebnissen kann angenommen werden, dass ERK1/2 nach dessen Phosphorylierung im Zytosol zunächst Elk1 phosphoryliert, dann in den Nukleus importiert wird und dort Myokardin an einem der vorgestellten Serin-Reste phosphoryliert. Der Phosphat-Rest hat im Falle von Elk1 die Steigerung seiner Aktivität, den nukleären Import und damit Bindung an SRF zur Folge, während die Phosphorylierung von Myokardin zu dessen Dissoziation von SRF und Export aus dem Zellkern führt. Daher scheint die Modifikation von Elk1 und Myokardin durch ERK1/2 bzw. von einem ähnlichen Stimulus ausgelöst zu werden, aber nicht direkt abhängig voneinander zu sein (siehe 5.2).

Die Untersuchung weiterer potentieller Exportmechanismen für andere Mitglieder der Myokardinfamilie zeigt, dass MRTF-A/-B durch die Bindung an G-Aktin und die Aktivierung von RhoA in den Nukleus transportiert und auch wieder exportiert werden (Miralles, Posern et al. 2003, Lockman, Hinson et al. 2004, Hinson, Medlin et al. 2007). Durch die relativ hohe Affinität für G-Aktin kann MRTF-A schnell seine Lokalisation ändern. Wie bereits diskutiert, ist die Expression von MRTF-A und -B unabhängig von der Expression und Proteinsynthese von Myokardin. Darüber hinaus besteht auch keine Abhängigkeit in Bezug auf den Transportmechanismus bzw. den Stimulus für den nukleären Im- und Export zwischen MRTF-A und Myokardin. Das bedeutet, dass der nukleäre Export von Myokardin durch einen anderen Mechanismus reguliert sein muss als für MRTF-A. MRTF-A hat in der N-terminalen RPEL-Domäne eine G-Aktin-Bindestelle, die Myokardin nicht hat. Des Weiteren zeigen eigene Daten, dass der dehnungsabhängige Export von Myokardin nicht durch die pharmakologische Spaltung von G- und F-Aktin verhindert wird (Daten nicht gezeigt) bzw. die Inhibition von RhoA ebenfalls keinen Effekt auf die Lokalisation von Myokardin hat (Daten nicht gezeigt). Daher ist ein ähnlicher Exportmechanismus, wie der für MRTF-A bekannte, im Falle der dehnungsinduzierten Translokation von Myokardin wenig wahrscheinlich.

Prinzipiell wird der Proteintransport in und aus dem Nukleus hauptsächlich über zwei Mechanismen durchgeführt. Einerseits mit Hilfe einer *nuclear localisation sequence* (NLS) bzw. *nuclear export sequence* (NES). Über diese Lysin- oder Arginin-reiche (NLS) bzw. Leucin-reiche (NES) Domäne erfolgt die Bindung an das entsprechende β -Importin bzw. Transportin oder Exportin gebunden und über den bidirektionalen nukleären Porenkomplex/Nukleoporine transportiert. Der Molekültransport kann lediglich über diese Poren und nicht direkt durch die Doppellipidmembran des Nukleus erfolgen. Daher gelten die Porenkomplexe sozusagen als Kontrollinstanz des nukleären Molekülverkehrs (Pemberton and Paschal 2005, Nardozzi, Lott et al. 2010). Kleine Proteine bis zu 40 kDa können durch diese Poren diffundieren, größere müssen aktiv über nukleäre Transporter

importiert bzw. exportiert werden. Die so genannte Karyopherin-Familie besteht aus ca. 20 unterschiedlichen Importinen und Exportinen, die mit Hilfe der GTPase Ran und GTP Transportsignale erkennen, diese binden und die Translokation initiieren. Sie erkennen die NLS oder NES am Protein selbst oder an einem Adapterprotein (z.B. α -Importin), das den Transport vermittelt, wenn das zu transportierende Molekül selbst keine solchen Sequenzen aufweist.

Ein anderer Weg, ein Molekül für den Import bzw. Export zu markieren, ist die Phosphorylierung, die sowohl das Protein selbst als auch dessen Transportin aktivieren oder inhibieren kann. Durch den Phosphatrest wird die Bindung an die Karyopherine verstärkt, wobei dies nicht zwingend der Fall sein muss. Ein Beispiel hierfür ist ERK1/2, das eine *nuclear transport sequence* (NTS) – Serin-Prolin-Serin-Domäne - hat, die nach Serin-Phosphorylierung als Importsignal für das Importin β 7 dient (Moroianu and Blobel 1995, Fornerod, Ohno et al. 1997, Lange, Mills et al. 2007). Der post-translationalen Import von Myokardin in den Nukleus erfolgt wahrscheinlich über die Bindung der NLS an den heterodimeren Importin α 1/ β 1-Komplex (Nakamura, Hayashi et al. 2010). Während diese Interaktion im Falle von Myokardin G-Aktin-unabhängig ist, bindet der Importinkomplex an MRTF-A nur mit Hilfe von G-Aktin.

Der Proteinexport aus dem Zellkern wird unter anderem durch Exportin-1/CRM1 reguliert, was an eine NES bestehend aus einem Leucin-reichen Motiv mit einer Länge von ca. 15-20 Aminosäuren bindet (Monecke, Haselbach et al. 2013). Allerdings hatte die Inhibition von Exportin-1/CRM1 mit Hilfe von Leptomycin B keine Wirkung auf die Myokardin-Translokation in den kultivierten arteriellen glatten Muskelzellen nach zyklischer Dehnung bzw. in isolierten Segmenten der murinen Arteria femoralis nach Perfusion unter hypertensiven Bedingungen (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund deutet darauf hin, dass Myokardin nicht durch einen NES/Exportin-1-abhängigen Mechanismus aus dem Kern exportiert wird, der von der Präsenz einer NES abhängig ist, da es eine NLS aber keine NES hat (Wang, Wang et al. 2003). Der Vergleich der Exportmechanismen unter den Mitgliedern der Myokardin-Familie zeigt auch, dass Myokardin eine viel geringere Affinität zu CRM1 hat als MRTF-A (Hayashi and Morita 2013). Darüber hinaus zeigten Hayashi *et al.*, dass die Dissoziation von Myokardin vom SRF für die Bindung an das Exportmolekül CRM1 obligat ist (Hayashi and Morita 2013). Findet diese Loslösung vom ternären Komplex nicht statt, ist die Bindedomäne zum nukleären Export sterisch nicht zugänglich. Die bisher vorgestellten eigenen Daten unterfüttern die Hypothese, dass die zyklische Dehnung die Aktivierung von ERK1/2 und damit dessen NTS-vermittelten Import in den Nukleus fördert. Dort phosphoryliert pERK1/2 Myokardin an einem Serinrest der TAD; daraufhin wird Myokardin aus dem Zellkern exportiert. Scheinbar ist die Phosphorylierung von Myokardin auch

eine Grundvoraussetzung für seine Dissoziation von SRF, da keine Myokardin-CRM1-Interaktion bekannt ist, solange der SRF-Myokardin-Komplex intakt ist (Hayashi and Morita 2013).

Ein weiterer nukleärer Transportmechanismus basiert auf der Assoziation von Proteinen an die Mitglieder der Familie der Klasse II Histon Deacetylasen (HDACs), die sich aus den Mitgliedern 4, 5, 6, 7, 9 und 10 zusammensetzt. HDACs werden gewebespezifisch exprimiert, sie interagieren N-terminal mit Transkriptionsfaktoren oder Koaktivatoren und werden auch durch eine Serin-Phosphorylierung am N-Terminus aktiviert. Im aktivierten Zustand werden sie aus dem Nukleus exportiert und agieren durch den HDAC-vermittelten Export von Zielproteinen und damit als dessen Inhibitoren bzw. als sogenannte Korepressoren (Parra and Verdin 2010). Nach ihrer Phosphorylierung werden sie von 14-3-3 rekrutiert und aus dem Nukleus exportiert (Bacs, Song et al. 2006). Dieses Chaperon ist ein kleines Regulatorprotein (28-33 kDa), das nach der Assoziation die Konformation seiner Bindungspartner moduliert (Jagemann, Perez-Rivas et al. 2008, Obsilova, Silhan et al. 2008). Bacs *et al.* haben u. a. in COS-Zellen (renale Fibroblasten-Zelllinie) eine direkte Interaktion zwischen exogenem, d.h. viral transduziertem HDAC4 und 5, und endogen exprimiertem 14-3-3 nachgewiesen (Bacs, Song et al. 2006).

Vor diesem Hintergrund wurde die Bedeutung von HDACs und 14-3-3 für den dehnungsinduzierten Export von Myokardin aus dem Kern der glatten Gefäßmuskelzellen näher analysiert. Die Inhibition der HDACs, sowie auch der Einsatz eines 14-3-3 Antagonisten blockiert die nukleäre Translokation von Myokardin nach biomechanischer Dehnung. Diese Daten lassen den Rückschluss zu, dass phosphoryliertes Myokardin nicht an CRM1, sondern an einen Komplex bestehend aus HDACs und 14-3-3 bindet und so aus dem Kern exportiert wird. Die Inhibition der HDACs bzw. von 14-3-3 führte allerdings offenbar nicht zu einer Stabilisierung der Myokardin-Funktionalität, da die mRNA-Expression des Myokardin-Zielgens Calponin trotzdem dehnungsabhängig vermindert war. Dies lässt vermuten, dass durch die Inhibition des HDAC-vermittelten Exportmechanismus Myokardin nicht ins Zytoplasma transportiert wird und im Nukleus akkumuliert, aber nicht mehr als SRF-Kofaktor die Transkription der Zielgene initiiert. Vermutlich wird Myokardin - stimuliert durch die zyklische Dehnung - weiterhin durch pERK1/2 phosphoryliert, und dissoziiert dadurch von SRF, wobei es jedoch nicht exportiert wird, sondern wahrscheinlich im Kern akkumuliert. Jedoch muss diese Schlussfolgerung durch den Nachweis der Serin-Phosphorylierung unter Dehnung und Inhibition der HDACS bzw. 14-3-3 bewiesen werden.

Die eigenen Ergebnisse sind sehr gut mit der aktuellen Literatur vereinbar. So führt die Überexpression von HDAC4 und HDAC5 sowohl in der COS-Zelllinie als auch in 10T1/2-Zelllinie (ursprünglich Zellen aus murinen Embryonen) zur Verminderung der Expression Kontraktilität-

assoziierter Genprodukte (Cao, Wang et al. 2005, Cao, Wang et al. 2012). Ein direkter Einfluss der Klasse II HDACs auf die glattmuskuläre Differenzierung im Kontext von biomechanischem Stress war bislang jedoch unbekannt. Ferner wurde die Bedeutung dieser Enzyme für die Zelldifferenzierung vor allem im Rahmen kardialer Hypertrophie studiert. Da sich jedoch die Isoformen des glattmuskulären und herzmuskelzellenspezifischen Myokardin-Isoformen in der N-terminalen RPEL-Domäne unterscheiden, sind die Erkenntnisse hinsichtlich kardialer Pathologien nicht in Gänze auf dehnungsinduzierte vaskuläre Remodellierung übertragbar. Allerdings ergeben sich aus der Detailanalyse putativer Bindungsstellen im Myokardin-Molekül für z.B. HDACs Hinweise auf deren mögliche Interaktion. So hat Myokardin in den N-terminalen RPEL-Motiven eine Mef2 Bindesequenz (Mikhailov and Torrado 2012). Diese kann durch HDAC4 und HDAC5 erkannt und gebunden werden (Miska, Karlsson et al. 1999, Chan, Sun et al. 2003, Backs, Worst et al. 2011). Wobei dies auch darauf hindeuten kann, dass HDAC5 ebenfalls mit der Mef2-Bindestelle interagiert, die auch HDAC4 möglicherweise bedient. Des Weiteren erkennt HDAC5 neben dem Mef2-Bindungsmotiv auch das SRF-Bindungsmotiv, da Deletionsmutanten von Myokardin eine Interaktion mit HDAC5 zeigen, solange die SRF-Bindungsstelle vorhanden ist (Cao, Wang et al. 2005, McKinsey and Kass 2007). Dies könnte bedeuten, dass die möglichen Bindungsstellen im Myokardin-Molekül am N-Terminus mit der SRF-Bindungsstelle überlappen und daher die HDAC-Bindung eine Voraussetzung für die Dissoziation von Myokardin aus dem Komplex mit SRF in vaskulären SMCs darstellt (Cao, Wang et al. 2005). Cao *et al.* zeigten jedoch diesbezüglich, dass HDAC5 den ternären Komplex nicht destabilisiert bzw. die Expression von Myokardin-Zielgenen nicht aktiv inhibiert. Dies unterstützt die bereits vorgestellte Hypothese, dass Myokardin phosphoryliert werden muss, um von SRF-Komplex zu dissoziieren und erst dadurch überhaupt aus dem Zellkern exportiert werden kann. Wahrscheinlich ist, dass sowohl HDAC4 als auch HDAC5 als Homo- oder Heterodimer zusammen mit dem Chaperon 14-3-3 an phosphoryliertes, freies Myokardin im Nukleus binden und so dessen Export initiieren.

Im Hinblick auf die Relevanz dieses Mechanismus für pathophysiologische Prozesse zeigte die Analyse kardialer Pathologien eine Bedeutung der Aktivität von HDAC4/5 bei der Initiation der Myokardhypertrophie in Mäusen (Backs, Song et al. 2006) hingewiesen. Ähnlich zeigten Xing *et al.* eine Korrelation zwischen der adenoviralen Überexpression von Myokardin und der Initiation hypertrophen Wachstums in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte (Xing, Zhang et al. 2006). Interessanterweise führt die Überexpression von HDAC5 in den Kardiomyozyten zu einer Inhibition der Myokardin-abhängigen Hypertrophie (Xing, Zhang et al. 2006). Diese Fähigkeit von HDAC5 die Effekte von Myokardin zu konterkarieren, wurde auch in Untersuchungen mit Skelettmuskelzellen bestätigt (Long, Creemers et al. 2007). Aber auch auf die Entwicklung von Bluthochdruck haben

Klasse II HDACs offenbar Einfluss. So führte die Behandlung von hypertensiven Ratten (DOCA-Salz-Modell) mit einem HDAC-Inhibitor zum Ausbleiben der Hypertonie und zur Protektion vor endothelialer Dysfunktion. Darüber hinaus kommt es zur Blockade der kardialen Fibrose und einer verminderten kardialen Steifigkeit, da die Synthese von interstitiellem Kollagen-I verringert wird, was auf eine abgeschwächte Remodellierung der ECM hindeutet. (Iyer, Fenning et al. 2010).

5.4 Die Funktion von Myokardin in glatten Gefäßmuskelzellen

Die Anpassung des glattmuskulären Phänotyps bzw. der zumeist pathophysiologische Wechsel vom kontraktilem zum synthetischen glattmuskulären Phänotyp ist durch eine verminderte Expression von Genprodukten charakterisiert, welche die Kontraktionsfähigkeit der glatten Gefäßmuskelzellen gewährleisten wie z.B. SMA, Calponin, SM-MHC und SM-MLC (Chen, Kitchen et al. 2002, Wang, Wang et al. 2003). Darüber hinaus ist die Expression von Myokardin in diesen Zellen hinreichend, um den kontraktilem Phänotyp aufrechtzuerhalten (Long, Bell et al. 2008, Parmacek 2008). Im Gegensatz dazu hat die Inhibition der Myokardin-Funktion die Dedifferenzierung der glatten Muskelzellen zur Folge bzw. schwächt deren physiologische Funktion (Li, Wang et al. 2003, Huang, Cheng et al. 2008). Die embryonale Letalität (E10,5) in Myokardin-defizienten Mäusen basiert auf einer Fehlentwicklung des Blutgefäßsystems (Du, Ip et al. 2003, Li, Wang et al. 2003, Huang, Cheng et al. 2008). So ist der Dottersack beispielsweise nicht durchblutet. Die Kammern des Herzens sind bis E9,5 normal entwickelt, wobei die dorsale Aorta schon zu diesem Zeitpunkt retardiert erscheint. Die Kardinalvenen sind hingegen normal entwickelt. Das impliziert eine besondere Bedeutung von Myokardin für arterielle glatte Muskelzellen, was auch aus der relativ höheren Myokardin-Expression in arteriellen im Vergleich zu venösen glatten Muskelzellen abgeleitet werden kann (Daten nicht gezeigt). Obgleich die glatten Muskelzellen beider vaskulärer Entitäten in dieser Arbeit eine Reduktion der Myokardin-Expression nach zyklischer Dehnung zeigten, hatte ein Myokardin-Verlust unterschiedliche Effekte auf diese. So verhindert im 3-dimensionalen Sphäroidmodell bestehend aus human arteriellen glatten Muskelzellen die Inhibition von Myokardin die Invasion in ein Kollagen-I-Gel. In humanen venösen glatten Muskelzellen kam es dagegen zu einer vermehrten Bildung von glattmuskulären Protusionen aus dem Sphäroid (Daten nicht gezeigt). Eine unterschiedliche Regulation und Wirkmechanismus von Myokardin in Venen ist bisher aber unbekannt.

Interessanterweise zeigen weitere Arbeiten, dass SMA in glatten Gefäßmuskelzellen Myokardin-defizienter Mäuse vermindert exprimiert wird, während im Herzen die Expression der Myokardin-Zielgene ANF (*antidiuretic factor*) und SMA nicht reduziert ist (Li, Wang et al. 2003,

Huang, Cheng et al. 2008). Das weist auf die bereits erwähnte divergierende Regulation und Wirkungsweise von Myokardin im Herzen hin. Eigene funktionelle Untersuchungen belegen einen Einfluss von Myokardin auf die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen. Auch im Rahmen der *in vivo*-Modelle (Hypertension, Arteriogenese und Varikosis) war eine verminderte Expression und Proteinsynthese von Myokardin mit einer verstärkten Proliferation der glatten Muskelzellen in der Media und einer Zunahme der Gefäßwanddicke assoziiert. Diese Hypertrophie bzw. - in Abhängigkeit von Gefäßtyp und Größe - Hyperplasie der glatten Gefäßmuskelzellen ist ein typischer Marker Bluthochdruck-induzierter vaskulärer Remodellierungsprozesse (Unthank, Fath et al. 1996, Ward, Pasterkamp et al. 2000, Heil and Schaper 2004) und entscheidend für die kompensatorische Zunahme der Gefäßwanddicke. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass die Expression des Calcium-bindenden Proteins Calponin unter diesen Bedingungen grundsätzlich vermindert ist (siehe 5.1). Im Einklang damit wird in dieser Arbeit erstmalig auch eine verringerte Expression von Myokardin in der Media von Arterien aus hypertensiven Mäusen gezeigt. Diese Beobachtung ist auch vereinbar mit der zuvor erwähnten Bluthochdruck-induzierten Hypertrophie bzw. Hyperplasie der glatten Gefäßmuskelzellen. Long *et al.* haben in diesem Zusammenhang nachgewiesen, dass eine Überexpression von Myokardin zu einer Suppression des Cyclin D1 Promoters in vaskulären glatten Muskelzellen führt (Long, Bell et al. 2008). Darüber hinaus inhibiert Myokardin die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B/p65 in kardialen sowie glatten Muskelzellen (Tang, Zheng et al. 2008). Diese Daten lassen den Schluss zu, dass ein mit Bluthochdruck assoziierter Verlust von Myokardin die Disinhibition von Cyclin D1 sowie NF- κ B/p65 die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen fördert.

Zusammenfassend zeigen die funktionellen Daten, dass ein Verlust von Myokardin mit der Dedifferenzierung, d.h. Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen - einem klassischen Parameter für vaskuläre Remodellierungsprozesse einhergeht - und gleichzeitig wichtige Determinanten des ruhenden kontraktiven Phänotyps inhibiert. Im Umkehrschluss kann also angenommen werden, dass die Aufrechterhaltung der Funktion von Myokardin im Zellkern der glatten Muskelzellen in der Media die strukturelle Integrität und Kontraktilität dieser Muskelzellschicht maßgeblich stabilisiert.

5.5 Der Einfluss von Myokardin auf die Expression von miR143/145

Im Rahmen der Aufklärung vaskulärer und kardialer Remodellierungsprozesse rücken Mechanismen zur Regulation der mRNA-Stabilität durch microRNA (miRNA)-vermittelte post-transkriptionelle Modifikationen immer mehr in den wissenschaftlichen Fokus. Vor diesem Hintergrund wird vermutet, dass die Expression des miR143/145-Clusters genau wie Myokardin relevant für die glattmuskuläre Differenzierung bzw. auch im Zusammenhang maladaptiver Remodellierung

beschrieben ist. Die Analyse isoliert-perfundierter Mausarterien sowie humaner kultivierter glatter Gefäßmuskelzellen ergab jedoch keinen Hinweis darauf, dass eine Erhöhung der Wandspannung bzw. die zyklische Dehnung der Zellen die Expression dieser microRNAs beeinflusst. Eine direkte Regulation von Myokardin durch das Cluster unter gesteigerter Dehnung ist daher wenig wahrscheinlich. Jedoch zeigten weitere eigene Daten, dass es in Folge des Myokardin-Knockdowns zu einer Reduktion der miR145, nicht aber der miR143 kam. Daher scheint nicht miR143/145 Myokardin im Zuge vaskulärer Remodellierung nach erhöhter Wandspannung zu regulieren, sondern Myokardin die Expression von miR145 zu stimulieren. Jedoch ist bisher nichts darüber nicht bekannt, dass die beiden microRNAs, die auf demselben Gen lokalisiert sind und sich insofern eine gemeinsame Promoterregion teilen, unterschiedlich reguliert sind. Im Promoter dieses Gens sind SRF und Nkx2-5 Bindungsmotive zu finden, die beide durch Myokardin aktiviert werden können (Sun, Taurin et al. 2009). Cordes *et al.* zeigten, dass die SRF-Bindungsstelle für die Expression der miRNAs in der Aorta und dem Herzen wichtig ist sowie postnatal in glatten Gefäßmuskelzellen, während Nkx2-5 die Expression des microRNA-Clusters im Herzen reguliert (Boettger, Beetz et al. 2009, Cordes, Sheehy et al. 2009). Insofern gibt es zumindest theoretisch eine Regulationsmöglichkeit durch den Myokardin-SRF-Komplex und die verschiedenen Funktionen von Myokardin. Somit ist es möglich, dass Myokardin seine Funktionen im Rahmen der Zelldifferenzierung teilweise über dieses microRNA-Cluster realisiert. Gleichzeitig relativieren die Ergebnisse dieser Arbeit aber auch die in der Literatur verbreitete Annahme, das microRNA-Cluster habe eine übergeordnete regulative Schlüsselfunktion bei der Entwicklung des kardiovaskulären Systems.

Das gewebsspezifische Expressionsmuster des miR143/145-Clusters ist ähnlich dem von Myokardin: Die microRNAs werden beispielsweise nicht in den Kardinalvenen exprimiert. Im späteren Verlauf der Entwicklung ist die Expression auf Kardiomyozyten beschränkt, wobei postnatal miR143/145 wieder in glatten Muskelzellen der Aorta und der Koronararterien nachweisbar sind. Studien zur Funktion und Wirkung des microRNA-Clusters liefern teilweise kontroverse Ergebnisse. Induzierbare transgene Tiere, die entweder miR143-, miR145- oder miR143/145-defizient sind, zeigen initial keine offensichtlichen auffälligen Phänotyp während der kardialen Embryonalentwicklung (Xin, Small et al. 2009). Die glattmuskuläre Schicht der Aorta und Arterien von miR145-defizienten bzw. miR143/145-defizienten Mäusen sind jedoch dünner im Vergleich zu Wildtyptieren. Zudem ist in diesen Knockoutmäusen die Anzahl der Stressfasern in den vaskulären glatten Muskelzellen signifikant reduziert. Die Analyse dieser Mäuse zeigt eine arterielle Hypotonie und eine geringere ventrikuläre Masse, die wahrscheinlich auf die geringere Nachlast zurückzuführen ist und damit keine Ursache des Knockouts, sondern eine Konsequenz des niedrigen systemischen Blutdrucks ist. Generell zeigen die miR143/145-defizienten Mäuse einen geringeren myogenen Tonus bzw. abgeschwächte

myogene Antwort bzw. Kontraktion nach Stimulation mit Phenylephrin oder Angiotensin II (Boettger, Beetz et al. 2009). Auch die Ausprägung der Angiotensin II-induzierten Hypertonie ist in diesem transgenen Mausmodell milder. Diese Daten von Xin *et al.* und Boettger *et al.* führten zu der Annahme, dass die Funktionsfähigkeit des kontraktilen Apparates der transgenen Tiere beeinträchtigt ist.

Die Analyse von Modellen kardiovaskulärer Remodellierung zeigte ähnliche Ergebnisse: Die Ligation der linken Arteria carotis communis in miR145-/- -defizienten Mäusen zeigt nahezu keine Neointimaformation. Dieser Effekt ist in den Doppelknockoutmäusen eher schwächer ausgeprägt (Xin, Small et al. 2009) in den verletzten Gefäßen, jedoch nicht so eindrucksvoll wie die der miR145-defizienten Tieren. Ein anderes Modell der vaskulären Remodellierung – die Ballon-induzierte Dilatation der A. carotis - führt zu einer Reduktion in der Expression von miR145, Calponin, SM-MHC und SMA in den glatten Muskelzellen (Cheng, Liu et al. 2009). Diese Daten unterstützen eher die Theorie, dass Myokardin die Expression von miR145 nicht aber miR143 reguliert, da die genannten Genprodukte allesamt Zielgene von Myokardin sind, dessen Expression in diesem tierexperimentellen Modell ebenfalls reduziert war (siehe 5.1). Dagegen führt die glattmuskelzellspezifische Überexpression von miR145 in ApoE-defizienten Mäusen zu einer Reduktion der Plaquegröße in der Aorta bzw. anderen Arteriosklerose-anfälligen Arterien (Lovren, Pan et al. 2012). Interessanterweise kommt es in diesem transgenen Tiermodell auch zu einem Anstieg des Kollagen-I- und Kollagen-III-Gehaltes in den Plaques sowie zu einer vermehrten Calponin-, SMA- und Myokardin- bzw. einer verringerten KLF4-Expression. Diese Beobachtung erzeugt im Gegensatz zu den zuvor diskutierten Befunden den Eindruck, Myokardin könnte indirekt durch die Expression von miR145 beeinflusst sein. Die von Lovren *et al.* beobachteten Effekte stehen allerdings im Gegensatz zur bisher vorgestellten Theorie, Myokardin reguliere miRNA145. Diese wird jedoch durch die Arbeiten von Cordes *et al.* bestätigt, die eine sog. verstärkende Transmitterfunktion von miR145 auf der Wirkung von Myokardin postulierten (Cordes, Sheehy et al. 2009): Kontrolliert miR145 also doch die Expression von Myokardin? Zu dieser These passen Befunde, dass die Antagomir-gestützte (Cholesterol-modifizierte *antisense* Oligonukleotide) Hemmung von miR145 in glatten Gefäßmuskelzellen die - durch Überexpression von Myokardin induzierte - Expression von SMA blockiert (Cordes, Sheehy et al. 2009). Dagegen stimuliert die Antagomir-gestützte Hemmung von miR143 die Synthese von Elk1. Auf Grundlage dieser Daten postulierten Cordes *et al.*, dass Myokardin die Expression des miR143/145-Clusters stimuliert und ein positives Feedback auslöst über die miR145 die Expression von KLF4 inhibiert, das selbst wiederum die Expression von Myokardin hemmt, während miR143 die Elk1-Expression blockiert. Das Ergebnis wäre eine

Stabilisierung des kontraktiven glattmuskulären Phänotyps durch Aufrechterhaltung der Expression von Myokardin und gleichzeitige Unterdrückung der von Elk1 (Davis-Dusenbery, Wu et al. 2011).

Jedoch sind die vorgenannten Beobachtungen auch durch einen anderen Signalweg durch Xin *et al.* erklärbar (Xin, Small et al. 2009). So zeigten Ergebnisse im Rahmen einer Untersuchung zur der Validierung theoretischer miR143/145-Zielsequenzen in vaskulären SMCs: Die Überexpression von miR143 bzw. miR145 in diesen Zellen führte zu einer Reduktion der Expression von KLF-4 und -5 sowie von MRTF-A und -B, nicht jedoch von Myokardin. MRTF-A selbst stabilisiert als ternärer Komplex mit SRF ebenfalls die Expression von SMA oder SM-MHC in glatten Gefäßmuskelzellen (Miralles, Posern et al. 2003, Mikhailov and Torrado 2012) und könnte daher als Zielsequenz der miRNA diese Funktion nicht mehr ausüben. Unterstützend zeigt die eigene Überprüfung möglicher Ziel-mRNA-Sequenzen von miR145 mit Hilfe einer microRNA-Datenbank (Quelle: miRTarBase) eine validierte Bindestelle für KLF4-mRNA-Sequenz, nicht aber für die Myokardin-mRNA an (Daten nicht gezeigt). Für die miR143 bestätigte sich deren Homologie zu dem Primärtranskript des Elk1-Gens.

Schlussfolgernd aus den eigenen Daten und der Analyse bereits publizierter Ergebnisse, lässt sich schließen, dass das miR143/145-Cluster eine Rolle in der vaskulären Reorganisation nach einer Verletzung der Arterienwand spielt, die aber nicht notwendigerweise mit der Regulation der Expression bzw. Funktion von Myokardin assoziiert sein müssen. Dies gilt insbesondere für Hypertonie-induzierte arterielle Remodellierungsprozesse, wobei die in dieser Arbeit gewonnenen *in vitro*-Daten noch in einem geeigneten *in vivo*-Modell verifiziert werden sollten.

5.6 Regulation des proteasomalen Abbaus von Myokardin

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist eine regulative Instanz der Zusammensetzung des Proteoms innerhalb einer Zelle. Zum einen erkennt das UPS fehlerhaft gefaltete oder geschädigte Proteine und leitet deren Abbau ein (Calise and Powell 2013). Darüber hinaus reguliert es die Aktivität von Signalkaskaden, die beispielsweise die Proliferation, Stressantwort, Apoptose oder Zellgröße modulieren (Clague and Urbe 2010, Gallastegui and Groll 2010). Während der Entwicklungsphase reguliert das UPS den Umsatz von Transkriptionsfaktoren, Rezeptoren oder Strukturproteinen. Das UPS erkennt ein zur Degradation-bestimmtes Protein an der Markierung durch eine Polyubiquitinkette (Willis, Townley-Tilson et al. 2010). Zudem spielt das UPS im Kontext der kardialen Hypertrophie eine wichtige Rolle. Patienten mit linksventrikulärer Hypertrophie (Depre, Wang et al. 2006, Dickhout and Austin 2006), Herzversagen (Wang and Robbins 2006) oder einer Aortenklappenstenose zeigen eine erhöhte Aktivität des Proteasoms bzw. eine vermehrte Ubiquitinierung verschiedener Proteine. Auch in Tiermodellen einer Linksherzhypertrophie nimmt die proteasomale Aktivität deutlich zu. Im Umkehrschluss kann durch die Inhibition des

26S-Proteasoms während der Etablierung der Hypertrophie, z.B. durch Lactazystin oder Bortezomib, die Ausprägung dieses maladaptiven Herzphänotyps verhindert bzw. rückgängig gemacht werden. Dies zeigt sich u. a. an einer weitgehenden Normalisierung des Herz-Körpergewicht-Verhältnisses (Drews, Tsukamoto et al. 2010, Hedhli and DePre 2010, Kloss, Meiners et al. 2010). Auch die physiologische adaptive Vergrößerung der Ventrikel durch Ausdauertraining, wie beispielsweise bei Athleten, kann z.B. durch die Applikation von Epoxomicin oder Bortezomib reduziert werden (Hedhli, Lizano et al. 2008, Hedhli, Wang et al. 2008). Die genannten Inhibitoren adressieren verschiedene Untereinheiten des Proteasoms und können somit unterschiedlichen kardialen Pathologien entgegenwirken (Dahlmann 2007). Ein Beispiel hierfür ist Bortezomib, das bisher in der Krebstherapie eingesetzt wird (Kuhn, Orłowski et al. 2011), da es antiproliferative und pro-apoptische Effekte auf Tumorzellen hat (Bedford, Lowe et al. 2011). Neben dem Einsatz der Inhibitoren in der Behandlung kardialer Pathologien, wurden auch Erfolge bei der Therapie pathophysiologischer vaskulärer Remodellierung in Ratten erzielt (Meiners, Laule et al. 2002). So zeigt der Einsatz von Bortezomib eine verminderte Neointimabildung nach Ballon-induzierter Dilatation in der Arteria carotis durch die Inhibition der Proliferation glatten Gefäßmuskelzellen in der Neointima.

Die Ubiquitinierung von Proteinen erfolgt über die E1-E3-Ligasen, Enzyme, die eine spezifische Affinität für bestimmte Proteinklassen haben und somit deren Aktivierungsgrad, Lokalisation oder Degradation bestimmen (Demasi and Laurindo 2012). Im Laufe der zellulären Entwicklung spielt das UPS offenbar eine entscheidende Rolle bei der Koordination des Zellwachstums und der Differenzierung. Die Ubiquitin Ligase *C-terminus of Hsc70-interacting protein* (CHIP) reguliert diese beiden Prozesse durch die Initiation der proteasomalen Degradation. Hierbei ist u. a. Myokardin ein Zielprotein von CHIP in Rahmen der Entwicklung glatter Gefäßmuskelzellen (Xie, Fan et al. 2009). Xie *et al.* zeigen, dass die adenovirale Überexpression von CHIP zu einer Reduktion der mRNA-Expression der Myokardin-Zielgene, wie SM22 α , SMA oder SM-MHC, führt, wohingegen die Myokardin-spezifische mRNA selbst unverändert bleibt. Ungeklärt ist dabei, ob oder wie CHIP, das im Zytoplasma lokalisiert ist, die Funktionalität des nukleär lokalisierten Kofaktors Myokardin reguliert bzw. dessen Dissoziation vom SRF initiiert.

Eigene Daten zeigten in diesem Kontext eine vermehrte CHIP-Proteinsynthese nach biomechanischer Dehnung der glatten Gefäßmuskelzellen, nicht aber eine Translokation in den Zellkern. Xie *et al.* haben auch eine Ubiquitinierung von phosphoryliertem Myokardin durch CHIP beschrieben (Xie, Fan et al. 2009). Dies würde in Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit nahelegen, dass das infolge der zyklischen Dehnung aus dem Zellkern exportierte, phosphorylierte Myokardin von CHIP

erkannt, polyubiquitiniert und damit für den Abbau durch das 26S-Proteasom der glatten Gefäßmuskelzelle markiert wird. In Übereinstimmung damit wurde die Ubiquitinierung und Degradation von Myokardin im Zytoplasma vaskulärer glatter Muskelzellen kürzlich auch von einer anderen Arbeitsgruppe berichtet (Kiyon, Limbourg et al. 2012). Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten diesbezüglich, dass die Inhibition des Proteasoms durch Bortezomib zu einer Akkumulation von Myokardin im Zytoplasma der glatten Gefäßmuskelzellen sowohl unter statischen Bedingungen als auch nach zyklischer Dehnung führt. Die Dehnung vaskulärer SMCs führt zudem zu einer verstärkten allgemeinen Ubiquitinierung (Daten nicht gezeigt). Die Verhinderung des Abbaus von Myokardin hatte jedoch keinen Einfluss auf dessen Wirkung im Zellkern, da die Expression von Myokardin-Zielgenen wie Calponin trotz der Proteasomhemmung bei zyklischer Dehnung unvermindert herunterreguliert wurden. Auch wenn dies durch die Verhinderung der CHIP-Expression in den glatten Gefäßmuskelzellen noch gezeigt werden muss, so scheint dennoch die erhöhte Wandspannung zu einer vermehrten Synthese von CHIP zu führen, was zur Folge hat, dass Myokardin verstärkt ubiquitiniert und dadurch dessen Abbau durch das Proteasom beschleunigt. Dies dürfte auch der Grund dafür sein, dass in den glatten Muskelzellen der Media in den *in vivo*-Modellen nach Erhöhung des intravasalen Drucks die Proteinsynthese von Myokardin grundsätzlich reduziert war.

5.7 Ausblick

Die Untersuchung von Myokardin, eines Koaktivators des Transkriptionsfaktors SRF, zeigt, dass die biomechanische Deformation glatter Gefäßmuskelzellen ausreichend ist, um dessen nukleären Export und Degradation im Zytoplasma zu initiieren. Diese Beobachtung wurde *in vitro* mit Hilfe kultivierter vaskulärer SMCs und isoliert perfundierten Mäuserarterien verifiziert. Darüber hinaus wurden diese Beobachtungen mit Hilfe tierexperimenteller Modelle bestätigt, die trotz der ihnen gemeinsamen Erhöhung der Wandspannung deutlich verschiedene vaskuläre Remodellierungsprozesse initiieren: Arteriogenese (*outward remodeling*), Hypertonie-induzierte arterielle Remodellierung (*inward remodeling*) und Varikosis (venöse Remodellierung). Der Export von Myokardin aus dem Nukleus wird dabei durch eine pERK1/2-abhängige Phosphorylierung an einem Serinrest von Myokardin realisiert und führt zu dessen Dissoziation vom SRF-Komplex. Das phosphorylierte Myokardin wird durch die Bindung an HDAC4/5 und das Chaperon 14-3-3 aus dem Nukleus transportiert, im Zytoplasma durch die E3-Ligase CHIP ubiquitiniert und anschließend durch das 26S-Proteasom abgebaut.

Dieser vorgestellte Mechanismus, der durch einen Anstieg der Wandspannung/Dehnung initiiert wird, führt zur verminderten Expression von Genprodukten wie Calponin oder SMA, die die Kontraktilität

der glatten Gefäßmuskelzellen regulieren. Diese und deren Expression sind demzufolge ein Charakteristikum für den ruhenden kontraktile Phänotyp dieser Zellen in der Gefäßwand. Die Verringerung ihrer Expression führt folgerichtig zu einer Änderung des glattmuskulären Phänotyps von kontraktile zu synthetisch. Dieser dedifferenzierte und aktivierte Phänotyp gilt wiederum als Voraussetzung für den Beginn vaskulärer Remodellierungsprozesse.

Insofern zeigen diese Ergebnisse möglicherweise einen neuen und bislang unbekanntem Weg auf, um gezielt mit maladaptiven Umbauprozessen in der Gefäßwand bzw. im Herzen zu interferieren. Dazu muss der Regulations- und Wirkmechanismus von Myokardin im Herzen allerdings noch genauer untersucht werden, zumal die Rolle von Myokardin in Kardiomyozyten von der in glatten Gefäßmuskelzellen abzuweichen scheint. Eine konkrete Möglichkeit zur Nutzung dieses in den glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesenen Mechanismus ergäbe sich möglicherweise bei der Behandlung der sogenannten In-Stent-Restenose durch die Verwendung von *drug-eluting stents* (Kiyon, Limbourg et al. 2012), die Substanzen freisetzen, welche die Dissoziation von Myokardin und SRF sowie den Export von Myokardin aus dem Zellkern inhibieren. Ein Beispiel für eine solche Substanz ist Vinpocetine (Cai, Knight et al. 2012). Vinpocetine inhibiert die ERK1/2-Aktivität, die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen sowie die Neointimabildung. Daher ist es wahrscheinlich, dass es durch die lokale Applikation von Vinpocetine zu einer Stabilisierung des Myokardin-SRF-Komplexes und damit zur Aufrechterhaltung des kontraktile Phänotyps der glatten Gefäßmuskelzellen. Für die schädliche Bluthochdruck-bedingte Umstrukturierung der arteriellen Gefäßwand bzw. die variköse Remodellierung von Venen müsste man sich allerdings ein anderes Therapiekonzept einfallen lassen, das systemisch wirkt ohne unerwünschte Nebenwirkungen zu erzeugen. Das ist sicher schwierig aber spannend und in jedem Fall ein lohnendes Ziel.

6 Danksagung/ Acknowledgments/ Save the best for last

Nach diesen vielen Worten über Myokardin, möchte ich nun ein paar der wichtigsten niederschreiben, welche eine wahnsinnig großartige und spannende Zeit für mich zusammenfassen werden und mich nun bei all den fantastischen Menschen bedanken, die mich in dieser Phase meines Lebens begleiten durften.

Zu allererst steht hier an dieser Stelle natürlich Herr Prof. Dr. Markus Hecker. Ich danke Ihnen sehr für die Möglichkeit in Ihrer Abteilung arbeiten zu dürfen. Ich danke Ihnen für alle konspirativen Gespräche und dass Sie mich an Ihrem nahezu unermesslichen Wissen teilhaben ließen und vielleicht noch lassen werden. Es ist schön für einen Chef zu arbeiten, der stets versucht im Sinne seiner fleißigen Forscher zu handeln.

Dann nicht minder wichtig und nicht weniger von Herzen möchte ich Prof. Dr. Thomas Korff nennen. Ich bin sehr dankbar, dass mich meine Wege und meine Suche nach einer geeigneten Promotionsstelle nach Heidelberg und in Dein Büro führten. Ich hatte gleich ein gutes Bauchgefühl und - wie in der Wissenschaft - ist eine gute Intuition auch bei privaten Entscheidungen ausschlaggebend. Ich danke Dir für Deine gute Menschenkenntnis und Deinen hohen EQ, der es Dir ermöglicht sehr individuell auf Deine helfenden Hände einzugehen und uns den bestmöglichen Weg für unsere Entwicklung einschlagen zu können. Es macht riesigen Spaß für und mit einem so enthusiastischen, neugierigen und auch exzellenten Physiologen zu arbeiten.

Dann möchte mich bei Prof. Dr. Thomas Wieland, Prof. Dr. Kerry Tucker und Prof. Dr. Matthias Mayer für die Bereitschaft als meine Gutachter zu fungieren, bedanken. Ich danke Ihnen für Ihre Zeit und Ihre Motivation sich mit meiner Arbeit auseinanderzusetzen und freue mich auf eine spannende Prüfung.

Die sogenannte AG Hecker birgt natürlich noch weitere großartige Kollegen, die mir den Alltag nicht nur durch ihre unerschütterliche Expertise, sondern auch durch ihr sonniges Gemüt versüßten. Sie halfen mir stets technische Probleme zu lösen und Methoden zu verfeinern. Nie hielten sie „alte Tricks“ zurück und zögerten nicht mitzudenken, aufmerksam durchs Labor zu gehen und wenn nötig einzugreifen. Gudrun Scheib, Maria Harlacher und Anita Kühnert sind drei hervorragende Mitarbeiterinnen, die ich jeden Tag zu schätzen wusste und auch heute nicht missen möchte. Ender Serbest ist nicht nur ein sehr präziser und einer der engagiertesten Kollegen, die ich je traf - er ist auch ein wahnsinnig lieber und großzügiger Mann. Dann seien da natürlich noch Yvonne Haag & Co., Manuela Höfer, Renate Cattaruzza, Marie Bartenschläger und vor allem Mathilde -Tilly- Lorenz, die eine grandiose Art hat das Leben wahrzunehmen, erwähnt. In der Doktorandenschar des 4. Stockes

findet man noch folgende großartigen und emsigen Beinpaare: Maren Hödebeck, Synje Wieber, Hui Liu, Subhajit Gosh, Jennifer Koffler, Franziska Koser, Clemens Scherer, Dr. Anja Feldner, Dr. Jennifer Braun, Dr. Kerstin Möller, Dr. Sahana Suresh-Babu, die liebe Dr. Cordula Rumig und den ruhigen, bedachten aber schalkigen Dr. Hannes Schröder. Danke für Eure Zusammenarbeit!

Es ist mir gegönnt eine Handvoll toller Menschen in meinem Leben zu haben- und ein paar davon habe ich auch hier treffen dürfen. Die wunderschöne Franziska Mohr und die grandiose Caroline Arnold. Ihr seid spitze! Ich hoffe ich behalte Euch noch ein bisschen länger und danke Euch für Eure Offenheit, Ehrlichkeit, Euren Humor und Eure Freundschaft. Ich möchte mich natürlich auch ganz herzlich bei Christopher Hett bedanken, der natürlich hier nicht fehlen darf/möchte.

Darüber hinaus, möchte ich Caroline Prell, Marco Graša, Mirjam Hitzler und Aldemar Dünkel nennen und ihnen meinen Dank aussprechen. Diese gesegneten und wunderbar liebenden Menschen sind mir ein wesentlicher Bestandteil meines Lebens, auf den ich nicht mehr verzichten möchte. Sie treiben mich an, wenn ich nicht weiß wo das Gaspedal ist und sie bremsen mich, wenn ich vergesse inne zu halten. Es gibt immer etwas zu lachen, zu weinen, zu begießen und zu bekochen- und für alle Lebenslagen seien diese Menschen zu empfehlen. Ein weiterer besonderer Mensch in meinem Leben, dessen gesonderter Erwähnung ich nicht vergessen möchte, ist Shelly. Diese komplizierte und herausfordernde Persönlichkeit bringt mich in vielerlei Hinsicht an meine Grenzen und darüber hinaus. Dafür schätze ich Dich sehr. Ich danke Dir für Deine Authentizität und unverhohlene Ehrlichkeit, das macht es mir leicht mich wohlfühlen. Ich kann mich Dir von meiner lieben und auch von meiner weniger lebenswerten Seite zeigen ohne nicht ernst genommen zu werden. Ich danke Dir für Deine Unterstützung in den letzten Jahren und gerade in der letzten Zeit, die wirrer, lustiger, berührender und aufregender nicht hätte sein können. Danke, dass Du mich die vergangenen Wochen/Monate versucht hast zu (er)tragen.

Ich danke vor allem meiner Familie für Ihren Rückhalt und ihr Interesse an meiner Arbeit. Es macht mich wehmütig, dass der größte Teil meiner lieben Großeltern diesen Abschnitt meines Lebens nicht mehr mit mir feiern können, aber ich weiß um unsere Verbundenheit. Ich danke meinen lieben Eltern und ihren tollen und gutaussehenden Partnern sowie meiner kleinen, frechen und bald erwachsenen Schwester Emily für die Liebe und die Unterstützung, die ich erfahren darf. Ich habe Euch lieb- und zwar wie die Pest.

So, *to make a long story short*, um Prof. Hecker zu zitieren oder wie mein Papa gerne sagt: ‚Lange Rede, gar kein Sinn‘: Wahnsinns coole Zeit. Und Forschung ist schlicht ne prima Sache. Just awesomely awesome.

7 Literaturangaben

Adelow, C., T. Segura, J. A. Hubbell and P. Frey (2008). "The effect of enzymatically degradable poly(ethylene glycol) hydrogels on smooth muscle cell phenotype." Biomaterials **29**(3): 314-326.

Aitsebaomo, J., A. L. Portbury, J. C. Schisler and C. Patterson (2008). "Brothers and sisters: molecular insights into arterial-venous heterogeneity." Circ Res **103**(9): 929-939.

Akiba, Y., J. W. Cave, N. Akiba, B. Langley, R. R. Ratan and H. Baker (2010). "Histone deacetylase inhibitors de-repress tyrosine hydroxylase expression in the olfactory bulb and rostral migratory stream." Biochem Biophys Res Commun **393**(4): 673-677.

Allahverdian, S., P. S. Pannu and G. A. Francis (2012). "Contribution of monocyte-derived macrophages and smooth muscle cells to arterial foam cell formation." Cardiovasc Res **95**(2): 165-172.

Althoff, T. F., J. A. Juarez, K. Troidl, C. Tang, S. Wang, A. Wirth, M. Takefuji, N. Wettschureck and S. Offermanns (2012). "Procontractile G protein-mediated signaling pathways antagonistically regulate smooth muscle differentiation in vascular remodeling." J Exp Med **209**(12): 2277-2290.

Alvarez Arroyo, M. V., C. Caramelo, M. Angeles Castilla, F. R. Gonzalez Pacheco, O. Martin and J. Arias (1998). "Role of vascular endothelial growth factor in the response to vessel injury." Kidney Int Suppl **68**: S7-9.

Anwar, M. A., J. Shalhoub, C. S. Lim, M. S. Gohel and A. H. Davies (2012). "The effect of pressure-induced mechanical stretch on vascular wall differential gene expression." J Vasc Res **49**(6): 463-478.

Aplin, A. E., S. A. Stewart, R. K. Assoian and R. L. Juliano (2001). "Integrin-mediated adhesion regulates ERK nuclear translocation and phosphorylation of Elk-1." J Cell Biol **153**(2): 273-282.

Arribas, S. M., C. Gonzalez, D. Graham, A. F. Dominiczak and J. C. McGrath (1997). "Cellular changes induced by chronic nitric oxide inhibition in intact rat basilar arteries revealed by confocal microscopy." J Hypertens **15**(12 Pt 2): 1685-1693.

Arribas, S. M., C. Hillier, C. Gonzalez, S. McGrory, A. F. Dominiczak and J. C. McGrath (1997). "Cellular aspects of vascular remodeling in hypertension revealed by confocal microscopy." Hypertension **30**(6): 1455-1464.

Arribas, S. M., A. Hinek and M. C. Gonzalez (2006). "Elastic fibres and vascular structure in hypertension." Pharmacol Ther **111**(3): 771-791.

Assem el, S. K., K. H. Peh, B. Y. Wan, B. J. Middleton, J. Dines and C. M. Marson (2008). "Effects of a selection of histone deacetylase inhibitors on mast cell activation and airway and colonic smooth muscle contraction." Int Immunopharmacol **8**(13-14): 1793-1801.

Atta, H. M. (2012). "Varicose veins: role of mechanotransduction of venous hypertension." Int J Vasc Med **2012**: 538627.

Backs, J., K. Song, S. Bezprozvannaya, S. Chang and E. N. Olson (2006). "CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy." J Clin Invest **116**(7): 1853-1864.

- Backs, J., B. C. Worst, L. H. Lehmann, D. M. Patrick, Z. Jebessa, M. M. Kreusser, Q. Sun, L. Chen, C. Heft, H. A. Katus and E. N. Olson (2011). "Selective repression of MEF2 activity by PKA-dependent proteolysis of HDAC4." J Cell Biol **195**(3): 403-415.
- Beamish, J. A., P. He, K. Kottke-Marchant and R. E. Marchant (2010). "Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering." Tissue Eng Part B Rev **16**(5): 467-491.
- Becker, C., A. Hammerle-Fickinger, I. Riedmaier and M. W. Pfaffl (2010). "mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis." Methods **50**(4): 237-243.
- Bedford, L., J. Lowe, L. R. Dick, R. J. Mayer and J. E. Brownell (2011). "Ubiquitin-like protein conjugation and the ubiquitin-proteasome system as drug targets." Nat Rev Drug Discov **10**(1): 29-46.
- Beech, D. J., K. Muraki and R. Flemming (2004). "Non-selective cationic channels of smooth muscle and the mammalian homologues of Drosophila TRP." J Physiol **559**(Pt 3): 685-706.
- Birukov, K. G. (2009). "Cyclic stretch, reactive oxygen species, and vascular remodeling." Antioxid Redox Signal **11**(7): 1651-1667.
- Birukov, K. G., N. Bardy, S. Lehoux, R. Merval, V. P. Shirinsky and A. Tedgui (1998). "Intraluminal pressure is essential for the maintenance of smooth muscle caldesmon and filamin content in aortic organ culture." Arterioscler Thromb Vasc Biol **18**(6): 922-927.
- Boettger, T., N. Beetz, S. Kostin, J. Schneider, M. Kruger, L. Hein and T. Braun (2009). "Acquisition of the contractile phenotype by murine arterial smooth muscle cells depends on the Mir143/145 gene cluster." J Clin Invest **119**(9): 2634-2647.
- Borlaug, B. A. and M. M. Redfield (2011). "Diastolic and systolic heart failure are distinct phenotypes within the heart failure spectrum." Circulation **123**(18): 2006-2013; discussion 2014.
- Bourne, G. W. and J. M. Trifaro (1982). "The gadolinium ion: a potent blocker of calcium channels and catecholamine release from cultured chromaffin cells." Neuroscience **7**(7): 1615-1622.
- Bund, S. J. and R. M. Lee (2003). "Arterial structural changes in hypertension: a consideration of methodology, terminology and functional consequence." J Vasc Res **40**(6): 547-557.
- Bund, S. J. and R. M. Lee (2003). "The vascular amplifier and persisting resisters." J Hypertens **21**(3): 643-646; author reply 646.
- Cai, Y., W. E. Knight, S. Guo, J. D. Li, P. A. Knight and C. Yan (2012). "Vinpocetine suppresses pathological vascular remodeling by inhibiting vascular smooth muscle cell proliferation and migration." J Pharmacol Exp Ther **343**(2): 479-488.
- Calise, J. and S. R. Powell (2013). "The ubiquitin proteasome system and myocardial ischemia." Am J Physiol Heart Circ Physiol **304**(3): H337-349.
- Callam, M. J. (1994). "Epidemiology of varicose veins." Br J Surg **81**(2): 167-173.
- Cao, D., C. Wang, R. Tang, H. Chen, Z. Zhang, M. Tatsuguchi and D. Z. Wang (2012). "Acetylation of myocardin is required for the activation of cardiac and smooth muscle genes." J Biol Chem **287**(46): 38495-38504.

Cao, D., Z. Wang, C. L. Zhang, J. Oh, W. Xing, S. Li, J. A. Richardson, D. Z. Wang and E. N. Olson (2005). "Modulation of smooth muscle gene expression by association of histone acetyltransferases and deacetylases with myocardin." Mol Cell Biol **25**(1): 364-376.

Carlson, B. E., J. C. Arciero and T. W. Secomb (2008). "Theoretical model of blood flow autoregulation: roles of myogenic, shear-dependent, and metabolic responses." Am J Physiol Heart Circ Physiol **295**(4): H1572-1579.

Carmeliet, P., Y. S. Ng, D. Nuyens, G. Theilmeier, K. Brusselmans, I. Cornelissen, E. Ehler, V. V. Kakkar, I. Stalmans, V. Mattot, J. C. Perriard, M. Dewerchin, W. Flameng, A. Nagy, F. Lupu, L. Moons, D. Collen, P. A. D'Amore and D. T. Shima (1999). "Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188." Nat Med **5**(5): 495-502.

Carmichael, J. D., S. J. Winder, M. P. Walsh and G. J. Kargacin (1994). "Calponin and smooth muscle regulation." Can J Physiol Pharmacol **72**(11): 1415-1419.

Cattaruzza, M., N. Nogoy, A. Wojtowicz and M. Hecker (2012). "Zinc finger motif-1 antagonizes PDGF-BB-induced growth and dedifferentiation of vascular smooth muscle cells." FASEB J **26**(12): 4864-4875.

Celletti, F. L., J. M. Waugh, P. G. Amabile, A. Brendolan, P. R. Hilfiker and M. D. Dake (2001). "Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression." Nat Med **7**(4): 425-429.

Chan, J. K., L. Sun, X. J. Yang, G. Zhu and Z. Wu (2003). "Functional characterization of an amino-terminal region of HDAC4 that possesses MEF2 binding and transcriptional repressive activity." J Biol Chem **278**(26): 23515-23521.

Chang, S., B. D. Young, S. Li, X. Qi, J. A. Richardson and E. N. Olson (2006). "Histone deacetylase 7 maintains vascular integrity by repressing matrix metalloproteinase 10." Cell **126**(2): 321-334.

Chao, J. T. and M. J. Davis (2011). "The roles of integrins in mediating the effects of mechanical force and growth factors on blood vessels in hypertension." Curr Hypertens Rep **13**(6): 421-429.

Chen, J., C. M. Kitchen, J. W. Streb and J. M. Miano (2002). "Myocardin: a component of a molecular switch for smooth muscle differentiation." J Mol Cell Cardiol **34**(10): 1345-1356.

Cheng, Y., X. Liu, J. Yang, Y. Lin, D. Z. Xu, Q. Lu, E. A. Deitch, Y. Huo, E. S. Delphin and C. Zhang (2009). "MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation." Circ Res **105**(2): 158-166.

Chien, S. (2007). "Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(3): H1209-1224.

Chiu, J. J. and S. Chien (2011). "Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives." Physiol Rev **91**(1): 327-387.

Christensen, K. L. and M. J. Mulvany (2001). "Vasodilatation, not hypotension, improves resistance vessel design during treatment of essential hypertension: a literature survey." J Hypertens **19**(6): 1001-1006.

- Clague, M. J. and S. Urbe (2010). "Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways." Cell **143**(5): 682-685.
- Cordes, K. R., N. T. Sheehy, M. P. White, E. C. Berry, S. U. Morton, A. N. Muth, T. H. Lee, J. M. Miano, K. N. Ivey and D. Srivastava (2009). "miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity." Nature **460**(7256): 705-710.
- Correa-Meyer, E., L. Pesce, C. Guerrero and J. I. Sznajder (2002). "Cyclic stretch activates ERK1/2 via G proteins and EGFR in alveolar epithelial cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **282**(5): L883-891.
- Creemers, E. E., L. B. Sutherland, J. McAnally, J. A. Richardson and E. N. Olson (2006). "Myocardin is a direct transcriptional target of Mef2, Tead and Foxo proteins during cardiovascular development." Development **133**(21): 4245-4256.
- D'Amore, A., M. J. Black and W. G. Thomas (2005). "The angiotensin II type 2 receptor causes constitutive growth of cardiomyocytes and does not antagonize angiotensin II type 1 receptor-mediated hypertrophy." Hypertension **46**(6): 1347-1354.
- Dabiri, B. E., H. Lee and K. K. Parker (2012). "A potential role for integrin signaling in mechano-electrical feedback." Prog Biophys Mol Biol **110**(2-3): 196-203.
- Dahlmann, B. (2007). "Role of proteasomes in disease." BMC Biochem **8 Suppl 1**: S3.
- Davies, P. F. (1995). "Flow-mediated endothelial mechanotransduction." Physiol Rev **75**(3): 519-560.
- Davis-Dusenbery, B. N., C. Wu and A. Hata (2011). "Micromanaging vascular smooth muscle cell differentiation and phenotypic modulation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **31**(11): 2370-2377.
- Demasi, M. and F. R. Laurindo (2012). "Physiological and pathological role of the ubiquitin-proteasome system in the vascular smooth muscle cell." Cardiovasc Res **95**(2): 183-193.
- Demicheva, E., M. Hecker and T. Korff (2008). "Stretch-induced activation of the transcription factor activator protein-1 controls monocyte chemoattractant protein-1 expression during arteriogenesis." Circ Res **103**(5): 477-484.
- Denger, S., L. Jahn, P. Wende, L. Watson, S. H. Gerber, W. Kubler and J. Kreuzer (1999). "Expression of monocyte chemoattractant protein-1 cDNA in vascular smooth muscle cells: induction of the synthetic phenotype: a possible clue to SMC differentiation in the process of atherogenesis." Atherosclerosis **144**(1): 15-23.
- Depre, C., Q. Wang, L. Yan, N. Hedhli, P. Peter, L. Chen, C. Hong, L. Hittinger, B. Ghaleh, J. Sadoshima, D. E. Vatner, S. F. Vatner and K. Madura (2006). "Activation of the cardiac proteasome during pressure overload promotes ventricular hypertrophy." Circulation **114**(17): 1821-1828.
- Derrickson, T. Principles of Anatomy and Physiology, Atlas and Registration Card. Wiley and Sons.
- Dickhout, J. G. and R. C. Austin (2006). "Proteasomal regulation of cardiac hypertrophy: is demolition necessary for building?" Circulation **114**(17): 1796-1798.
- Doran, A. C., N. Meller and C. A. McNamara (2008). "Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(5): 812-819.

Drews, O., O. Tsukamoto, D. Liem, J. Streicher, Y. Wang and P. Ping (2010). "Differential regulation of proteasome function in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy." Circ Res **107**(9): 1094-1101.

Du, K. L., H. S. Ip, J. Li, M. Chen, F. Dandre, W. Yu, M. M. Lu, G. K. Owens and M. S. Parmacek (2003). "Myocardin is a critical serum response factor cofactor in the transcriptional program regulating smooth muscle cell differentiation." Mol Cell Biol **23**(7): 2425-2437.

Emaduddin, M., S. Ekman, L. Ronnstrand and C. H. Heldin (1999). "Functional co-operation between the subunits in heterodimeric platelet-derived growth factor receptor complexes." Biochem J **341** (Pt 3): 523-528.

Eskildsen-Helmond, Y. E. and M. J. Mulvany (2003). "Pressure-induced activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 in small arteries." Hypertension **41**(4): 891-897.

Falk , P. S., W (1962). "Das histologische Bild der Tonsillen des erwachsenen Kaninchens nach Injektionen von Desoxycorticosteron." Archiv Ohrenheilkunde und Halsheilkunde(179): 431-442.

Feihl, F., L. Liaudet, B. Waeber and B. I. Levy (2006). "Hypertension: a disease of the microcirculation?" Hypertension **48**(6): 1012-1017.

Feldner, A., H. Otto, S. Rewerk, M. Hecker and T. Korff (2011). "Experimental hypertension triggers varicosis-like maladaptive venous remodeling through activator protein-1." FASEB J **25**(10): 3613-3621.

Fenteany, G., R. F. Standaert, W. S. Lane, S. Choi, E. J. Corey and S. L. Schreiber (1995). "Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin." Science **268**(5211): 726-731.

Fioretta, E. S., J. O. Fledderus, F. P. Baaijens and C. V. Bouten (2012). "Influence of substrate stiffness on circulating progenitor cell fate." J Biomech **45**(5): 736-744.

Fischer, A., N. Schumacher, M. Maier, M. Sendtner and M. Gessler (2004). "The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development." Genes Dev **18**(8): 901-911.

Fornerod, M., M. Ohno, M. Yoshida and I. W. Mattaj (1997). "CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals." Cell **90**(6): 1051-1060.

Fukuda, M., Y. Gotoh and E. Nishida (1997). "Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase." EMBO J **16**(8): 1901-1908.

Gaballa, M. A., C. T. Jacob, T. E. Raya, J. Liu, B. Simon and S. Goldman (1998). "Large artery remodeling during aging: biaxial passive and active stiffness." Hypertension **32**(3): 437-443.

Gallastegui, N. and M. Groll (2010). "The 26S proteasome: assembly and function of a destructive machine." Trends Biochem Sci **35**(11): 634-642.

George, S. J., A. B. Zaltsman and A. C. Newby (1997). "Surgical preparative injury and neointima formation increase MMP-9 expression and MMP-2 activation in human saphenous vein." Cardiovasc Res **33**(2): 447-459.

Gerhardt, H., M. Golding, M. Fruttiger, C. Ruhrberg, A. Lundkvist, A. Abramsson, M. Jeltsch, C. Mitchell, K. Alitalo, D. Shima and C. Betsholtz (2003). "VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia." J Cell Biol **161**(6): 1163-1177.

- Gilles, L., D. Bluteau, S. Boukour, Y. Chang, Y. Zhang, T. Robert, P. Dessen, N. Debili, O. A. Bernard, W. Vainchenker and H. Raslova (2009). "MAL/SRF complex is involved in platelet formation and megakaryocyte migration by regulating MYL9 (MLC2) and MMP9." Blood **114**(19): 4221-4232.
- Giordano, A. and A. Romano (2011). "Inhibition of human in-stent restenosis: a molecular view." Curr Opin Pharmacol **11**(4): 372-377.
- Gjorevski, N. and C. M. Nelson (2009). "Bidirectional extracellular matrix signaling during tissue morphogenesis." Cytokine Growth Factor Rev **20**(5-6): 459-465.
- Gomez, D. and G. K. Owens (2012). "Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis." Cardiovasc Res **95**(2): 156-164.
- Grote, K., I. Flach, M. Luchtefeld, E. Akin, S. M. Holland, H. Drexler and B. Schieffer (2003). "Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species." Circ Res **92**(11): e80-86.
- Guettler, S., M. K. Vartiainen, F. Miralles, B. Larijani and R. Treisman (2008). "RPEL motifs link the serum response factor cofactor MAL but not myocardin to Rho signaling via actin binding." Mol Cell Biol **28**(2): 732-742.
- Guibert, C., T. Ducret and J. P. Savineau (2008). "Voltage-independent calcium influx in smooth muscle." Prog Biophys Mol Biol **98**(1): 10-23.
- Hahn, C. and M. A. Schwartz (2009). "Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(1): 53-62.
- Halayko, A. J. and J. Solway (2001). "Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in smooth muscle cells." J Appl Physiol **90**(1): 358-368.
- Hartmannsgruber, V., W. T. Heyken, M. Kacik, A. Kaistha, I. Grgic, C. Harteneck, W. Liedtke, J. Hoyer and R. Kohler (2007). "Arterial response to shear stress critically depends on endothelial TRPV4 expression." PLoS One **2**(9): e827.
- Hausman, N., J. Martin, M. J. Taggart and C. Austin (2012). "Age-related changes in the contractile and passive arterial properties of murine mesenteric small arteries are altered by caveolin-1 knockout." J Cell Mol Med **16**(8): 1720-1730.
- Hautmann, M. B., C. S. Madsen and G. K. Owens (1997). "A transforming growth factor beta (TGFbeta) control element drives TGFbeta-induced stimulation of smooth muscle alpha-actin gene expression in concert with two CArG elements." J Biol Chem **272**(16): 10948-10956.
- Hayashi, K. and T. Morita (2013). "Differences in the nuclear export mechanism between myocardin and myocardin-related transcription factors A." J Biol Chem.
- Hayashi, K. and T. Naiki (2009). "Adaptation and remodeling of vascular wall; biomechanical response to hypertension." J Mech Behav Biomed Mater **2**(1): 3-19.
- Hedhli, N. and C. Depre (2010). "Proteasome inhibitors and cardiac cell growth." Cardiovasc Res **85**(2): 321-329.

Hedhli, N., P. Lizano, C. Hong, L. F. Fritzky, S. K. Dhar, H. Liu, Y. Tian, S. Gao, K. Madura, S. F. Vatner and C. Depre (2008). "Proteasome inhibition decreases cardiac remodeling after initiation of pressure overload." Am J Physiol Heart Circ Physiol **295**(4): H1385-1393.

Hedhli, N., L. Wang, Q. Wang, E. Rashed, Y. Tian, X. Sui, K. Madura and C. Depre (2008). "Proteasome activation during cardiac hypertrophy by the chaperone H11 Kinase/Hsp22." Cardiovasc Res **77**(3): 497-505.

Heerkens, E. H., A. S. Izzard and A. M. Heagerty (2007). "Integrins, vascular remodeling, and hypertension." Hypertension **49**(1): 1-4.

Hegde, A. N. (2010). "The ubiquitin-proteasome pathway and synaptic plasticity." Learn Mem **17**(7): 314-327.

Heil, M., I. Eitenmuller, T. Schmitz-Rixen and W. Schaper (2006). "Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences." J Cell Mol Med **10**(1): 45-55.

Heil, M. and W. Schaper (2004). "Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis)." Circ Res **95**(5): 449-458.

Hellstrom, M., M. Kalen, P. Lindahl, A. Abramsson and C. Betsholtz (1999). "Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse." Development **126**(14): 3047-3055.

Hellstrom, M., L. K. Phng, J. J. Hofmann, E. Wallgard, L. Coultas, P. Lindblom, J. Alva, A. K. Nilsson, L. Karlsson, N. Gaiano, K. Yoon, J. Rossant, M. L. Iruela-Arispe, M. Kalen, H. Gerhardt and C. Betsholtz (2007). "Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis." Nature **445**(7129): 776-780.

Hendrix, J. A., B. R. Wamhoff, O. G. McDonald, S. Sinha, T. Yoshida and G. K. Owens (2005). "5' CARG degeneracy in smooth muscle alpha-actin is required for injury-induced gene suppression in vivo." J Clin Invest **115**(2): 418-427.

Herbert, S. P. and D. Y. Stainier (2011). "Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(9): 551-564.

Hinson, J. S., M. D. Medlin, K. Lockman, J. M. Taylor and C. P. Mack (2007). "Smooth muscle cell-specific transcription is regulated by nuclear localization of the myocardin-related transcription factors." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(2): H1170-1180.

Hoofnagle, M. H., R. L. Neppl, E. L. Berzin, G. C. Teg Pipes, E. N. Olson, B. W. Wamhoff, A. V. Somlyo and G. K. Owens (2011). "Myocardin is differentially required for the development of smooth muscle cells and cardiomyocytes." Am J Physiol Heart Circ Physiol **300**(5): H1707-1721.

Hsu, H. J., C. F. Lee, A. Locke, S. Q. Vanderzyl and R. Kaunas (2010). "Stretch-induced stress fiber remodeling and the activations of JNK and ERK depend on mechanical strain rate, but not FAK." PLoS One **5**(8): e12470.

Hu, G., X. Wang, D. N. Saunders, M. Henderson, A. J. Russell, B. P. Herring and J. Zhou (2010). "Modulation of myocardin function by the ubiquitin E3 ligase UBR5." J Biol Chem **285**(16): 11800-11809.

- Huang, J., L. Cheng, J. Li, M. Chen, D. Zhou, M. M. Lu, A. Proweller, J. A. Epstein and M. S. Parmacek (2008). "Myocardin regulates expression of contractile genes in smooth muscle cells and is required for closure of the ductus arteriosus in mice." J Clin Invest **118**(2): 515-525.
- Hyduk, S. J., J. R. Chan, S. T. Duffy, M. Chen, M. D. Peterson, T. K. Waddell, G. C. Digby, K. Szaszi, A. Kapus and M. I. Cybulsky (2007). "Phospholipase C, calcium, and calmodulin are critical for alpha4beta1 integrin affinity up-regulation and monocyte arrest triggered by chemoattractants." Blood **109**(1): 176-184.
- Ibrahim, J. and B. C. Berk (2009). "Flow-mediated vascular remodeling in hypertension: relation to hemodynamics." Stroke **40**(2): 582-590.
- Igarashi, J. and T. Michel (2009). "Sphingosine-1-phosphate and modulation of vascular tone." Cardiovasc Res **82**(2): 212-220.
- Ikeda, M., T. Takei, I. Mills, H. Kito and B. E. Sumpio (1999). "Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 activation in endothelial cells exposed to cyclic strain." Am J Physiol **276**(2 Pt 2): H614-622.
- Ingber, D. E. (2006). "Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again." FASEB J **20**(7): 811-827.
- Intengan, H. D., L. Y. Deng, J. S. Li and E. L. Schiffrin (1999). "Mechanics and composition of human subcutaneous resistance arteries in essential hypertension." Hypertension **33**(1 Pt 2): 569-574.
- Intengan, H. D., J. B. Park and E. L. Schiffrin (1999). "Blood pressure and small arteries in DOCA-salt-treated genetically AVP-deficient rats: role of endothelin." Hypertension **34**(4 Pt 2): 907-913.
- Intengan, H. D. and E. L. Schiffrin (2001). "Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis." Hypertension **38**(3 Pt 2): 581-587.
- Intengan, H. D., G. Thibault, J. S. Li and E. L. Schiffrin (1999). "Resistance artery mechanics, structure, and extracellular components in spontaneously hypertensive rats : effects of angiotensin receptor antagonism and converting enzyme inhibition." Circulation **100**(22): 2267-2275.
- Iyer, A., V. Chan and L. Brown (2010). "The DOCA-Salt Hypertensive Rat as a Model of Cardiovascular Oxidative and Inflammatory Stress." Curr Cardiol Rev **6**(4): 291-297.
- Iyer, A., A. Fenning, J. Lim, G. T. Le, R. C. Reid, M. A. Halili, D. P. Fairlie and L. Brown (2010). "Antifibrotic activity of an inhibitor of histone deacetylases in DOCA-salt hypertensive rats." Br J Pharmacol **159**(7): 1408-1417.
- Jacob, M. P. (2003). "Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions." Biomed Pharmacother **57**(5-6): 195-202.
- Jagemann, L. R., L. G. Perez-Rivas, E. J. Ruiz, J. A. Ranea, F. Sanchez-Jimenez, A. R. Nebreda, E. Alba and J. Lozano (2008). "The functional interaction of 14-3-3 proteins with the ERK1/2 scaffold KSR1 occurs in an isoform-specific manner." J Biol Chem **283**(25): 17450-17462.
- Jain, R. K. (2003). "Molecular regulation of vessel maturation." Nat Med **9**(6): 685-693.

Janssen, L. J., T. Tazzeo, J. Zuo, E. Pertens and S. Keshavjee (2004). "KCl evokes contraction of airway smooth muscle via activation of RhoA and Rho-kinase." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **287**(4): L852-858.

Johnson, C. and Z. S. Galis (2004). "Matrix metalloproteinase-2 and -9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(1): 54-60.

Joung, H., J. S. Kwon, J. R. Kim, S. Shin, W. Kang, Y. Ahn, H. Kook and H. J. Kee (2012). "Enhancer of polycomb1 lessens neointima formation by potentiation of myocardin-induced smooth muscle differentiation." Atherosclerosis **222**(1): 84-91.

Julius, S. (1988). "The blood pressure seeking properties of the central nervous system." J Hypertens **6**(3): 177-185.

Kaiser, M. and C. Ottmann (2010). "The first small-molecule inhibitor of 14-3-3s: modulating the master regulator." Chembiochem **11**(15): 2085-2087.

Kalthof, B., M. Bechem, L. Pott and M. Schramm (1993). "Monitoring of Ca²⁺-transients in electrically stimulated A7r5 vascular smooth muscle cells fills the experimental gap between KCl-induced depolarization and patch-clamp studies." J Pharmacol Toxicol Methods **30**(3): 143-147.

Kauffenstein, G., I. Laher, K. Matrougui, N. C. Guerineau and D. Henrion (2012). "Emerging role of G protein-coupled receptors in microvascular myogenic tone." Cardiovasc Res **95**(2): 223-232.

Kee, H. J., J. S. Kwon, S. Shin, Y. Ahn, M. H. Jeong and H. Kook (2011). "Trichostatin A prevents neointimal hyperplasia via activation of Kruppel like factor 4." Vascul Pharmacol **55**(5-6): 127-134.

Khalil, M. F., W. D. Wagner and I. J. Goldberg (2004). "Molecular interactions leading to lipoprotein retention and the initiation of atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(12): 2211-2218.

Kim, H. J. and S. C. Bae (2011). "Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs." Am J Transl Res **3**(2): 166-179.

Kim, M. Y., J. Jung, J. S. Mo, E. J. Ann, J. S. Ahn, J. H. Yoon and H. S. Park (2011). "The intracellular domain of Jagged-1 interacts with Notch1 intracellular domain and promotes its degradation through Fbw7 E3 ligase." Exp Cell Res **317**(17): 2438-2446.

Kingsley, K., J. L. Huff, W. L. Rust, K. Carroll, A. M. Martinez, M. Fitchmun and G. E. Plopper (2002). "ERK1/2 mediates PDGF-BB stimulated vascular smooth muscle cell proliferation and migration on laminin-5." Biochem Biophys Res Commun **293**(3): 1000-1006.

Kiyan, Y., A. Limbourg, R. Kiyan, S. Tkachuk, F. P. Limbourg, A. Ovsianikov, B. N. Chichkov, H. Haller and I. Dumler (2012). "Urokinase receptor associates with myocardin to control vascular smooth muscle cells phenotype in vascular disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **32**(1): 110-122.

Klinke (2003). Lehrbuch der Physiologie. Georg Thieme Verlag.

Kloss, A., S. Meiners, A. Ludwig and B. Dahmann (2010). "Multiple cardiac proteasome subtypes differ in their susceptibility to proteasome inhibitors." Cardiovasc Res **85**(2): 367-375.

- Korff, T., K. Aufgebauer and M. Hecker (2007). "Cyclic stretch controls the expression of CD40 in endothelial cells by changing their transforming growth factor-beta1 response." Circulation **116**(20): 2288-2297.
- Korner, P. I. and J. A. Angus (1997). "Vascular remodeling." Hypertension **29**(4): 1065-1066.
- Kotani, M., N. Fukuda, H. Ando, W. Y. Hu, S. Kunimoto, S. Saito and K. Kanmatsuse (2003). "Chimeric DNA-RNA hammerhead ribozyme targeting PDGF A-chain mRNA specifically inhibits neointima formation in rat carotid artery after balloon injury." Cardiovasc Res **57**(1): 265-276.
- Kuhn, D. J., R. Z. Orlowski and C. C. Bjorklund (2011). "Second generation proteasome inhibitors: carfilzomib and immunoproteasome-specific inhibitors (IPsIs)." Curr Cancer Drug Targets **11**(3): 285-295.
- Kuwahara, K., H. Kinoshita, Y. Kuwabara, Y. Nakagawa, S. Usami, T. Minami, Y. Yamada, M. Fujiwara and K. Nakao (2010). "Myocardin-related transcription factor A is a common mediator of mechanical stress- and neurohumoral stimulation-induced cardiac hypertrophic signaling leading to activation of brain natriuretic peptide gene expression." Mol Cell Biol **30**(17): 4134-4148.
- Lacolley, P., V. Regnault, A. Nicoletti, Z. Li and J. B. Michel (2012). "The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles." Cardiovasc Res **95**(2): 194-204.
- Lakatta, E. G. and D. Levy (2003). "Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease." Circulation **107**(1): 139-146.
- Lange, A., R. E. Mills, C. J. Lange, M. Stewart, S. E. Devine and A. H. Corbett (2007). "Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha." J Biol Chem **282**(8): 5101-5105.
- Lawson, N. D., N. Scheer, V. N. Pham, C. H. Kim, A. B. Chitnis, J. A. Campos-Ortega and B. M. Weinstein (2001). "Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development." Development **128**(19): 3675-3683.
- Lazzeri, C., S. Valente, M. Chiostrri, P. Attana, C. Picariello and G. F. Gensini (2012). "Impact of hypertension on short- and long-term prognoses in patients with ST elevation myocardial infarction and without previously known diabetes." Heart Vessels **27**(4): 370-376.
- le Noble, F., D. Moyon, L. Pardanaud, L. Yuan, V. Djonov, R. Matthijsen, C. Breant, V. Fleury and A. Eichmann (2004). "Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac." Development **131**(2): 361-375.
- Lee, H. A., E. B. Baek, K. S. Park, H. J. Jung, J. I. Kim, S. J. Kim and Y. E. Earm (2007). "Mechanosensitive nonselective cation channel facilitation by endothelin-1 is regulated by protein kinase C in arterial myocytes." Cardiovasc Res **76**(2): 224-235.
- Lehoux, S., Y. Castier and A. Tedgui (2006). "Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces." J Intern Med **259**(4): 381-392.
- Li, J. K.-J. (2006). Dynamics of the vascular system, World Scientific.

- Li, S., D. Z. Wang, Z. Wang, J. A. Richardson and E. N. Olson (2003). "The serum response factor coactivator myocardin is required for vascular smooth muscle development." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(16): 9366-9370.
- Limbourg, A., T. Korff, L. C. Napp, W. Schaper, H. Drexler and F. P. Limbourg (2009). "Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia." Nat Protoc **4**(12): 1737-1746.
- Liu, Y., S. Sinha, O. G. McDonald, Y. Shang, M. H. Hoofnagle and G. K. Owens (2005). "Kruppel-like factor 4 abrogates myocardin-induced activation of smooth muscle gene expression." J Biol Chem **280**(10): 9719-9727.
- Liu, Z. P., Z. Wang, H. Yanagisawa and E. N. Olson (2005). "Phenotypic modulation of smooth muscle cells through interaction of Foxo4 and myocardin." Dev Cell **9**(2): 261-270.
- Lockman, K., J. S. Hinson, M. D. Medlin, D. Morris, J. M. Taylor and C. P. Mack (2004). "Sphingosine 1-phosphate stimulates smooth muscle cell differentiation and proliferation by activating separate serum response factor co-factors." J Biol Chem **279**(41): 42422-42430.
- Lombardi, D. M., G. K. Owens and S. M. Schwartz (1989). "Ploidy in mesenteric vessels of aged spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats." Hypertension **13**(5): 475-479.
- Long, X., R. D. Bell, W. T. Gerthoffer, B. V. Zlokovic and J. M. Miano (2008). "Myocardin is sufficient for a smooth muscle-like contractile phenotype." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(8): 1505-1510.
- Long, X., E. E. Creemers, D. Z. Wang, E. N. Olson and J. M. Miano (2007). "Myocardin is a bifunctional switch for smooth versus skeletal muscle differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(42): 16570-16575.
- Louis, S. F. and P. Zahradka (2010). "Vascular smooth muscle cell motility: From migration to invasion." Exp Clin Cardiol **15**(4): e75-85.
- Lovren, F., Y. Pan, A. Quan, K. K. Singh, P. C. Shukla, N. Gupta, B. M. Steer, A. J. Ingram, M. Gupta, M. Al-Omran, H. Teoh, P. A. Marsden and S. Verma (2012). "MicroRNA-145 targeted therapy reduces atherosclerosis." Circulation **126**(11 Suppl 1): S81-90.
- Lu, D. and G. S. Kassab (2011). "Role of shear stress and stretch in vascular mechanobiology." J R Soc Interface **8**(63): 1379-1385.
- Mackie, A. R. and K. L. Byron (2008). "Cardiovascular KCNQ (Kv7) potassium channels: physiological regulators and new targets for therapeutic intervention." Mol Pharmacol **74**(5): 1171-1179.
- Marais, R., J. Wynne and R. Treisman (1993). "The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain." Cell **73**(2): 381-393.
- Martinac, B. (2004). "Mechanosensitive ion channels: molecules of mechanotransduction." J Cell Sci **117**(Pt 12): 2449-2460.
- McCullar, J. S., S. A. Larsen, R. A. Millimaki and T. M. Filtz (2003). "Calmodulin is a phospholipase C-beta interacting protein." J Biol Chem **278**(36): 33708-33713.
- McKinsey, T. A. and D. A. Kass (2007). "Small-molecule therapies for cardiac hypertrophy: moving beneath the cell surface." Nat Rev Drug Discov **6**(8): 617-635.

McNally, J. S., M. E. Davis, D. P. Giddens, A. Saha, J. Hwang, S. Dikalov, H. Jo and D. G. Harrison (2003). "Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress." Am J Physiol Heart Circ Physiol **285**(6): H2290-2297.

Meiners, S., M. Laule, W. Rother, C. Guenther, I. Prauka, P. Muschick, G. Baumann, P. M. Kloetzel and K. Stangl (2002). "Ubiquitin-proteasome pathway as a new target for the prevention of restenosis." Circulation **105**(4): 483-489.

Meng, L., R. Mohan, B. H. Kwok, M. Elofsson, N. Sin and C. M. Crews (1999). "Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(18): 10403-10408.

Miano, J. M. (2003). "Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression." J Mol Cell Cardiol **35**(6): 577-593.

Michel, J. B., D. Heudes, O. Michel, P. Poitevin, M. Philippe, E. Scalbert, B. Corman and B. I. Levy (1994). "Effect of chronic ANG I-converting enzyme inhibition on aging processes. II. Large arteries." Am J Physiol **267**(1 Pt 2): R124-135.

Michel, J. B., Z. Li and P. Lacolley (2012). "Smooth muscle cells and vascular diseases." Cardiovasc Res **95**(2): 135-137.

Mikhailov, A. T. and M. Torrado (2012). "In search of novel targets for heart disease: myocardin and myocardin-related transcriptional cofactors." Biochem Res Int **2012**: 973723.

Minami, T., K. Kuwahara, Y. Nakagawa, M. Takaoka, H. Kinoshita, K. Nakao, Y. Kuwabara, Y. Yamada, C. Yamada, J. Shibata, S. Usami, S. Yasuno, T. Nishikimi, K. Ueshima, M. Sata, H. Nakano, T. Seno, Y. Kawahito, K. Sobue, A. Kimura, R. Nagai and K. Nakao (2012). "Reciprocal expression of MRTF-A and myocardin is crucial for pathological vascular remodelling in mice." EMBO J **31**(23): 4428-4440.

Miralles, F., G. Posern, A. I. Zaromytidou and R. Treisman (2003). "Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL." Cell **113**(3): 329-342.

Miska, E. A., C. Karlsson, E. Langley, S. J. Nielsen, J. Pines and T. Kouzarides (1999). "HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor." EMBO J **18**(18): 5099-5107.

Missirlis, D. and J. A. Hubbell (2010). "In vitro uptake of amphiphilic, hydrogel nanoparticles by J774A.1 cells." J Biomed Mater Res A **93**(4): 1557-1565.

Missirlis, D., N. Tirelli and J. A. Hubbell (2005). "Amphiphilic hydrogel nanoparticles. Preparation, characterization, and preliminary assessment as new colloidal drug carriers." Langmuir **21**(6): 2605-2613.

Mogami, H., C. Lloyd Mills and D. V. Gallacher (1997). "Phospholipase C inhibitor, U73122, releases intracellular Ca²⁺, potentiates Ins(1,4,5)P₃-mediated Ca²⁺ release and directly activates ion channels in mouse pancreatic acinar cells." Biochem J **324** (Pt 2): 645-651.

Monecke, T., D. Haselbach, B. Voss, A. Russek, P. Neumann, E. Thomson, E. Hurt, U. Zachariae, H. Stark, H. Grubmuller, A. Dickmanns and R. Ficner (2013). "Structural basis for cooperativity of CRM1 export complex formation." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(3): 960-965.

Moore, J. E., Jr., C. Xu, S. Glagov, C. K. Zarins and D. N. Ku (1994). "Fluid wall shear stress measurements in a model of the human abdominal aorta: oscillatory behavior and relationship to atherosclerosis." Atherosclerosis **110**(2): 225-240.

Moore, K. J. and E. A. Fisher (2012). "The double-edged sword of fibronectin in atherosclerosis." EMBO Mol Med **4**(7): 561-563.

Morano, I. (2003). "Tuning smooth muscle contraction by molecular motors." J Mol Med (Berl) **81**(8): 481-487.

Moroianu, J. and G. Blobel (1995). "Protein export from the nucleus requires the GTPase Ran and GTP hydrolysis." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(10): 4318-4322.

Muehlich, S., R. Wang, S. M. Lee, T. C. Lewis, C. Dai and R. Prywes (2008). "Serum-induced phosphorylation of the serum response factor coactivator MKL1 by the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway inhibits its nuclear localization." Mol Cell Biol **28**(20): 6302-6313.

Muir, E. M. and D. E. Bowyer (1983). "Dependence of fluid-phase pinocytosis in arterial smooth-muscle cells on temperature, cellular ATP concentration and the cytoskeletal system." Biochem J **216**(2): 467-473.

Mulvany, M. J. (1993). "Remodeling of resistance vessel structure in essential hypertension." Curr Opin Nephrol Hypertens **2**(1): 77-81.

Mulvany, M. J. (1993). "Resistance vessel structure in hypertension: growth or remodeling?" J Cardiovasc Pharmacol **22 Suppl 5**: S44-47.

Mulvany, M. J. (2002). "Small artery remodeling and significance in the development of hypertension." News Physiol Sci **17**: 105-109.

Mulvany, M. J. (2002). "Small artery remodeling in hypertension." Curr Hypertens Rep **4**(1): 49-55.

Na, S., A. Trache, J. Trzeciakowski, Z. Sun, G. A. Meininger and J. D. Humphrey (2008). "Time-dependent changes in smooth muscle cell stiffness and focal adhesion area in response to cyclic equibiaxial stretch." Ann Biomed Eng **36**(3): 369-380.

Nakamura, S., K. Hayashi, K. Iwasaki, T. Fujioka, H. Egusa, H. Yatani and K. Sobue (2010). "Nuclear import mechanism for myocardin family members and their correlation with vascular smooth muscle cell phenotype." J Biol Chem **285**(48): 37314-37323.

Nakashima, Y., T. N. Wight and K. Sueishi (2008). "Early atherosclerosis in humans: role of diffuse intimal thickening and extracellular matrix proteoglycans." Cardiovasc Res **79**(1): 14-23.

Nardozi, J. D., K. Lott and G. Cingolani (2010). "Phosphorylation meets nuclear import: a review." Cell Commun Signal **8**: 32.

Newby, A. C. and A. B. Zaltsman (2000). "Molecular mechanisms in intimal hyperplasia." J Pathol **190**(3): 300-309.

North, K. A. and A. G. Sanders (1958). "The development of collateral circulation in the mouse's ear." Circ Res **6**(6): 721-727.

- Numaguchi, K., S. Eguchi, T. Yamakawa, E. D. Motley and T. Inagami (1999). "Mechanotransduction of rat aortic vascular smooth muscle cells requires RhoA and intact actin filaments." Circ Res **85**(1): 5-11.
- Obsilova, V., J. Silhan, E. Boura, J. Teisinger and T. Obsil (2008). "14-3-3 proteins: a family of versatile molecular regulators." Physiol Res **57 Suppl 3**: S11-21.
- Odrawaz, Z. and A. D. Sharrocks (2012). "ELK1 uses different DNA binding modes to regulate functionally distinct classes of target genes." PLoS Genet **8**(5): e1002694.
- Olsen, M. H., M. K. Christensen, K. Wachtell, C. Tuxen, E. Fossum, L. E. Bang, N. Wiinberg, R. B. Devereux, S. E. Kjeldsen, P. Hildebrandt, H. Dige-Petersen, J. Rokkedal and H. Ibsen (2005). "Markers of collagen synthesis is related to blood pressure and vascular hypertrophy: a LIFE substudy." J Hum Hypertens **19**(4): 301-307.
- Orr, A. W., N. E. Hastings, B. R. Blackman and B. R. Wamhoff (2010). "Complex regulation and function of the inflammatory smooth muscle cell phenotype in atherosclerosis." J Vasc Res **47**(2): 168-180.
- Owens, G. K. (1995). "Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells." Physiol Rev **75**(3): 487-517.
- Owens, G. K., M. S. Kumar and B. R. Wamhoff (2004). "Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease." Physiol Rev **84**(3): 767-801.
- Owens, G. K. and S. M. Schwartz (1982). "Alterations in vascular smooth muscle mass in the spontaneously hypertensive rat. Role of cellular hypertrophy, hyperploidy, and hyperplasia." Circ Res **51**(3): 280-289.
- Palatini, P., E. Casiglia, J. Gasowski, J. Gluszek, P. Jankowski, K. Narkiewicz, F. Saladini, K. Stolarz-Skrzypek, V. Tikhonoff, L. Van Bortel, W. Wojciechowska and K. Kawecka-Jaszcz (2011). "Arterial stiffness, central hemodynamics, and cardiovascular risk in hypertension." Vasc Health Risk Manag **7**: 725-739.
- Park, J. S., J. S. Chu, A. D. Tsou, R. Diop, Z. Tang, A. Wang and S. Li (2011). "The effect of matrix stiffness on the differentiation of mesenchymal stem cells in response to TGF-beta." Biomaterials **32**(16): 3921-3930.
- Park, S. J., S. J. Kang, R. Virmani, M. Nakano and Y. Ueda (2012). "In-stent neoatherosclerosis: a final common pathway of late stent failure." J Am Coll Cardiol **59**(23): 2051-2057.
- Parmacek, M. S. (2008). "Myocardin: dominant driver of the smooth muscle cell contractile phenotype." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(8): 1416-1417.
- Paroni, G., N. Cernotta, C. Dello Russo, P. Gallinari, M. Pallaoro, C. Foti, F. Talamo, L. Orsatti, C. Steinkuhler and C. Brancolini (2008). "PP2A regulates HDAC4 nuclear import." Mol Biol Cell **19**(2): 655-667.
- Paroni, G., A. Fontanini, N. Cernotta, C. Foti, M. P. Gupta, X. J. Yang, D. Fasino and C. Brancolini (2007). "Dephosphorylation and caspase processing generate distinct nuclear pools of histone deacetylase 4." Mol Cell Biol **27**(19): 6718-6732.

Parra, M. and E. Verdin (2010). "Regulatory signal transduction pathways for class IIa histone deacetylases." Curr Opin Pharmacol **10**(4): 454-460.

Pemberton, L. F. and B. M. Paschal (2005). "Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export." Traffic **6**(3): 187-198.

Perez, J. F. and M. J. Sanderson (2005). "The contraction of smooth muscle cells of intrapulmonary arterioles is determined by the frequency of Ca²⁺ oscillations induced by 5-HT and KCl." J Gen Physiol **125**(6): 555-567.

Perez, J. F. and M. J. Sanderson (2005). "The frequency of calcium oscillations induced by 5-HT, ACH, and KCl determine the contraction of smooth muscle cells of intrapulmonary bronchioles." J Gen Physiol **125**(6): 535-553.

Peyton, S. R., P. D. Kim, C. M. Ghajar, D. Seliktar and A. J. Putnam (2008). "The effects of matrix stiffness and RhoA on the phenotypic plasticity of smooth muscle cells in a 3-D biosynthetic hydrogel system." Biomaterials **29**(17): 2597-2607.

Peyton, S. R. and A. J. Putnam (2005). "Extracellular matrix rigidity governs smooth muscle cell motility in a biphasic fashion." J Cell Physiol **204**(1): 198-209.

Peyton, S. R., C. B. Raub, V. P. Keschrumrus and A. J. Putnam (2006). "The use of poly(ethylene glycol) hydrogels to investigate the impact of ECM chemistry and mechanics on smooth muscle cells." Biomaterials **27**(28): 4881-4893.

Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.

Pfisterer, L., A. Feldner, M. Hecker and T. Korff (2012). "Hypertension impairs myocardin function: a novel mechanism facilitating arterial remodelling." Cardiovasc Res **96**(1): 120-129.

Pipes, G. C., E. E. Creemers and E. N. Olson (2006). "The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis." Genes Dev **20**(12): 1545-1556.

Prior, B. M., P. G. Lloyd, J. Ren, H. Li, H. T. Yang, M. H. Laughlin and R. L. Terjung (2004). "Time course of changes in collateral blood flow and isolated vessel size and gene expression after femoral artery occlusion in rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol **287**(6): H2434-2447.

Qiu, H., Y. Zhu, Z. Sun, J. P. Trzeciakowski, M. Gansner, C. Depre, R. R. Resuello, F. F. Natividad, W. C. Hunter, G. M. Genin, E. L. Elson, D. E. Vatner, G. A. Meininger and S. F. Vatner (2010). "Short communication: vascular smooth muscle cell stiffness as a mechanism for increased aortic stiffness with aging." Circ Res **107**(5): 615-619.

Rensen, S. S., P. A. Doevendans and G. J. van Eys (2007). "Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity." Neth Heart J **15**(3): 100-108.

Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." Nature **386**(6626): 671-674.

Rizzoni, D., M. L. Muiesan, E. Porteri, M. Salvetti, M. Castellano, G. Bettoni, G. Tiberio, S. M. Giulini, C. Monteduro, G. Garavelli and E. Agabiti-Rosei (1998). "Relations between cardiac and vascular structure in patients with primary and secondary hypertension." J Am Coll Cardiol **32**(4): 985-992.

- Rizzoni, D., E. Porteri, M. Castellano, G. Bettoni, M. L. Muiesan, G. Tiberio, S. M. Giulini, G. Rossi, G. Bernini and E. Agabiti-Rosei (1998). "Endothelial dysfunction in hypertension is independent from the etiology and from vascular structure." Hypertension **31**(1 Pt 2): 335-341.
- Rizzoni, D., E. Porteri, D. Guefi, A. Piccoli, M. Castellano, G. Pasini, M. L. Muiesan, M. J. Mulvany and E. A. Rosei (2000). "Cellular hypertrophy in subcutaneous small arteries of patients with renovascular hypertension." Hypertension **35**(4): 931-935.
- Robertson, K. E., R. A. McDonald, K. G. Oldroyd, S. A. Nicklin and A. H. Baker (2012). "Prevention of coronary in-stent restenosis and vein graft failure: does vascular gene therapy have a role?" Pharmacol Ther **136**(1): 23-34.
- Robertson, L., C. Evans and F. G. Fowkes (2008). "Epidemiology of chronic venous disease." Phlebology **23**(3): 103-111.
- Rodriguez-Pla, A., J. A. Bosch-Gil, J. Rossello-Urgell, P. Huguet-Redecilla, J. H. Stone and M. Vilardell-Tarres (2005). "Metalloproteinase-2 and -9 in giant cell arteritis: involvement in vascular remodeling." Circulation **112**(2): 264-269.
- Rolfe, B. E., J. D. Muddiman, N. J. Smith, G. R. Campbell and J. H. Campbell (2000). "ICAM-1 expression by vascular smooth muscle cells is phenotype-dependent." Atherosclerosis **149**(1): 99-110.
- Ronnstrand, L. and C. H. Heldin (2001). "Mechanisms of platelet-derived growth factor-induced chemotaxis." Int J Cancer **91**(6): 757-762.
- Rossi, G. P., M. Cavallin, A. S. Belloni, G. Mazzocchi, G. G. Nussdorfer, A. C. Pessina and S. Sartore (2002). "Aortic smooth muscle cell phenotypic modulation and fibrillar collagen deposition in angiotensin II-dependent hypertension." Cardiovasc Res **55**(1): 178-189.
- Safar, M., P. Chamiot-Clerc, G. Dagher and J. F. Renaud (2001). "Pulse pressure, endothelium function, and arterial stiffness in spontaneously hypertensive rats." Hypertension **38**(6): 1416-1421.
- Safar, M. E., H. S. Boudier, G. London and E. D. Frohlich (2001). "Fourth workshop on structure and function of large arteries." Hypertension **38**(4): 913.
- Salmon, M., D. Gomez, E. Greene, L. Shankman and G. K. Owens (2012). "Cooperative binding of KLF4, pELK-1, and HDAC2 to a G/C repressor element in the SM22alpha promoter mediates transcriptional silencing during SMC phenotypic switching in vivo." Circ Res **111**(6): 685-696.
- Schaper, W., M. De Brabander and P. Lewi (1971). "DNA synthesis and mitoses in coronary collateral vessels of the dog." Circ Res **28**(6): 671-679.
- Schattemann, G. C., C. Loushin, T. Li and C. E. Hart (1996). "PDGF-A is required for normal murine cardiovascular development." Dev Biol **176**(1): 133-142.
- Schiffrin, E. L., L. Y. Deng and P. Larochelle (1993). "Morphology of resistance arteries and comparison of effects of vasoconstrictors in mild essential hypertensive patients." Clin Invest Med **16**(3): 177-186.

Schofl, C., T. Mader, C. Kramer, M. Waring, P. Krippeit-Drews, K. Prank, A. von zur Muhlen, G. Drews and G. Brabant (1999). "Ca²⁺/calmodulin inhibition and phospholipase C-linked Ca²⁺ Signaling in clonal beta-cells." Endocrinology **140**(12): 5516-5523.

Schuchardt, M., M. Tolle, J. Prufer and M. van der Giet (2011). "Pharmacological relevance and potential of sphingosine 1-phosphate in the vascular system." Br J Pharmacol **163**(6): 1140-1162.

Secomb, T. W. (1995). "Mechanics of blood flow in the microcirculation." Symp Soc Exp Biol **49**: 305-321.

Secomb, T. W. (2008). "Theoretical models for regulation of blood flow." Microcirculation **15**(8): 765-775.

Sharif-Naeini, R., A. Dedman, J. H. Folgering, F. Duprat, A. Patel, B. Nilius and E. Honore (2008). "TRP channels and mechanosensory transduction: insights into the arterial myogenic response." Pflugers Arch **456**(3): 529-540.

Sharif-Naeini, R., J. H. Folgering, D. Bichet, F. Duprat, P. Delmas, A. Patel and E. Honore (2010). "Sensing pressure in the cardiovascular system: Gq-coupled mechanoreceptors and TRP channels." J Mol Cell Cardiol **48**(1): 83-89.

Shukla, N. and J. Y. Jeremy (2012). "Pathophysiology of saphenous vein graft failure: a brief overview of interventions." Curr Opin Pharmacol **12**(2): 114-120.

Silbernagel (2003). Taschenatlas der Physiologie. Georg Thieme Verlag.

Spalteholz, W. (1914). Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten und seine theoretischen Bedingungen : nebst Anh.: Über Knochenfärbung. Leipzig, Hirzel.

Stalmans, I., Y. S. Ng, R. Rohan, M. Fruttiger, A. Bouche, A. Yuce, H. Fujisawa, B. Hermans, M. Shani, S. Jansen, D. Hicklin, D. J. Anderson, T. Gardiner, H. P. Hammes, L. Moons, M. Dewerchin, D. Collen, P. Carmeliet and P. A. D'Amore (2002). "Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms." J Clin Invest **109**(3): 327-336.

Stegemann, J. P., H. Hong and R. M. Nerem (2005). "Mechanical, biochemical, and extracellular matrix effects on vascular smooth muscle cell phenotype." J Appl Physiol **98**(6): 2321-2327.

Strege, P. R., A. Mazzone, R. E. Kraichely, L. Sha, A. N. Holm, Y. Ou, I. Lim, S. J. Gibbons, M. G. Sarr and G. Farrugia (2007). "Species dependent expression of intestinal smooth muscle mechanosensitive sodium channels." Neurogastroenterol Motil **19**(2): 135-143.

Sun, Q., S. Taurin, N. Sethakorn, X. Long, M. Imamura, D. Z. Wang, W. E. Zimmer, N. O. Dulin and J. M. Miano (2009). "Myocardin-dependent activation of the CArG box-rich smooth muscle gamma-actin gene: preferential utilization of a single CArG element through functional association with the NKX3.1 homeodomain protein." J Biol Chem **284**(47): 32582-32590.

Takahashi, K. and K. Naruse (2012). "Stretch-activated BK channel and heart function." Prog Biophys Mol Biol **110**(2-3): 239-244.

Tang, R. H., X. L. Zheng, T. E. Callis, W. E. Stansfield, J. He, A. S. Baldwin, D. Z. Wang and C. H. Selzman (2008). "Myocardin inhibits cellular proliferation by inhibiting NF-kappaB(p65)-dependent cell cycle progression." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(9): 3362-3367.

- Taurin, S., N. Sandbo, D. M. Yau, N. Sethakorn, J. Kach and N. O. Dulin (2009). "Phosphorylation of myocardin by extracellular signal-regulated kinase." J Biol Chem **284**(49): 33789-33794.
- Thomas, A. C. and A. C. Newby (2010). "Effect of matrix metalloproteinase-9 knockout on vein graft remodelling in mice." J Vasc Res **47**(4): 299-308.
- Tomoda, H. and S. Omura (2000). "Lactacystin, a proteasome inhibitor: discovery and its application in cell biology." Yakugaku Zasshi **120**(10): 935-949.
- Traub, O. and B. C. Berk (1998). "Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force." Arterioscler Thromb Vasc Biol **18**(5): 677-685.
- Tsamis, A. and N. Stergiopoulos (2007). "Arterial remodeling in response to hypertension using a constituent-based model." Am J Physiol Heart Circ Physiol **293**(5): H3130-3139.
- Tuna, B. G., E. N. Bakker and E. VanBavel (2012). "Smooth muscle biomechanics and plasticity: relevance for vascular calibre and remodelling." Basic Clin Pharmacol Toxicol **110**(1): 35-41.
- Unthank, J. L., S. W. Fath, H. M. Burkhart, S. C. Miller and M. C. Dalsing (1996). "Wall remodeling during luminal expansion of mesenteric arterial collaterals in the rat." Circ Res **79**(5): 1015-1023.
- van den Akker, J., M. J. Schoorl, E. N. Bakker and E. Vanbavel (2010). "Small artery remodeling: current concepts and questions." J Vasc Res **47**(3): 183-202.
- van Royen, N., J. J. Piek, I. Buschmann, I. Hoefler, M. Voskuil and W. Schaper (2001). "Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease." Cardiovasc Res **49**(3): 543-553.
- Verdin, E., F. Dequiedt and H. G. Kasler (2003). "Class II histone deacetylases: versatile regulators." Trends Genet **19**(5): 286-293.
- Wagenseil, J. E. and R. P. Mecham (2009). "Vascular extracellular matrix and arterial mechanics." Physiol Rev **89**(3): 957-989.
- Wagner, A. H., A. Hildebrandt, S. Baumgarten, A. Jungmann, O. J. Muller, V. S. Sharov, C. Schoneich and M. Hecker (2011). "Tyrosine nitration limits stretch-induced CD40 expression and disconnects CD40 signaling in human endothelial cells." Blood **118**(13): 3734-3742.
- Wang, H. U., Z. F. Chen and D. J. Anderson (1998). "Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4." Cell **93**(5): 741-753.
- Wang, X. and J. Robbins (2006). "Heart failure and protein quality control." Circ Res **99**(12): 1315-1328.
- Wang, Z., H. Fukushima, D. Gao, H. Inuzuka, L. Wan, A. W. Lau, P. Liu and W. Wei (2011). "The two faces of FBW7 in cancer drug resistance." Bioessays **33**(11): 851-859.
- Wang, Z., D. Z. Wang, D. Hockemeyer, J. McAnally, A. Nordheim and E. N. Olson (2004). "Myocardin and ternary complex factors compete for SRF to control smooth muscle gene expression." Nature **428**(6979): 185-189.

Wang, Z., D. Z. Wang, G. C. Pipes and E. N. Olson (2003). "Myocardin is a master regulator of smooth muscle gene expression." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(12): 7129-7134.

Ward, M. R., G. Pasterkamp, A. C. Yeung and C. Borst (2000). "Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications." Circulation **102**(10): 1186-1191.

Weaver, H., N. Shukla, D. Ellinsworth and J. Y. Jeremy (2012). "Oxidative stress and vein graft failure: a focus on NADH oxidase, nitric oxide and eicosanoids." Curr Opin Pharmacol **12**(2): 160-165.

Wentzel, J. J., Y. S. Chatzizisis, F. J. Gijsen, G. D. Giannoglou, C. L. Feldman and P. H. Stone (2012). "Endothelial shear stress in the evolution of coronary atherosclerotic plaque and vascular remodelling: current understanding and remaining questions." Cardiovasc Res **96**(2): 234-243.

Wier, W. G. and K. G. Morgan (2003). "Alpha1-adrenergic signaling mechanisms in contraction of resistance arteries." Rev Physiol Biochem Pharmacol **150**: 91-139.

Willis, M. S., W. H. Townley-Tilson, E. Y. Kang, J. W. Homeister and C. Patterson (2010). "Sent to destroy: the ubiquitin proteasome system regulates cell signaling and protein quality control in cardiovascular development and disease." Circ Res **106**(3): 463-478.

Wilson, D. P., L. Saward, P. Zahradka and P. K. Cheung (1999). "Angiotensin II receptor antagonists prevent neointimal proliferation in a porcine coronary artery organ culture model." Cardiovasc Res **42**(3): 761-772.

Winder, S. J., B. G. Allen, E. D. Fraser, H. M. Kang, G. J. Kargacin and M. P. Walsh (1993). "Calponin phosphorylation in vitro and in intact muscle." Biochem J **296 (Pt 3)**: 827-836.

Wolfe, S. E., M. F. Navarro-Gonzalez, T. H. Grayson, C. Stricker and C. E. Hill (2010). "Involvement of nonselective cation channels in the depolarisation initiating vasomotion." Clin Exp Pharmacol Physiol **37**(5-6): 536-543.

Xie, C., Y. Guo, T. Zhu, J. Zhang, P. X. Ma and Y. E. Chen (2012). "Yap1 protein regulates vascular smooth muscle cell phenotypic switch by interaction with myocardin." J Biol Chem **287**(18): 14598-14605.

Xie, P., Y. Fan, H. Zhang, Y. Zhang, M. She, D. Gu, C. Patterson and H. Li (2009). "CHIP represses myocardin-induced smooth muscle cell differentiation via ubiquitin-mediated proteasomal degradation." Mol Cell Biol **29**(9): 2398-2408.

Xin, M., E. M. Small, L. B. Sutherland, X. Qi, J. McAnally, C. F. Plato, J. A. Richardson, R. Bassel-Duby and E. N. Olson (2009). "MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury." Genes Dev **23**(18): 2166-2178.

Xing, W., T. C. Zhang, D. Cao, Z. Wang, C. L. Antos, S. Li, Y. Wang, E. N. Olson and D. Z. Wang (2006). "Myocardin induces cardiomyocyte hypertrophy." Circ Res **98**(8): 1089-1097.

Xu, Q., Y. Liu, M. Gorospe, R. Udelsman and N. J. Holbrook (1996). "Acute hypertension activates mitogen-activated protein kinases in arterial wall." J Clin Invest **97**(2): 508-514.

Yamazaki, T., K. Tobe, E. Hoh, K. Maemura, T. Kaida, I. Komuro, H. Tamemoto, T. Kadowaki, R. Nagai and Y. Yazaki (1993). "Mechanical loading activates mitogen-activated protein kinase and S6 peptide kinase in cultured rat cardiac myocytes." J Biol Chem **268**(16): 12069-12076.

Yancopoulos, G. D., S. Davis, N. W. Gale, J. S. Rudge, S. J. Wiegand and J. Holash (2000). "Vascular-specific growth factors and blood vessel formation." Nature **407**(6801): 242-248.

Yoshida, T., Q. Gan and G. K. Owens (2008). "Kruppel-like factor 4, Elk-1, and histone deacetylases cooperatively suppress smooth muscle cell differentiation markers in response to oxidized phospholipids." Am J Physiol Cell Physiol **295**(5): C1175-1182.

Yoshida, T., Q. Gan, Y. Shang and G. K. Owens (2007). "Platelet-derived growth factor-BB represses smooth muscle cell marker genes via changes in binding of MKL factors and histone deacetylases to their promoters." Am J Physiol Cell Physiol **292**(2): C886-895.

Zeidan, A., I. Nordstrom, K. Dreja, U. Malmqvist and P. Hellstrand (2000). "Stretch-dependent modulation of contractility and growth in smooth muscle of rat portal vein." Circ Res **87**(3): 228-234.

Zhou, J., G. Hu and B. P. Herring (2005). "Smooth muscle-specific genes are differentially sensitive to inhibition by Elk-1." Mol Cell Biol **25**(22): 9874-9885.