

Hals-Nasen-Ohrenklinik und Poliklinik der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. W. Arnold)

**Signaltransduktion von Endothelin-A (ET_A) Rezeptoren der
Arteria cochlearis propria:**

Differentielle Desensibilisierung der zytosolischen Ca²⁺-Mobilisierung;
Rho-kinase vermittelte Ca²⁺-Sensibilisierung der Myofilamente

Elias Scherer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. W. Arnold
2. Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann
3. Univ.-Prof. Dr. J. Dudel, em., Ludwig-Maximilians-Universität
München

Die Dissertation wurde am 14.01.2002 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 05.06.2002 angenommen.

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	5
II. MATERIALIEN UND METHODEN	14
1.) Präparation der A. cochlearis propria	14
2.) Simultanmessung von Gefäßdurchmesser und intrazellulärem Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)	16
3.) Lösungen und Reagenzien	20
4.) Pharmakologische Analyse	21
5.) Statistik	27
III. ERGEBNISSE	28
1.) ET-1 induzierte Vasokonstriktion und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg	28
2.) ET_A -Rezeptoren vermitteln die ET-1 induzierte Vasokonstriktion	30
3.) Signaltransduktion der ET-1 induzierten zytosolischen Ca^{2+} -Mobilisierung und Vasokonstriktion	34
3.1.) ET_A -Rezeptoren sind an Phospholipase C gekoppelt	34
3.2.) Ca^{2+} -Signaltransduktion von ET_A -Rezeptoren	35
3.3.) Differentielle Desensibilisierung der ET_A Rezeptor-induzierten Ca^{2+} -Mobilisierung und Vasokonstriktion	40
3.4.) ET_A -Rezeptor vermittelte Ca^{2+} -Sensibilisierung der Myofilamente	43

IV. DISKUSSION	50
V. ZUSAMMENFASSUNG	61
VI. LITERATURVERZEICHNIS	63
VII. ABKÜRZUNGEN	83
VIII. DANKSAGUNG	85

I. Einleitung

Die Arteria cochlearis propria (A. spiralis modioli) ist die Versorgungsarterie der Cochlea. Sie ist eine der beiden Endäste der A. labyrinthina, welche der A. cerebelli anterior inferior entspringt, einem Hauptast der A. basilaris. Die A. cochlearis propria verläuft gemeinsam mit dem Nervus cochlearis im Modiolus, wo sie sich in drei bis vier Äste aufzweigt. Die Cochlea ist wegen des hohen Energieverbrauches durch die Hörtransduktion ein sehr ischämieempfindliches Organ. Das Haupttriebwerk oder „Batterie“ der Hörtransduktion ist die Stria vascularis. Sie generiert das endocochleäre Potential (+80 mV) und erhält die hohe endolymphatische K^+ -Konzentration (150 mmol/l) aufrecht (Tasaki & Spyropoulos, 1959; Davis, 1965; Wangemann *et al.*, 1995). Unter hypoxischen Bedingungen sind die energetischen Reserven der Stria Vascularis in wenigen Minuten aufgebraucht, was den Zusammenbruch des endocochleären Potentials zur Folge hat (Thalmann *et al.*, 1972; Thalmann *et al.*, 1979). Ohne die Triebkraft des endocochleären Potentials lässt sich die Hörtransduktion nicht aufrecht erhalten. Die Blutflussregulation der A. cochlearis propria ist von großem Interesse, da eine Beeinträchtigung des Blutflusses dieser Arterie mit der Pathogenese des Hörsturzes und Symptomen wie Tinnitus vergesellschaftet sein könnte. Der Blutfluss ist abhängig vom Gefäßdurchmesser, der vom Kontraktionszustand der glatten Gefäßmuskelzellen bestimmt und durch Vasokonstriktoren und -dilatoren reguliert wird. Zu den stärksten Vasokonstriktoren gehören die Endotheline (Yanagisawa *et al.*, 1988; Rubanyi & Polokoff, 1994). Endotheline sind Oligopeptide, die in drei Isoformen auftreten: ET-1, ET-2 und ET-3 (Inoue *et al.*, 1989a). ET-1 ist im Hinblick auf die Vasoregulation die wichtigste Isoform. ET-1 wird hauptsächlich von Endothelzellen und in geringerem Ausmaß von glatten Gefäßmuskelzellen und perivaskulären Nervenzellen produziert. ET-1

wird nicht in Form von Granula in den Endothelzellen gespeichert (Nakamura *et al.*, 1990), sondern innerhalb von wenigen Minuten nach Reizen wie Hypoxie, Ischämie oder Scherkräften transkribiert, synthetisiert und sezerniert. Die Halbwertszeit der ET-1 mRNA beträgt etwa 15-20 Minuten und die Plasmahalbwertszeit für ET-1 beträgt 4-7 Minuten (Inoue *et al.*, 1989b). Diese Umstände erlauben es den Endothelzellen, die ET-1 Syntheserate rasch zu verändern und somit den Gefäßtonus zu regulieren. Endothelzellen sezernieren 75-90% ihrer ET-1 Produktion in das abluminale Interstitium (Yoshimoto *et al.*, 1991; Unoki *et al.*, 1999), wo es mit Endothelinrezeptoren auf den Gefäßmuskelzellen und perivaskulären Nervenzellen interagiert und zudem autokrin auf die sezernierenden Endothelzellen zurückwirkt. Nur ein geringer Anteil, nicht mehr als 25% der ET-1 Gesamtproduktion, wird in die Blutbahn sezerniert. Die Plasmakonzentration von ET-1 liegt im picomolaren Bereich (Lam *et al.*, 1991) während die Schwellenkonzentration für die ET-1 induzierten Vasokonstriktionen meist im nanomolaren Bereich liegt (Rubanyi & Polokoff, 1994). Da das Blutvolumen um ein Tausendfaches größer ist als das des interstitiellen Raumes, können in letzterem Kompartiment dennoch die physiologisch relevanten Konzentrationen von ET-1 erreicht werden. Aus diesen Gründen ist ET-1 in den meisten Gefäßbetten als ein parakrin/ autokrin wirkendes Hormon anzusehen.

Rezeptoren für Endotheline existieren in Form von zwei Rezeptorsubtypen: ET_A- und ET_B-Rezeptoren (Nakamuta *et al.*, 1991; Adachi *et al.*, 1991; Cyr *et al.*, 1991; Sakurai *et al.*, 1990). Beide Rezeptorsubtypen können endothelin-induzierte Konstriktionen vermitteln. ET_A-Rezeptoren kommen am häufigsten auf Gefäßmuskelzellen vor und sind hauptverantwortlich für endothelin-induzierte Konstriktionen. ET_B-Rezeptoren werden in den meisten Gefäßbetten hauptsächlich auf Endothelzellen exprimiert, wo sie über eine

Aktivierung der NO-Synthese eine Dilatation der Gefäßmuskulatur bewirken (Hirata *et al.*, 1993; Tsukahara *et al.*, 1994). In manchen Gefäßen werden ET_B-Rezeptoren auch von glatten Muskelzellen exprimiert und vermitteln dort eine Vasokonstriktion (LaDouceur *et al.*, 1993; Seo *et al.*, 1994; Haynes *et al.*, 1995; Pang *et al.*, 1998).

Um herauszufinden, über welchen Rezeptor ein bestimmter Effekt ausgelöst wird, können Agonisten und Antagonisten hilfreich sein, wenn sie für die verschiedenen Rezeptoren unterschiedlich wirksam sind. Die Wirksamkeit eines Agonisten an einem Rezeptor bezieht sich auf einen konkreten Effekt, der durch die Agonist-Rezeptor-Interaktion ausgelöst wird. Der beobachtete Effekt steht somit gewissermaßen am Ende der vom stimulierten Rezeptor aktivierten Signaltransduktionskette. Im konkreten Fall dieser Studie ist der beobachtete Effekt eine Vasokonstriktion oder -dilatation sowie die damit einhergehenden zytosolischen Ca²⁺-Änderungen. Charakteristisch für ET_A-Rezeptoren ist folgende Reihung der Wirksamkeit unterschiedlicher Agonisten: ET-1 > ET-3 >> Sarafotoxin S6c (Watanabe *et al.*, 1989; Rubanyi & Polokoff, 1994; Williams, Jr. *et al.*, 1991; Vigne *et al.*, 1990b). Für ET_B-Rezeptoren hingegen sind die Wirksamkeiten ähnlich: ET-1 = ET-3 = Sarafotoxin S6c (Watanabe *et al.*, 1989; Williams, Jr. *et al.*, 1991). Diese drei Agonisten sind somit ein hilfreiches Werkzeug, um ET_A- und ET_B-Rezeptoren voneinander zu unterscheiden. Anders als die endogenen Agonisten ET-1 und ET-3 ist Sarafotoxin S6c ein Schlangengift, welches ET_B-Rezeptoren wesentlich stärker aktiviert als ET_A-Rezeptoren (Kloog *et al.*, 1988). Es ist ebenso möglich ET_A- und ET_B-Rezeptoren mit Hilfe von Rezeptor-Antagonisten zu unterscheiden, wenn die gewählten Antagonisten unterschiedliche Affinitäten für die Rezeptoren haben. Antagonisten sind Substanzen, die an den Rezeptor binden, ohne selbst einen Effekt zu induzieren

und dabei den Effekt von Agonisten verhindern. Kompetitive Antagonisten binden reversibel an den Rezeptor und können durch genügend hohe Agonistenkonzentrationen vom Rezeptor verdrängt werden, sodass sich letztendlich der maximale Effekt einstellt (siehe Material und Methoden, 4. Pharmakologie). In dieser Studie wurden die kompetitiven Antagonisten BQ-123 und BQ-788 verwendet (Ishikawa *et al.*, 1994; Ihara *et al.*, 1995). BQ-123 hat eine höhere Affinität für ET_A-Rezeptoren, während BQ-788 eine höhere Affinität für ET_B-Rezeptoren hat.

Der Signaltransduktionsweg für ET_A-Rezeptoren führt in vielen Blutgefäßen über eine Aktivierung heterotrimerischer G-Proteine (G_{q/11}) und Phospholipase C (PLC) zu einer Freisetzung von Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) (siehe Abb.1). IP₃ aktiviert IP₃-Rezeptoren (IP₃R), die sich in den Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), welches den intrazellulären Calciumspeicher darstellt, befinden. Bindet IP₃ an diese Membranproteine, wirken sie wie Ca²⁺-Kanäle und Ca²⁺ fließt seinem Konzentrationsgradienten folgend aus den Speichern in das Zytosol (siehe Abb.1). Der daraus resultierende [Ca²⁺]_i-Anstieg aktiviert die Ca²⁺-Calmodulin (CaM) abhängige Myosinleichtenkettenkinase (MLCK), die über eine Phosphorylierung der regulatorischen leichten Ketten des Myosins (MLC₂₀) die Konstriktion einleitet (Somlyo *et al.*, 1985; Hartshorne, 1987; Simonson & Dunn, 1990).

Die zytosolischen Ca²⁺-Speicher sind nicht nur an IP₃-vermittelten Konstriktionen beteiligt, sondern spielen auch eine wichtige Rolle in einem Rückkopplungsmechanismus, über den der Gefäßruhetonus reguliert wird (siehe Abb.1). Der Ruhetonus ist der sich in der Summierung aller Einflüsse einstellende Tonus des Gefäßes. Als weitere regulative Elemente sind Ryanodin-Rezeptoren (RyaR), die wie die IP₃-Rezeptoren in der Membran des SR

lokalisiert sind, in diesen Rückkopplungsmechanismus eingebunden. RyaR sind ebenfalls Ca^{2+} -Kanäle, deren Öffnungswahrscheinlichkeit mit dem Pflanzenalkaloid Ryanodine konzentrationsabhängig verändert werden kann, deren physiologischer Agonist aber das zytosolische Ca^{2+} ist. RyaR sind auf dem SR unmittelbar unter der Plasmamembran anzutreffen (Abstand RyaR zur Plasma-

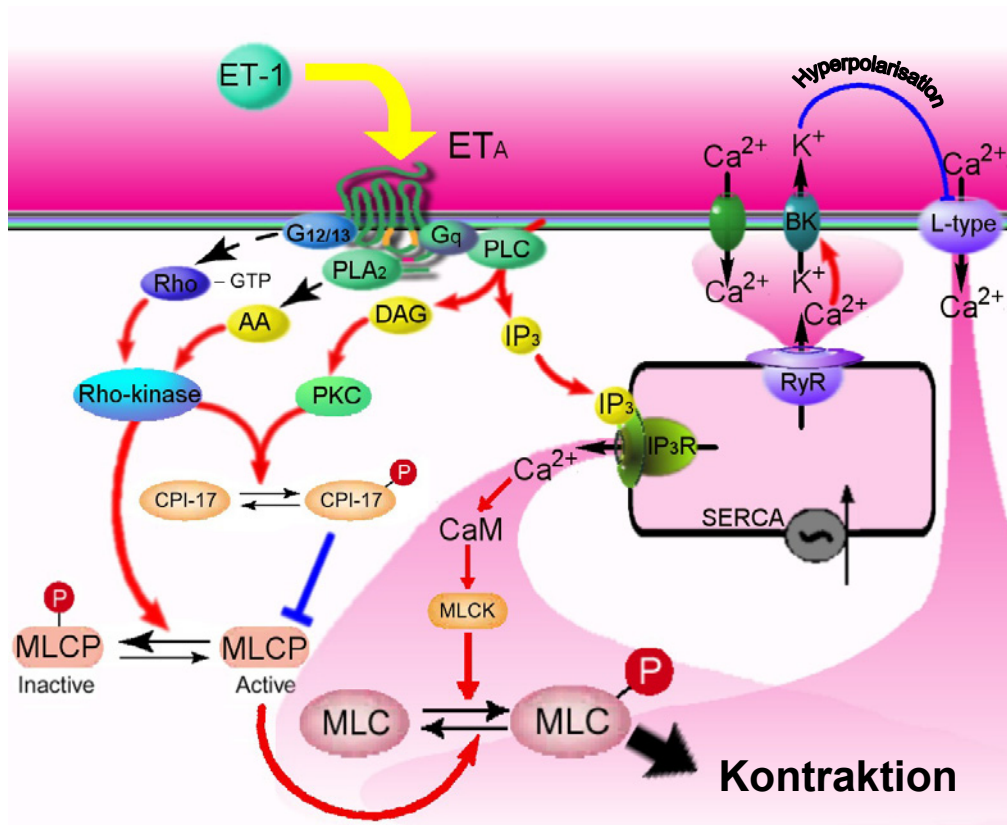


Abb.1: Postuliertes Modell der Signaltransduktionswege von ET_A -Rezeptoren an glatten Gefäßmuskelzellen:

Die einzelnen Signaltransduktionswege sind in unterschiedlichen Gefäßbetten oder anhand von Zellmodellen beschrieben worden. ET_A -Rezeptoren aktivieren über $\text{G}_{q/11}$, PLC und IP_3 eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern. Der daraus folgende $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg aktiviert die Ca^{2+} -Calmodulin (CaM) abhängige Myosin Leichtkettenkinase (MLCK), die über eine Phosphorylierung der Myosin Leichtketten (MLC) die Konstriktion einleitet. G-Protein gekoppelte Rezeptoren können jedoch den Phosphorylierungszustand der MLC ebenfalls bei konstanten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erhöhen, einem Mechanismus, der als Ca^{2+} -Sensibilisierung der Myofilamente definiert ist. Diese Ca^{2+} -unabhängige Konstriktion wird durch unterschiedliche Proteinkinasen ausgelöst, die als gemeinsames Ziel die Myosin Leichtkettenphosphatase (MLCP) inaktivieren und dadurch verhindern, dass MLC dephosphoryliert wird. Die Transduktionswege, die eine Ca^{2+} -Sensibilisierung vermitteln, sind für ET_A -Rezeptoren nur teilweise bekannt (detaillierte Beschreibung im Text).

AA = Arachidonsäure; PLA_2 = Phospholipase A_2 ; BK = Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle; DAG = Diacylglycerol; IP_3 = Inositol Triphosphat; IP_3R = IP_3 -Rezeptor; L-type = L-type Ca^{2+} -Kanäle; PLC = Phospholipase C; RyR = Ryanodine Rezeptor; SERCA = sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase.

membran ca. 20 nm)(Herrmann-Frank *et al.*, 1991). Diese Ryanodine-Rezeptoren bilden gemeinsam mit Ca^{2+} -sensitiven K^+ -Kanälen (BK_{Ca}) und L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen der Plasmamembran eine funktionelle Einheit. Beim lokalisierten Anstieg des submembranären $[\text{Ca}^{2+}]_i$ werden die Ryanodine-Rezeptoren aktiviert. Die geöffneten Ryanodine-Rezeptoren lassen Ca^{2+} in den subplasmalemmlen Raum strömen, was hier einen lokalisierten Ca^{2+} -Anstieg (Ca^{2+} -Spark) auslöst (Nelson *et al.*, 1995; Perez *et al.*, 1999). Dieser lokale subplasmalemmale Ca^{2+} -Anstieg aktiviert BK_{Ca} K^+ -Kanäle in der Plasmamembran. Die daraus resultierende erhöhte K^+ -Leitfähigkeit hyperpolarisiert die Plasmamembran, wodurch sich spannungsabhängige L-Typ Ca^{2+} -Kanäle schließen. Dies führt zum $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Abfall mit einhergehender Gefäßdilatation (Knot *et al.*, 1998; Jaggar *et al.*, 2000). Ryanodine-Rezeptoren, sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA) und IP_3 -Rezeptoren können pharmakologisch geblockt und/oder aktiviert werden, wodurch sich der Beitrag der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher auf die ET-1 vermittelte Konstriktion untersuchen lässt. Das Alkaloid Thapsigargin blockt die sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA) (Sagara & Inesi, 1991; Wictome *et al.*, 1992; Kijima *et al.*, 1991). SERCA pumpt kontinuierlich Ca^{2+} in das sarkoplasmatische Retikulum um dessen hohe $[\text{Ca}^{2+}]$ aufrecht zu erhalten. Wird sie und somit auch die Wiederaufnahme von Ca^{2+} in die intrazellulären Speicher geblockt, laufen die Speicher leer. Ryanodine-Kanäle können mit Ryanodine aktiviert oder inhibiert werden. Konzentrationen über 3 $\mu\text{mol/l}$ wirken inhibierend, während niedrigere Konzentrationen die Ryanodine-Kanäle aktivieren (Jaggar *et al.*, 2000).

Die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Myosin Leichtkettenkinase (MLCK) leitet über die Phosphorylierung der 20-kDa regulatorischen Leichtketten des Myosins (MLC_{20}) die Kontraktion von glatten Muskelzellen ein. Limitiert wird dieser

Prozess durch Abfall der intrazellulären $[Ca^{2+}]$ sowie durch Dephosphorylierung der MLC_{20} . Letzteres wird von der Ca^{2+} -unabhängigen, heterotrimerischen Myosin-Leichtkettenphosphatase (MLCP) ausgeführt (Hartshorne, 1987; Somlyo & Somlyo, 1994; Hartshorne *et al.*, 1998). Da eine Inhibition der MLCP, unabhängig von $[Ca^{2+}]_i$ zu einer verstärkten MLC_{20} -Phosphorylierung und Konstriktion führt, wurde dieser Mechanismus „ Ca^{2+} -Sensibilisierung“ genannt (Kitazawa *et al.*, 1991a; Kitazawa *et al.*, 1991b). In einigen Präparationen ist eine Ca^{2+} -Sensibilisierung durch ET-1 beschrieben worden (Kodama *et al.*, 1989; Ozaki *et al.*, 1989; Sakata *et al.*, 1989; Nishimura *et al.*, 1992; Sudjarwo *et al.*, 1995; Evans *et al.*, 1999; Ozaki *et al.*, 1989; Sakata *et al.*, 1989; Nishimura *et al.*, 1992; Sudjarwo *et al.*, 1995; Evans *et al.*, 1999). Transduktionswege über die eine ET-1 induzierte Ca^{2+} -Sensibilisierung vermittelt sein könnte, sind in Abb.1 schematisch dargestellt.

Die MLCP reguliert die Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente, da sie der Phosphorylierung der Myosin Leichtketten (MLC_{20}) entgegenwirkt (Alessi *et al.*, 1992; Shimizu *et al.*, 1994; Shirazi *et al.*, 1994). MLCP kann durch zwei unterschiedliche Proteinkinasen inaktiviert werden: Proteinkinase C (PKC) und Rho-Kinase (siehe Abb.1) (Li *et al.*, 1998; Somlyo *et al.*, 1999; Somlyo & Somlyo, 2000; Fukata *et al.*, 2001). Letztere, Rho-Kinase, inaktiviert die MLCP durch eine Phosphorylierung der katalytischen Bindungsstelle (Kimura *et al.*, 1996). Die Aktivierung von Rho-Kinase kann durch Arachidonsäuremetabolite und RhoA-GTP vermittelt werden (Resink *et al.*, 1989; Gong *et al.*, 1992; Fu *et al.*, 1998; Gohla *et al.*, 2000; Araki *et al.*, 2001). Ein sehr effektives Werkzeug, um die Beteiligung der Rho-Kinase an der Ca^{2+} -Sensibilisierung zu untersuchen, ist der Rho-Kinase Antagonist Y-27632 (Uehata *et al.*, 1997). Die zweite Proteinkinase die zu einer Inaktivierung der MLCP führt, ist Proteinkinase C (PKC) (siehe

Abb.1). PKC phosphoryliert das Phosphoprotein CPI-17, welches dann die katalytische Einheit der MLCP blockiert (Li *et al.*, 1998; Kitazawa *et al.*, 2000). Es gibt ebenfalls Anhalt dafür, dass CPI-17 von Rho-Kinase aktiviert werden kann (Koyama *et al.*, 2000) (siehe Abb.1) wodurch diese beiden Ca^{2+} -Sensitisierungsmechanismen gekoppelt wären.

Da Endotheline über den glattmuskulären ET_A -Rezeptor Vasokonstriktionen induzieren, verringern sie in vielen Organgebieten, einschließlich der Cochlea, den Blutfluss (Quirk *et al.*, 1992; Jinnouchi *et al.*, 1997; Jinnouchi, 2001). Diese Reduktion des cochleären Blutflusses mag teilweise durch ET_A -Rezeptor vermittelte Vasokonstriktionen von Blutgefäßen in der lateralen Wand der Cochlea zu erklären sein (Sadanaga *et al.*, 1997). Ob es Endothelinrezeptoren auf der A. cochlearis propria gibt, ist bisher unbekannt. Die Signaltransduktionswege von Endothelinrezeptoren ist hauptsächlich an großen „Transportgefäßen“ (Aorta, A. femoralis, A. carotis communis) untersucht worden, und auch hier sind die Transduktionswege nur teilweise bekannt. Erkenntnisse, die an großen Arterien gewonnen werden, können nur bedingt auf Mikrogefäße wie die A. cochlearis propria übertragen werden. Bereits der grundverschiedene anatomische Aufbau dieser Gefäße deutet auf die unterschiedlichen physiologischen Aufgaben, denen sie gerecht werden müssen, hin. Die Bedürfnisse der einzelnen Gewebe und Endorgane werden in der Mikrozirkulation reguliert, die, besonders im Falle der A. cochlearis propria, noch weitgehend unerforscht geblieben ist. Ziel dieser Arbeit war es aufzuklären, ob die A. cochlearis propria auf Endotheline reagiert, welcher Rezeptor diese Antwort vermittelt und über welche Signaltransduktionswege der Effekt ausgeführt wird.

Teile dieser Arbeit wurden auf Kongressen vorgestellt (Scherer *et al.*, 2000; Scherer & Wangemann, 2001a; Scherer & Wangemann, 2001b) und publiziert (Scherer *et al.*, 2001).

II. Materialien und Methoden

1.) Präparation der *A. cochlearis propria*

Die Experimente wurden an Geweben von Wüstenrennmäusen (*Meriones unguiculatus*) durchgeführt. Die Wüstenrennmäuse wurden mit Natrium-Pentobarbital (100 mg/Kg i.p.) anästhesiert und dekapitiert. Dieses Protokoll wurde von der Ethikkommission „Institutional Animal Care and Use at Kansas State University“ genehmigt. Die *A. cochlearis propria* wurde mikrochirurgisch aus dem cochleären Modiolus isoliert. Dafür wurden zunächst die Felsenbeine aus der Schädelbasis gewonnen, eröffnet und in eine mit physiologischer Kochsalzlösung (siehe Lösungen) gefüllten Dissektionskammer platziert (Abb. 2A). Die Lösung in der Dissektionskammer wurde konstant auf 4⁰C gehalten. Die cochleäre Kapsel wurde eröffnet, wonach die *A. cochlearis propria* durch die dünne knöcherne Wand des Modiolus bereits sichtbar ist (Abb. 2B und 2C). Anschließend wurde die knöcherne Wand des Modiolus abgetragen und die *A. cochlearis propria*, die sich lose um den Nervus cochlearis windet, isoliert (Abb. 2D). Es wurde jegliches Dehnen und direktes Fassen der Arterie vermieden. In der Abb. 2E ist die komplette *A. cochlearis propria* mit ihren drei Hauptästen zu sehen. Ein etwa 300 µm langes Segment wurde jeweils in die Superfusionskammer der Messeinheit transferiert (Abb.2F). Insgesamt weist die *A. cochlearis propria* eine Länge von etwa 5-8 mm auf und ihr mittlerer Durchmesser beträgt etwa 60 µm. Sie weist nur eine einzige Lage glatter Muskelzellen auf, wie durch elektronenmikroskopische Untersuchungen gezeigt wurde (Wangemann *et al.*, 1998). Eine detaillierte Beschreibung der Dissektion erfolgte bereits an anderer Stelle (Wangemann & Gruber, 1998).

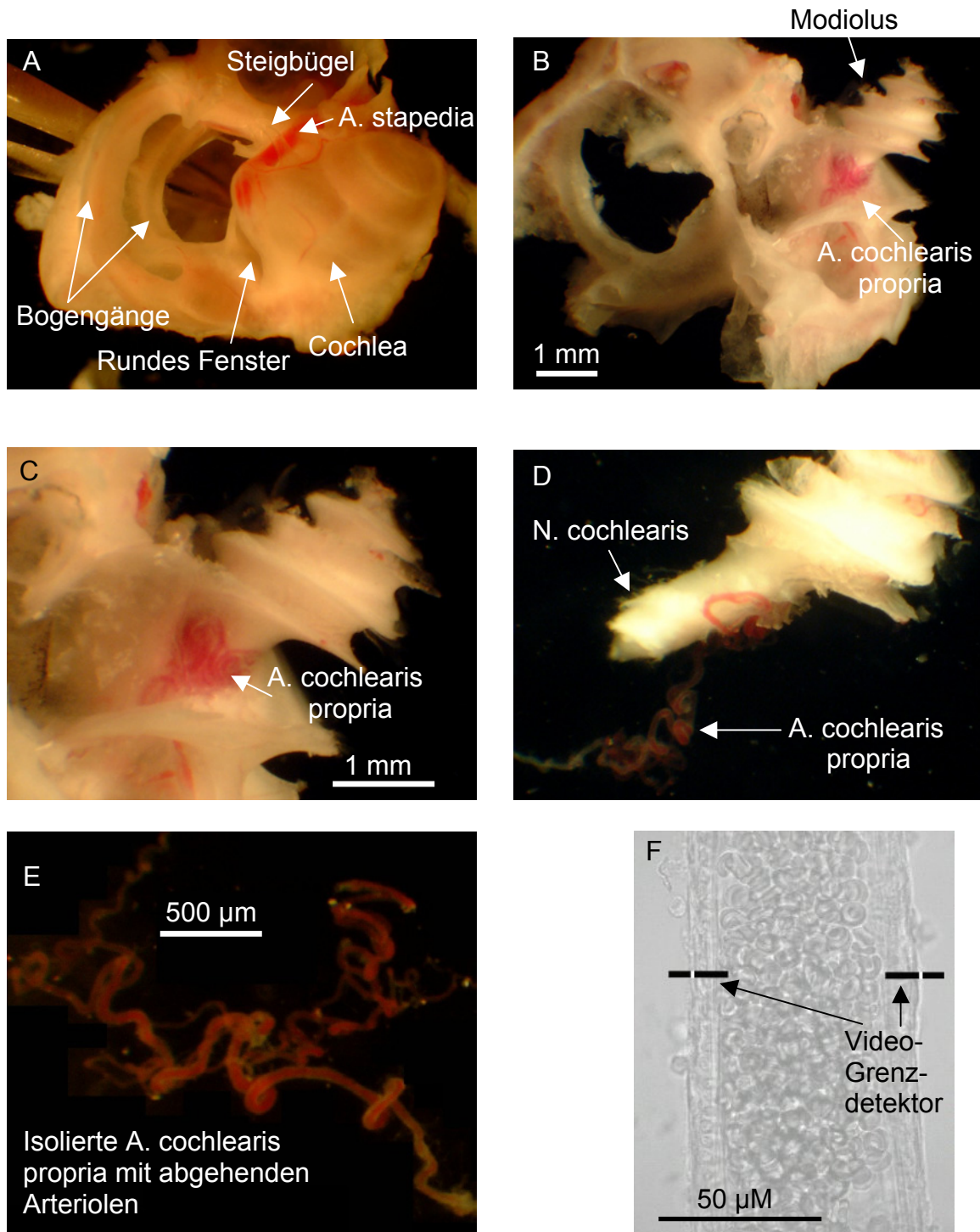


Abb.2: Präparation der A. cochlearis propria:

A) Eröffnetes rechtes Felsenbein. Ansicht von ventro-cranial. Man erkennt die A. stapedia, die durch den Steigbügel verläuft. Diese Arterie kommt nur bei Nagern vor. Links im Bild verlaufen die Bogengänge. **B)** Die Cochlea wurde eröffnet und die laterale Wand entfernt. Die A. cochlearis propria lässt sich durch die dünne Knochenschicht des Modiolus erkennen. **C)** Vergrößerte Ansicht des Modiolus. **D)** Die A. cochlearis propria windet sich lose um den N. cochlearis. Der knöcherne Modiolus wurde teilweise entfernt. **E)** Isolierte A. cochlearis propria mit abgehenden Arteriolen. **F)** Segment der A. cochlearis propria, nachdem es in die Versuchsbadkammer transferiert wurde. Der Gefäßdurchmesser der Arterie wird mit Hilfe eines Video-Grenzdetektors gemessen. (Abb.F mit freundlicher Genehmigung von P. Wangemann).

2.) Simultanmessung von Gefäßdurchmesser und intrazellulärem Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)

Der Gefäßdurchmesser und die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) wurden simultan gemessen. Dafür müssen Video- und Fluoreszenzmikroskopie gleichzeitig angewendet werden, ohne dass sich beide Messverfahren gegenseitig stören. Bei der Fluoreszenzmikroskopie wird ein Fluoreszenzfarbstoff mit Licht einer Wellenlänge angeregt, die dieser Farbstoff besonders gut absorbiert. Der angeregte Farbstoff emittiert daraufhin Licht einer höheren Wellenlänge. Um die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu messen, wird ein Fluoreszenzfarbstoff gewählt, dessen Emissionsintensität sich proportional zu den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Veränderungen verhält. Dies ist bei Fluo-4 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) der Fall. Dieser Farbstoff wird an Acetoxymethylester-Gruppen (AM) gebunden (Fluo-4-AM), welche ihm die nötige Lipophilie verleihen, um durch die Zellmembran in die Zellen diffundieren zu können. Einmal in eine Zelle diffundiert, werden die Acetoxymethylester-Gruppen von intrazellulären Esterasen abgespalten. Da Fluo-4 ein polares Molekül ist, kann es nicht wieder aus der Zelle hinausdiffundieren. Damit Fluo-4-AM seine Fluoreszenz entfalten kann, müssen die AM-Gruppen abgespalten und Fluo-4 an Ca^{2+} gebunden sein. Abb. 3 zeigt das Absorptions- und Emissionsspektrum von Fluo-4. Das Absorptionsmaximum für Fluo-4 (im Ca^{2+} -gebundenen Zustand) liegt bei 494 nm (blaues Licht) und das Emissionsmaximum bei 516 nm (grünes Licht). Um zusätzlich zur Fluoreszenz ein Videobild des Gefäßes zu generieren, muss das Präparat mit Licht einer Wellenlänge beleuchtet werden, die weit oberhalb des Fluoreszenzspektrums im Rotbereich (>600 nm) liegt. Die für die Simultanmessung von Gefäßdurchmesser und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verwendete Messapparatur ist in Abb. 4 schematisch dargestellt.

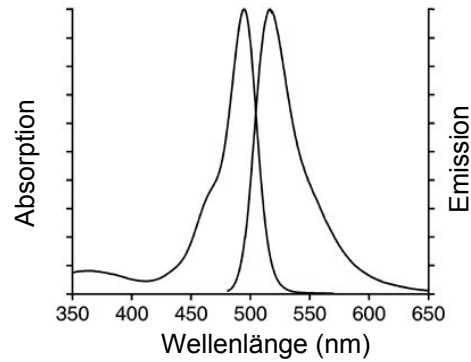


Abb.3: Absorptions- und Emissionsspektren von Fluo-4:

Die linke Kurve zeigt das Absorptionsspektrum während die rechte dem Emissionsspektrum entspricht. Das Absorptionsmaximum von Fluo-4 liegt bei 494 nm, das Emissionsmaximum bei 516 nm (Entnommen aus dem Handbuch von Molecular Probes).

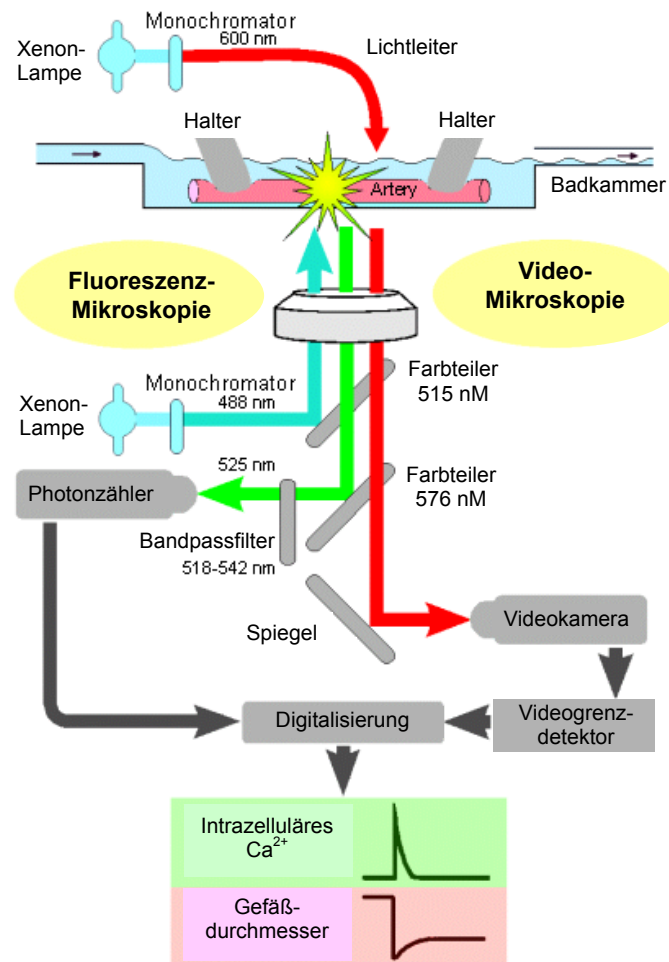


Abb. 4: Schematische Darstellung der Simultanmessung für $[Ca^{2+}]_i$ - und Gefäßdurchmesseränderungen mit Fluo-4 Microfluometrie und Videomikroskopie. Modifiziert nach (Scherer *et al.*, 2001).

Für die Simultanmessung wird ein 250 bis 350 µm langes Segment der A. cochlearis propria für 35 Minuten bei 37⁰C in 5 µmol/l Fluo-4-AM enthaltender physiologischen Kochsalzlösung inkubiert. Anschließend wird das Gefäßsegment in die Messbadkammer transferiert, die sich auf dem Objektisch eines invertierten Mikroskops (Diaphot, Nikon, Japan) befindet. Das Gefäßsegment wird mit Hilfe von zwei an Mikromanipulatoren (Narashige, Japan) montierten, abgerundeten Glaspipetten am Boden der Badkammer fixiert (siehe Abb.2F). Das Gefäß wird anschließend mit ca. 9 ml/min superfundiert, was einer Perfusionsrate von 2.5 Badkammervolumen pro Sekunde entspricht. Alle Experimente wurden bei 37⁰C durchgeführt. Das Präparat wird abwechselnd mit Licht von 488 und 600 nm Wellenlänge beleuchtet (Deltascan, Photon Technology, South Brunswick, NJ, USA). Monochromatisches Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm (blau) wird mit Hilfe eines Farbteilers (dichroitischen Spiegel) (Omega Optical, Brattleboro, VT, USA), der ein Spektrum bei 515 nm teilt, über ein 40x Objektiv zum Präparat hin reflektiert. Im Präparat regt dieses Licht den Farbstoff Fluo-4 zur Fluoreszenz an. Das emittierte Fluoreszenzspektrum wird von dem 515 nm Farbteiler weitgehend durchgelassen und von einem weiteren Farbteiler, der Spektren bei 576 nm aufteilt, zum Photonzähler hin reflektiert. Das Fluoreszenzlicht wird dann von einem Bandpassfilter (Chroma Technology, Brattleboro, VT, USA) auf Wellenlängen zwischen 518 und 542 nm reduziert. Die an dieser Stelle im Strahlengang verbleibende Lichtintensität entspricht weitgehend der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration. Das Fluoreszenzlicht wird dann durch einen Photonzähler in seiner Intensität erfasst. Die Intensitätsmessung wird mit einer Frequenz von 10 Hz aufgezeichnet (Photon Technology, South Brunswick, NJ, USA). Die Änderungen in der Emissionsintensität wurden als Änderungen der [Ca²⁺]_i gewertet. Licht der Wellenlänge 600 nm

wird mit Hilfe eines Lichtleiters, der über der Badkammer platziert wird, auf das Präparat geleitet. Das 600 nm Licht passiert die 515 und 576 nm dichroitischen Spiegel und wird von einer gekühlten CCD-Videokamera (C5985, Hamamatsu, Japan) mit einer Frequenz von 1.5-2.5 Hz aufgezeichnet. Die Videobilder werden mit einem Zeitsignal (Time Code Generator, Fast Forward Video, Irvine, CA, USA) gemischt, auf einen Bildschirm dargestellt (PVM-137, Sony, Japan) und auf Videoband aufgezeichnet (AG-1960, Panasonic, Japan). Der äußere Gefäßdurchmesser wird über einen Video-Grenzdetektor bestimmt (video edge detector, Crescent Electronics, East Sandy, UT, USA). Der Video-Grenzdetektor erkennt Hell-Dunkel-Kontraste und somit die Grenzen der äußeren Gefäßwand (siehe Abb.2F). Die kalibrierten Entfernungen zwischen den Grenzdetektoren werden sowohl online mit einem Chart-Rekorder aufgezeichnet (Kipp & Zonen, Niederlande) als auch mit einer Frequenz von 10 Hz digitalisiert und gespeichert (Photon Technology). Für nachfolgende Auswertungen wurden die Daten in Form von ASCII-Dateien gespeichert (Origin 6.0, Microcal Software, Northampton, MA, USA).

Um zu zeigen, dass die Fluo-4 Fluoreszenz von glatten Muskelzellen emittiert wird und nicht von Endothelzellen oder intraluminalen Zellen, wurden Gefäßsegmente mit Fluo-4 geladen und mit einem konfokalen Lasermikroskop untersucht (LSM5 Pascal, Carl Zeiss, Jena) (siehe Abb. 5). Das Fluo-4-Inkubationsprotokoll wurde unverändert eingehalten. Die Gefäßsegmente wurden für 35 Minuten mit Fluo-4-AM beladen, anschließend mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, in eine Objektträger-Mikroammer transferiert und sofort untersucht. Das Fluoreszenzmuster der A. cochlearis propria entsprach ausschließlich den zirkulär verlaufenden glatten Muskelzellen (Abb.5). Durch das angewendete Inkubationsprotokoll wurden weder Endothelzellen noch

intravasale Zellen mit dem Ca^{2+} -Indikator beladen. Diese Ergebnisse zeigen, dass unspezifische Fluoreszenzemissionen, welche die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messungen stören würden, vernachlässigt werden können.

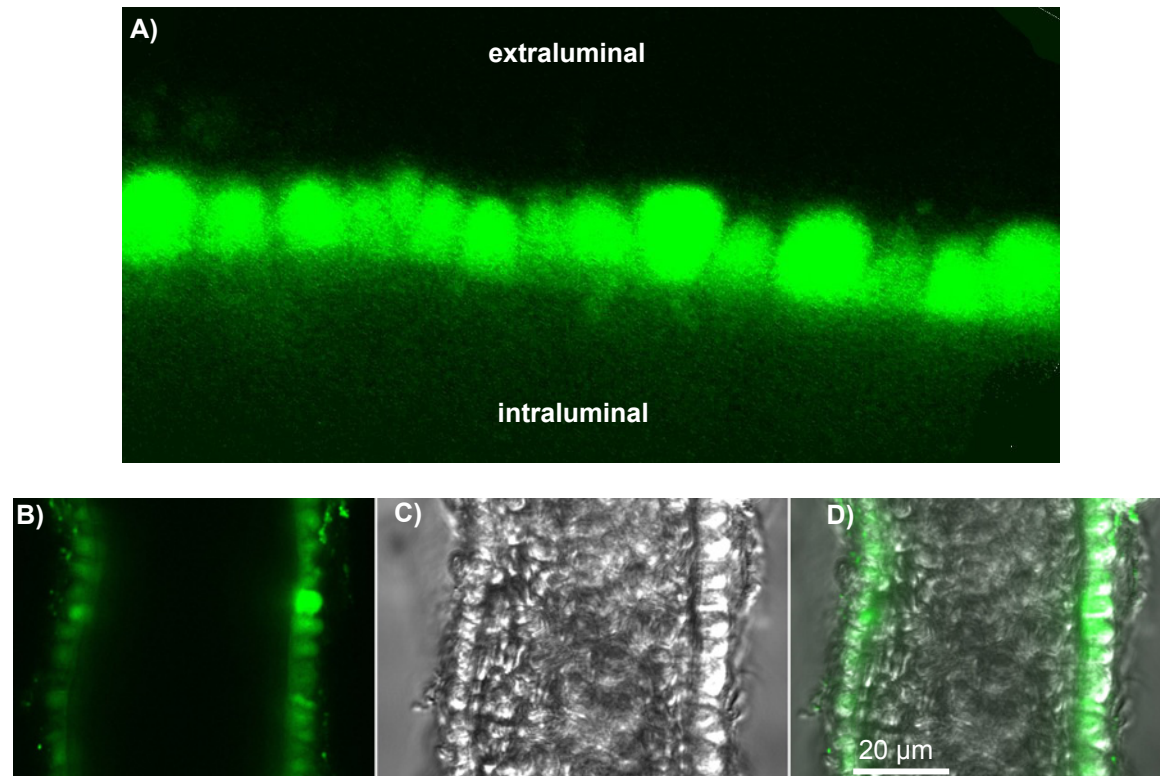


Abb. 5: Konfokale lasermikroskopische Darstellung intrazellulärer Ca^{2+} -Fluoreszenz von Gefäßmuskelzellen der *A. cochlearis propria*:

Ein Gefäßsegment der *A. cochlearis propria* wurde für 35 Minuten mit Fluo-4 AM geladen. Abb **A)** zeigt einen Ausschnitt der Gefäßwand der *A. cochlearis propria*. Das ringförmige Fluoreszenzmuster entspricht der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Fluoreszenzemission der glatten Muskelzellen der Gefäßwand. Die Muskelzellschicht der *A. cochlearis* besteht aus nur einer Zellschicht. Würden Endothelzellen geladen, wäre ein längs verlaufendes Fluoreszenzmuster zu erwarten. Abb. **B)** zeigt einen Gesamtquerschnitt durch die Arterie. **C)** entspricht dem korrespondierenden Mikroskopbild und in **D)** ist die Fluo4 Fluoreszenzemission auf das Mikroskopbild projiziert worden.

3.) Lösungen und Reagenzien

Die physiologische Kochsalzlösung enthielt (in mmol/l) 150 NaCl, 5.0 HEPES, 3.6 KCl, 1.0 CaCl_2 und 5.0 Glucose. Der pH wurde mit 1 N NaOH auf 7.4 titriert. In einigen Experimenten wurde die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration durch Hinzufügen von CaCl_2 auf 10 mmol/l erhöht. Maximale Vasodilatation wurde durch Superfusion mit Ca^{2+} -freier Lösung erzielt. Diese nominal Ca^{2+} -freie

Lösung enthielt (in mmol/l) 150 NaCl, 5.0 HEPES, 3.6 KCl, 1.0 MgCl₂, 1.0 EGTA und 5.0 Glucose, pH = 7.4. BQ-123 und Sarafotoxin S6c wurden von Calbiochem (San Diego, CA, USA) bezogen. Y27632 wurde freundlicherweise von Welfide Corporation (Osaka, Japan) zur Verfügung gestellt. Alle anderen Chemikalien wurden von Sigma (St. Louis, MO, USA) bezogen.

4.) Pharmakologische Analyse

Der Effekt eines Agonisten ist proportional zur Fraktion agonist-besetzter Rezeptoren. Der maximale Effekt stellt sich dann ein, wenn alle Rezeptoren vom Agonisten besetzt werden. Diese von A.J. Clark (Clark, 1933) aufgestellte Rezeptortheorie gilt, wenn die Agonist-Rezeptor-Bindung reversibel und dadurch auch der Effekt reversibel ist. Wenn man davon ausgeht, dass der Agonist (Ago) mit dem Rezeptor (R) reversibel interagiert und sich der maximale Effekt dann einstellt, wenn alle Rezeptoren vom Agonisten besetzt sind, lässt sich folgende Gleichung aufstellen:



Die Beziehung zwischen dem Effekt (E) und der freien Konzentration des Agonisten [Ago] wird für dieses Modell von folgender Formel beschrieben:

$$E = E_{max} \times [\text{Ago}] / (K_D + [\text{Ago}]) \quad (\text{II.})$$

K_D ist die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Agonist-Rezeptor-Komplexes und entspricht k_2/k_1 . E_{max} ist der maximale Effekt, der vom Agonisten induziert werden kann. Die Fraktion der Rezeptoren, die vom Agonisten besetzt sind, ist gleich $[\text{Ago}] / (K_D + [\text{Ago}])$. Gleichung (II.) beschreibt eine einfache, rechtwinklige Hyperbel und ist analog zur Michaelis-Menten Gleichung, die die

Interaktion zwischen Enzym und Substrat beschreibt (siehe Abb.6A). Es ist günstiger die Agonistenkonzentration auf einer logarithmischen Skala aufzutragen, um eine große Spannweite von Agonistenkonzentrationen darstellen zu können. Die logarithmische Skalierung ergibt die geläufige sigmoidale Dosis-Wirkungskurve (siehe Abb.6B). Die logarithmische Darstellung hat zusätzlich den Vorteil, dass man die Wirksamkeit unterschiedlicher Agonisten vergleichen kann. Der wichtigste Parameter um die Wirksamkeit von verschiedenen Agonisten zu vergleichen, ist der EC_{50} (die Agonistenkonzentration, die den halbmaximalen Effekt induziert). Der EC_{50} beschreibt die *Potenz* eines Agonisten. Je geringer der

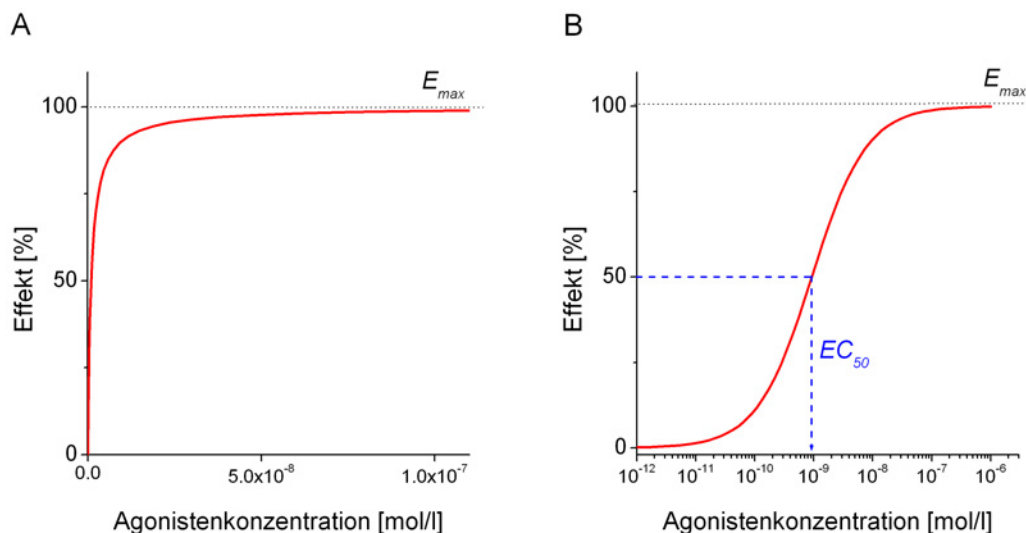


Abb. 6: Agonist-Rezeptor Wechselwirkung: **A)** Vereinfacht dargestellt, folgt die Bindung eines Agonisten an einen Rezeptor dem Massenwirkungsgesetz. Die Beziehung zwischen der Agonistenkonzentration (lineare Skala) und dem Effekt wird durch eine rechtwinklige Hyperbel beschrieben. **B)** Wird die Agonistenkonzentration auf einer logarithmischen Skala aufgetragen, wird die Dosis-Wirkungskurve sigmoidal. In einer Spanne von zwei Dekaden der Agonistenkonzentration spielt sich, zentriert um den EC_{50} , etwa 10-90% des Effektes ab (Kenakin, 1997).

EC_{50} , desto höher ist die *Potenz* des Agonisten. Ein Agonist, der nicht den vollen Effekt induzieren kann, wird als *partieller Agonist* definiert. Er weist einen geringeren E_{max} und somit eine geringere *Effektivität* auf als ein voller Agonist. Die *Effektivität* eines Agonisten wird durch den maximalen Effekt (E_{max}), den der Agonist induzieren kann, bestimmt (siehe Abb.7). EC_{50} und K_D sind gleich, wenn es eine lineare Beziehung zwischen Agonist-Rezeptorbindung und dem

biologischen Effekt gibt. Meistens findet jedoch in einer Zelle, einem Zellverband oder Gewebe eine Verstärkung der Agonist-Rezeptorbindung durch Signaltransduktionsketten und anderen Amplifikationsmechanismen statt, sodass der EC_{50} des beobachteten Effektes kleiner ausfällt als die K_D . Die Dosis- Wirkungskurve des beobachteten, amplifizierten Effektes ist dann, bezüglich der Agonist-Rezeptorbindungskurve, nach links verschoben (siehe Abb.8).

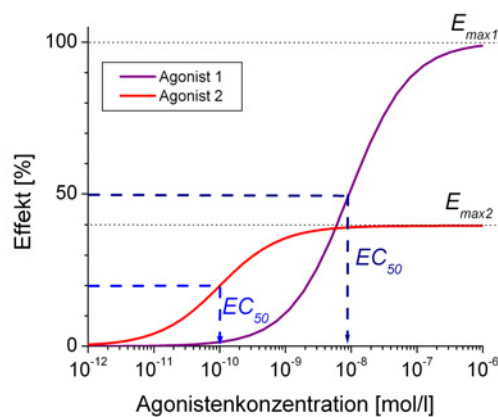


Abb.7: Agonisten und partielle Agonisten: Agonist 2 hat einen kleineren EC_{50} als Agonist 1 und daher eine größere *Potenz*. Agonist 1 erreicht jedoch einen größeren Effekt als Agonist 2 und hat daher eine größere *Effektivität*. Agonist 2 ist ein *partieller Agonist*, da er nicht den vollen Effekt induzieren kann.

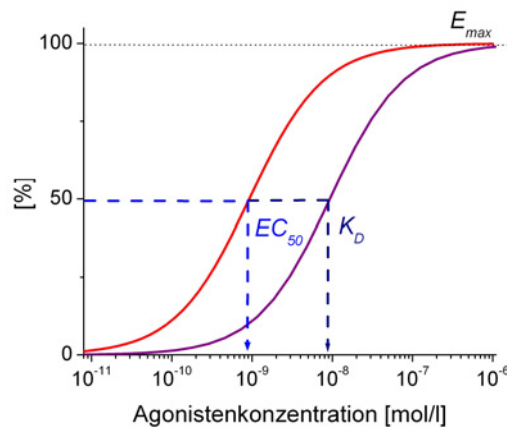


Abb.8: Vergleich der Agonist-Rezeptorbindungskurve (violett) mit der Dosis-Wirkungskurve (rot) des beobachteten Effektes. Die Dosis-Wirkungskurve (rot) ist in Bezug auf die Agonist-Rezeptorbindungskurve nach links verschoben, da zwischen Rezeptorbindung und Effekt eine Verstärkung stattgefunden hat. [%] steht im Fall Agonist-Rezeptorbindungskurve für den Prozentsatz agonist-gebundener Rezeptoren und im Fall der Dosis-Wirkungskurve für den Effekt.

Dosiswirkungskurven für Agonisten wurden in dieser Studie entweder nach einem *kumulativen* oder *pulsatilen Protokoll* erstellt. Beim *kumulativen*

Protokoll wurde die Konzentration des Agonisten schrittweise erhöht. So konnten unterschiedliche Agonistenkonzentrationen an einem Gefäßsegment getestet werden. Beim *pulsatilen Protokoll* wurde nur jeweils eine Konzentration des entsprechenden Agonisten pro Gefäßsegment getestet. In beiden Protokollen wurden Agonisten für jeweils zwei Minuten appliziert. Der von den Agonisten ausgelöste $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg wurde als Differenz zwischen erreichtem Peakwert und dem Wert unter Basalbedingungen berechnet. Die einhergehenden Konstriktionen wurden als Mittelwert des Gefäßdurchmessers bestimmt, der während der zweiten Applikationsminute erreicht wurde. Die Daten wurden auf den maximalen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg und die maximale Vasokonstriktion normalisiert, die durch Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von 1 auf 10 mmol/l ausgelöst wurden. Die Ca^{2+} -induzierte Antwort ist reproduzierbar, reversibel und hat keinen Einfluss auf den Basaltonus oder die basale $[Ca^{2+}]_i$ der A. cochlearis propria (Wonneberger *et al.*, 2000).

Die Dosis-Wirkungskurven wurden an die Daten mit Hilfe folgender Gleichung angepasst:

$$E = E_{max} \times [Ago]^h / (EC_{50}^h + [Ago]^h) \quad (III.)$$

E_{max} ist die maximal erreichte Konstriktion oder der maximal erreichte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg und E die relative Konstriktion oder $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in %. Der EC_{50} ist die Agonistenkonzentration, die den halbmaximalen Effekt auslöst, $[Ago]$ ist die Agonistenkonzentration, und h (Hill-Koeffizient) beschreibt die Steigung der Dosis-Wirkungskurve (Limbird, 1986). Für die Analyse der pulsatilen Experimente wurden alle Daten gemeinsam mit Gleichung (III.) einer Kurvenanpassung unterzogen, um den E_{max} , EC_{50} und h zu bestimmen (Origin 6.0, Microcal,

Northampton, MA, USA). Für die Analyse der kumulativen Experimente wurden zunächst alle Experimente gemeinsam mit Gleichung (III.) angepasst, um den EC_{50} , E_{max} und h zu bestimmen. Die Werte für E_{max} und h wurden übernommen, um den EC_{50} in jedem individuellen Gefäßabschnitt zu bestimmen. Nach logarithmischer Transformation der EC_{50} ($= pEC_{50}$) wurde deren Mittelwert und sem berechnet.

Ein Antagonist ist eine Substanz, die an den Rezeptor bindet ohne selbst einen Effekt auszulösen und den Effekt von Agonisten inhibiert. Wenn die Inhibition des Antagonisten überwunden werden kann, indem man die Konzentration des Agonisten erhöht und sich letztendlich derselbe maximale Effekt einstellt, spricht man von einem *kompetitiven Antagonisten*. Diese Art von Antagonismus wird meist bei denjenigen Antagonisten beobachtet, die reversibel an der Rezeptorbindungsstelle binden. Da mit genügend hohen Agonistenkonzentration nach wie vor der maximale Effekt erreicht wird, verschiebt ein kompetitiver Antagonist die Dosis-Wirkungskurve nach rechts (siehe Abb.9).

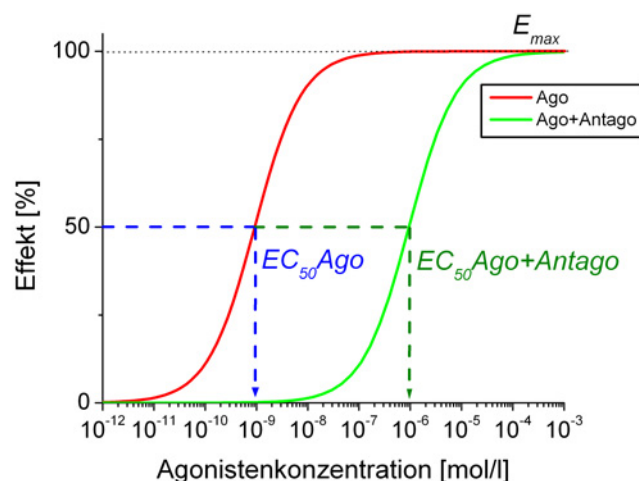


Abb.9: Kompetitiver Antagonismus:

Die Agonisten-Dosiswirkungskurve wird in Anwesenheit des kompetitiven Antagonisten parallel nach rechts verschoben. Der Agonist hat in Anwesenheit des Antagonisten eine geringere Potenz, kann jedoch weiterhin mit genügend hohen Konzentrationen den selben maximalen Effekt (E_{max}) erzielen. Anhand des Verhältnisses beider Dosiswirkungskurven, der *Dosis-Ratio*, kann die Affinitätskonstante (K_{DB}) des Antagonisten berechnet werden (Schild, 1957).

Der Agonist hat in der Anwesenheit des kompetitiven Antagonisten eine geringere Potenz. Die parallele Rechts-Verschiebung der Dosiswirkungskurve durch einen kompetitiven Antagonisten ermöglicht die Berechnung der Affinitätskonstante (K_{DB}) des Antagonisten in physiologischen Präparationen. Der Quotient der Agonistenkonzentration, die denselben Effekt in An- und Abwesenheit einer bestimmten Antagonistenkonzentration induziert, ist über die gesamte Dosiswirkungskurve konstant und wird Dosis-Wirkungsverhältnis oder auch *Dosis-Ratio* (DR) genannt. Die *Dosis-Ratio* wird mathematisch durch folgende Formel beschrieben:

$$DR = \frac{EC_{50} \text{ Agonist mit Antagonist}}{EC_{50} \text{ Agonist ohne Antagonist}} \quad (IV.)$$

Der K_{DB} wird anschließend über die Schild-Regression berechnet (Schild, 1957):

$$p(K_{DB}) = \log([Antago]) - \log(DR-1) \quad (V.)$$

$[Antago]$ ist die Konzentration des Antagonisten. In dieser Studie wurden die kompetitiven Antagonisten BQ-123 und BQ-788 verwendet. Die Affinitätskonstanten (K_{DB}) beider Antagonisten (BQ-123 und BQ-788) wurde mit Hilfe der Schild-Regression (V.) bestimmt und das Dosis-Wirkungsverhältnis (DR), wurde entsprechend Gleichung (VI.) berechnet:

$$DR = EC_{50} \text{ ET-1 mit Antagonist} / EC_{50} \text{ ET-1 ohne Antagonist} \quad (VI.)$$

EC_{50} Antagonist und EC_{50} ET-1 sind die EC_{50} Werte, die in Experimenten nach dem *kumulativen Protokoll*, in An- oder Abwesenheit von Antagonisten bestimmt wurden. EC_{50} Antagonist wurde mit Hilfe von Gleichung (III.) bestimmt, wo E_{max}

und h auf die Werte geklemmt wurden, die in Abwesenheit des Antagonisten bestimmt wurden.

5.) Statistik

Die Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung vom Mittelwert (sem) angegeben. Die Anzahl der Experimente (n) stellt die Anzahl der untersuchten Gefäßsegmente dar. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des gepaarten und ungepaarten Student t-Test.

III. Ergebnisse

Die von ET-1 ausgelösten Effekte wurden auf den vasokonstriktiven Effekt normiert, den eine Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} Konzentration von 1 auf 10 mmol/l hatte und der somit gleich 100% gesetzt wurde. Die 10 mmol/l Ca^{2+} -induzierten Konstriktionen und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege eignen sich zur Normalisierung der ET-1 induzierten Effekte, da sie ein unabhängiges Manöver darstellen. Es wurden insgesamt 199 Gefäßsegmente untersucht, die einen Durchmesser von $60.60 \mu\text{m} \pm 0.84$ hatten.

1.) ET-1 induzierte Vasokonstriktion und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg

ET-1 induzierte einen maximalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg von $159 \pm 13\%$ ($n=53$) und eine anhaltende Vasokonstriktion auf $140 \pm 11\%$ ($n=57$) (Daten sind in Tabelle 1 zusammengefasst). Der ausgelöste $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg kehrte rasch wieder auf das Ausgangsniveau zurück, während die Konstriktion anhielt (siehe Abb.10). Nach Auswaschen von ET-1 aus dem Superfusat hielt die Konstriktion für mindestens weitere 20 Minuten an, ohne reversibel zu sein (siehe Abb.11).

Tabelle 1: EC_{50} , pEC_{50} , E_{max} und Hill-Koeffizient (h) der Dosiswirkungskurven der ET-1 induzierten Konstriktionen und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege von Experimenten in denen der ET-1 Effekt für nur jeweils eine Konzentration bestimmt wurde (*pulsatiles Protokoll*).

	Protokoll	EC_{50} (mol/l)	pEC_{50}	E_{max} (%)	h
Konstriktion	Pulsatil	$(7.4 \pm 2.1) \times 10^{-10}$ ($n=57$)	9.13 ($n=57$)	140 ± 11 ($n=57$)	1.20 ± 0.35 ($n=57$)
$[\text{Ca}^{2+}]_i$-Anstieg	Pulsatil	$(2.2 \pm 0.6) \times 10^{-9}$ ($n=53$)	8.66 ($n=53$)	159 ± 13 ($n=53$)	1.09 ± 0.19 ($n=53$)

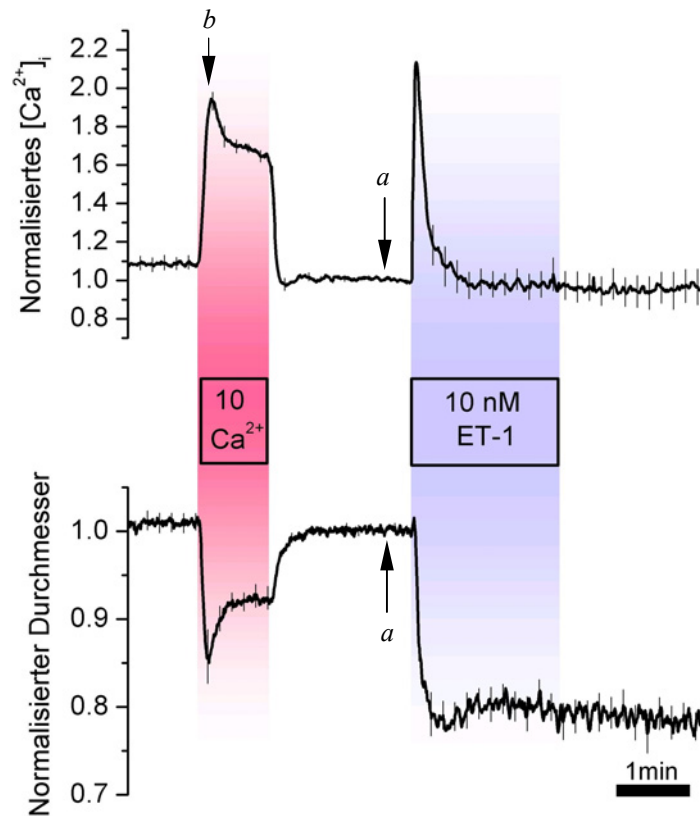


Abb. 10: Effekt von Endothelin (ET-1) auf die $[Ca^{2+}]_i$ und den Gefäßdurchmesser der A. cochlearis propria:

Mittelwerte und sem von 5 Experimenten in denen der Effekt von einer einzelnen Dosis Endothelin (10 nmol/l) pro Experiment/Gefäßsegment untersucht wurde (=pulsatiles Protokoll). 10 nmol/l ET-1 bewirkte einen transienten $[Ca^{2+}]_i$ Anstieg und eine anhaltende Vasokonstriktion die von einer verstärkten Vasomotion begleitet wurde. Erhöhung der extrazellulären $[Ca^{2+}]_i$ von 1 auf 10 mmol/l diente als Kontrolleexperiment. Die von ET-1 induzierte $[Ca^{2+}]_i$ Erhöhung und Vasokonstriktion wurden auf den jeweiligen maximalen Effekt, der durch 10 mmol/l Ca^{2+} ausgelöst wurde, normalisiert (der Wert zur Zeit „a“ wurde gleich 1, der zur Zeit „b“ gleich 2 gesetzt).



Abb.11: ET-1 induzierte eine langanhaltende Konstriktion: Nach Applikation von 1nmol/l ET-1 für 2 Minuten hält die Konstriktion trotz des Auswaschens von ET-1 aus dem Superfusat für mindestens 20 Minuten an.

2.) ET_A-Rezeptoren vermitteln die ET-1 induzierte Vasokonstriktion

Es war zu klären, über welchen Rezeptor ET-1 eine langanhaltende Vasokonstriktion auslöst. Da ET_A- und ET_B-Rezeptoren durch ihre unterschiedliche Affinität für Agonisten unterschieden werden können (Rubanyi & Polokoff, 1994), wurden hier die Agonisten ET-1 und ET-3 und Sarafotoxin S6c verwendet, um anhand ihrer Wirksamkeiten den vermittelnden Rezeptor ableiten zu können (Williams, Jr. *et al.*, 1991; Vigne *et al.*, 1990b; Watanabe *et al.*, 1989).

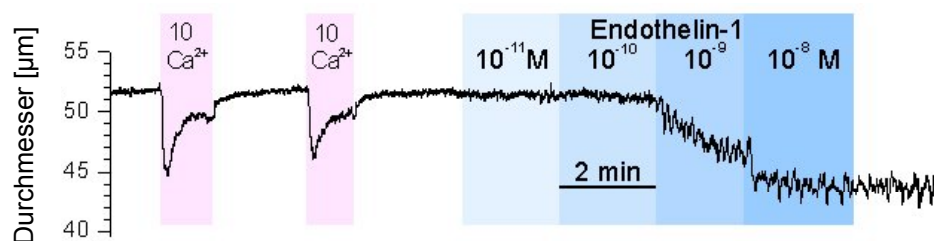


Abb.12: ET-1 induzierte Konstriktion in der A. cochlearis propria:

Originalaufzeichnung eines Experimentes in dem sukzessiv ansteigende Endothelinkonzentrationen für jeweils 2 Minuten appliziert wurden (=kumulatives Protokoll). Bemerkenswert ist, dass die Konstriktion und die begleitende, verstärkte Vasomotion selbst nach Auswaschen von ET-1 aus dem Superfusat weiter anhält. Den Endothelin-induzierten Konstriktionen gingen jeweils zwei durch 10 mmol/l Ca²⁺ ausgelöste Konstriktionen voraus.

In der A. cochlearis propria induzierte ET-1 bei sukzessiver Erhöhung der Endothelinkonzentration (=kumulatives Protokoll) eine Dosis-abhängige Vasokonstriktion (siehe Abb.12) mit einem pEC_{50} von 9.00 ± 0.09 (n=21). ET-3 wirkte weit schwächer und Sarafotoxin S6c konnte bis zu einer Konzentration von 100 nmol/l keine signifikante Konstriktion induzieren (siehe Abb.13). Diese Beobachtungen lassen die Annahme zu, dass die ET-1 induzierte Konstriktion von ET_A-Rezeptoren vermittelt wird.

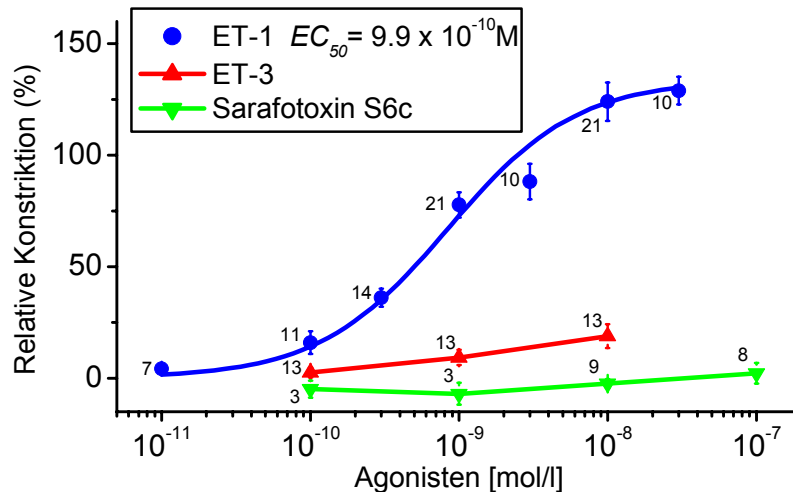


Abb.13: Effekte von ET-1, ET-3 und Sarafotoxin S6c auf den Gefäßdurchmesser der A. cochlearis propria:

Dosis-Wirkungskurven von kumulativen Experimenten. Die durch die unterschiedlichen Agonisten ausgelösten Konstriktionen wurden auf die durch 10 mmol/l Ca²⁺ induzierten Konstriktionen normalisiert (maximale 10 mmol/l Ca²⁺-Konstriktion wurde gleich 100% gesetzt). Bemerkenswert ist, dass ET-3 und Sarafotoxin S6c in Konzentrationen von bis zu 10 und 100 nmol/l nahezu keine Konstriktion induzierten. Die Zahlen an den Kurven entsprechen der Anzahl der Versuche für jeden Punkt.

ET_A und ET_B Rezeptoren können nicht nur mit Hilfe von Agonisten, sondern auch mit selektiven Antagonisten unterschieden werden. Die in dieser Studie verwendeten Antagonisten waren BQ-123 und BQ-788. In Abb.14 wird der inhibitorische Effekt von 1 µmol/l BQ-123 auf die ET-1 induzierte Konstriktion anhand eines repräsentativen Einzelexperimentes gezeigt. Unter der Anwesenheit von 1 µmol/l BQ-123 wird die ET-1 induzierte Konstriktion deutlich schwächer und nach Auswaschen von BQ-123 aus dem Superfusat lässt sich die vollständige Konstriktion mit 10 nmol/l ET-1 induzieren. Die Reversibilität des inhibitorischen Effektes von BQ-123 auf die ET-1 induzierte Konstriktion bestätigt, dass BQ-123 den Rezeptor kompetitiv inhibiert. Die *kumulativen* Dosis-Wirkungskurven für ET-1 in der Anwesenheit von 0.1 und 1 µmol/l BQ-123 und 0.1 µmol/l BQ-788 wurden mit den Daten verglichen, die in der Abwesenheit von Antagonisten erstellt wurden (siehe Abb.15). Die Affinitätskonstanten für BQ-123

und BQ-788 waren 24 nmol/l ($pK_{DB} = 7.61 \pm 0.11$; $n=15$) und 77 nmol/l ($pK_{DB} = 7.12 \pm 0.38$; $n=5$).

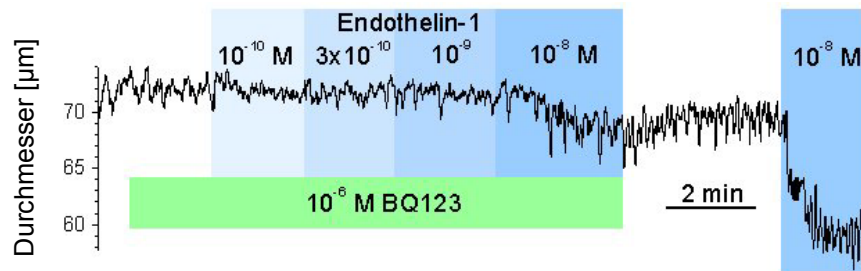


Abb.14: ET-1 induzierte Konstriktion in der Anwesenheit von 1 µmol/l BQ-123:

Bemerke die deutliche Verdrängung der ET-1 induzierten Konstriktion in der Anwesenheit des Antagonisten 1 µmol/l BQ-123. Nach Auswaschen des Antagonisten aus dem Superfusat kann sich die ET-1 induzierte Konstriktion komplett entfalten.

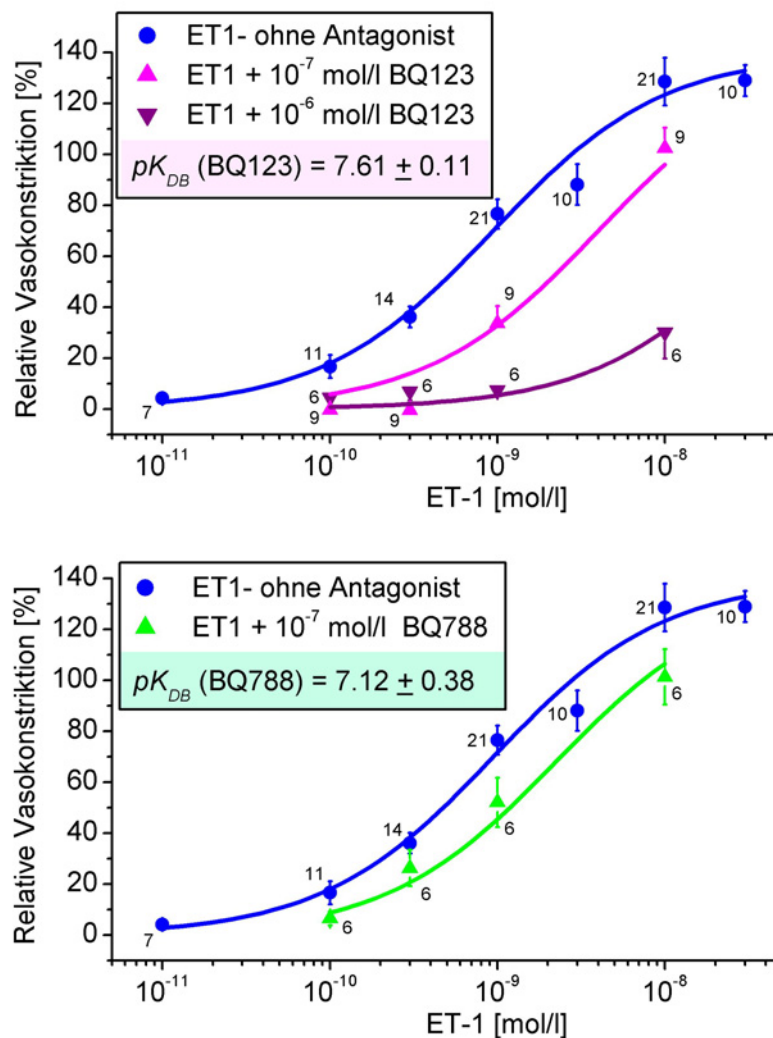


Abb.15: Effekt von ET-1 auf den Gefäßdurchmesser in Ab- und Anwesenheit der Antagonisten BQ-123 und BQ788:

Dosis-Wirkungskurven von kumulativen Experimenten. Die Daten wurden auf die jeweils vorausgehende, 10 mmol/l Ca^{2+} -induzierte, Konstriktion normalisiert, die gleich 100% gesetzt wurde. Beide Antagonisten verschoben die ET-1 Dosis-Wirkungskurve nach rechts.

In Abb.16 sind die Affinitätskonstanten (K_{DB}) für BQ-123 und BQ-788 von Geweben, die entweder ET_A oder ET_B Rezeptoren exprimieren, aufgetragen. Aus diesen K_{DB} -Werten, die der Literatur entnommen wurden, ergibt sich ein charakteristisches Muster für beide Rezeptoren (jeweils farbig unterlegt). Die Affinitätskonstanten die in dieser Studie für beide Antagonisten gefunden wurden, folgen eindeutig dem Muster für ET_A Rezeptoren. Diese Beobachtungen bestätigen, dass ET_A -Rezeptoren die ET-1 induzierte Konstriktion in der A. cochlearis propria vermitteln.

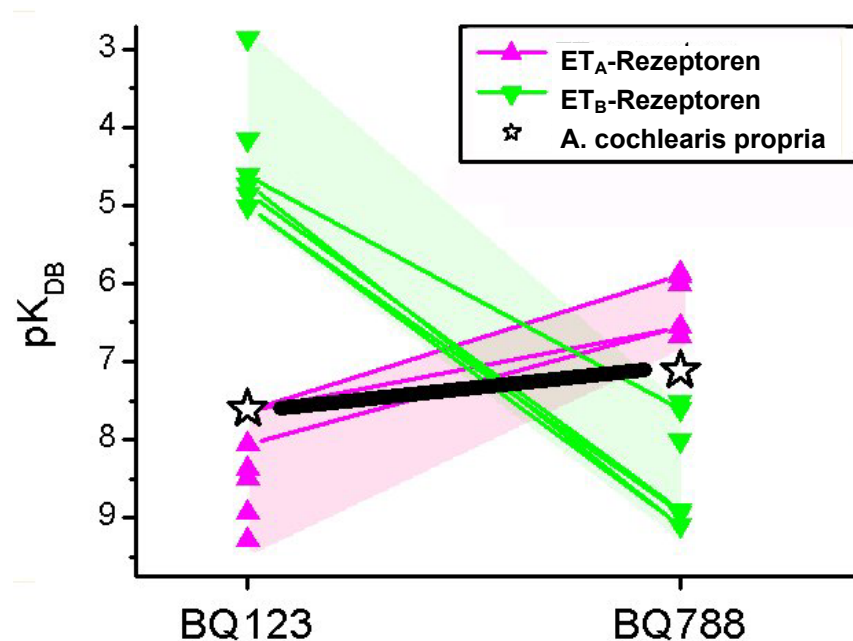


Abb.16: Vergleich der Affinitätskonstanten (pK_{DB}) der Antagonisten BQ-123 und BQ-788 für ET_A - und ET_B - Rezeptoren.

Die Affinitätskonstanten für die A. cochlearis propria wurden gemeinsam mit denen aus Präparationen mit bekannten Endothelinrezeptoren aufgetragen (Ishikawa *et al.*, 1994; Ozaki *et al.*, 1994; Ihara *et al.*, 1995; Wu-Wong *et al.*, 1996a; Russell & Davenport, 1996; Tayag *et al.*, 1996; Peter & Davenport, 1996). Bemerkenswert ist, dass sich ein Rezeptorsubtyp spezifisches Muster ergibt und die pK_{DB} Werte für die A. cochlearis propria dem charakteristischen Muster für ET_A -Rezeptoren folgen.

3.) Signaltransduktion der ET-1 induzierten zytosolischen Ca²⁺-Mobilisierung und Vasokonstriktion

3.1.) ET_A-Rezeptoren sind an Phospholipase C gekoppelt

In Abb.1 wurde schematisch gezeigt, dass ET_A-Rezeptoren über G_{q/11} und Phospholipase C (PLC) die Generation der intrazellulären zweiten Botenstoffe IP₃ und DAG auslösen (siehe Einleitung). PLC kann experimentell mit Hilfe des Antagonisten U73122 inhibiert werden (Yule & Williams, 1992; Smith *et al.*, 1990). Das inaktive Isomer von U73122, U73343, dient als Kontrollsubstanz. In Abb. 17 wird der Effekt von U73122 und U73343 auf die ET-1 induzierte Konstriktion gezeigt. Innerhalb von 6 Minuten reduziert 1 µmol/l U73122 die durch 3 nmol/l ET-1 induzierte Konstriktion auf 17.05 ± 3.69% (n=7) der initialen Konstriktion, während die gleiche Konzentration der Kontrollsubstanz U73343 die Konstriktion nicht signifikant verändert (n=7) (siehe Abb.17). Bei Vorinkubation mit 1 µmol/l U73122 wird die ET-1 induzierte Konstriktion komplett verhindert (Beobachtung an einer limitierten Anzahl von Versuchen, Daten nicht gezeigt).

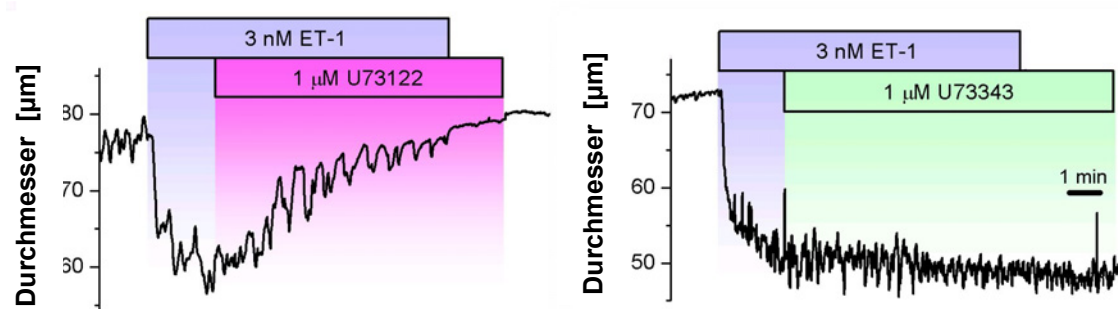


Abb.17: Effekt von U73122 und U73343 auf die ET-1 induzierte Konstriktion:

1 µmol/l U73122 inhibiert die durch 3 nmol/l ET-1 induzierte Konstriktion innerhalb von wenigen Minuten, während 1 µmol/l des inaktiven Analogons U73343 keine signifikante Hemmung zeigt.

3.2.) Ca^{2+} -Signaltransduktion von ET_A -Rezeptoren

Die Beobachtung, dass ET-1 einen transienten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg auslöst (siehe Abb.10), brachte die Frage auf, ob Ca^{2+} aus zytosolischen Speichern freigesetzt wird, oder von außen über eine Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen in die Zellen einströmt. Diese Frage kann von verschiedenen Seiten angegangen werden. Zum einen kann Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum entfernt werden, wodurch ein Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle ausgeschlossen werden kann. Zum anderen kann man versuchen, die intrazellulären Calciumspeicher funktionell auszuschalten, indem die sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Transporter/ Rezeptorkanäle mit spezifischen Pharmaka inhibiert und damit die ET-1 Rezeptor-vermittelte Entleerung verhindert werden.

In Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} fand ein rascher Abfall der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ statt, der mit einer Vasodilatation einherging (Abb.18). ET-1 bewirkte einen transienten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg und eine initiale Konstriktion, die in ihren Größen den in Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} ähnlich sind. Der durch 10 nmol/l ET-1 induzierte transiente $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} betrug $122 \pm 13\%$ (n=8) und ist von dem in Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} ($137 \pm 8\%$; n=12) nicht signifikant verschieden. Die Konstriktion war ebenfalls transient, blieb jedoch trotz Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} teilweise erhalten. Nach Wiedereinführen von Ca^{2+} in das Superfusat wurde die Konstriktion wiederhergestellt. Diese Beobachtungen legen nahe, dass ET-1 eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern induziert und das extrazelluläres Ca^{2+} für die Aufrechterhaltung der ET-1 induzierten Konstriktion teilweise notwendig ist.

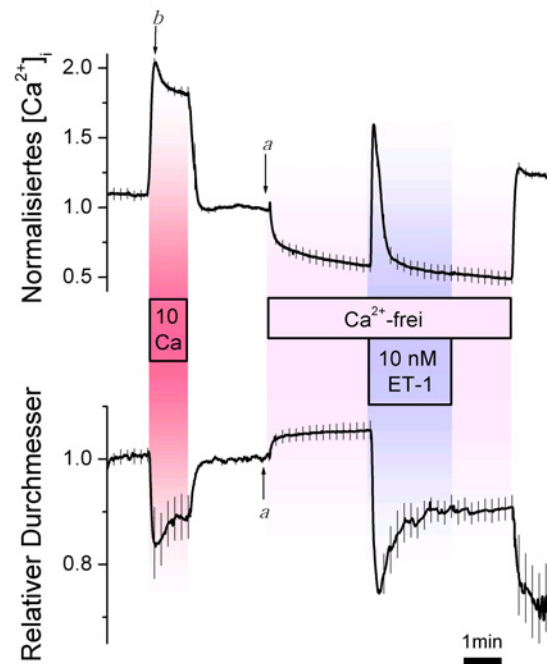


Abb.18: Effekt von ET-1 auf die $[Ca^{2+}]_i$ und den Gefäßdurchmesser der A. cochlearis propria in der Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} :

Mittelwerte und sem von 6 Experimenten. Bemerkenswert ist, dass ET-1 eine transiente $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung und eine transiente Vasokonstriktion induzierte. Die Vasokonstriktion entfaltete sich erneut nach Wiedereinstellen der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf 10 mmol/l diente als Kontrolleexperiment. Die von ET-1 induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung und Vasokonstriktion wurden auf den jeweiligen maximalen Effekt, der durch 10 mmol/l Ca^{2+} ausgelöst wurde, normalisiert (der Wert zur Zeit „a“ wurde in beiden Graphen gleich 1 und der zur Zeit „b“ wurde für den $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg gleich 2 gesetzt).

Sollte der ET-1 induzierte transiente Ca^{2+} -Anstieg IP_3 -vermittelt sein, müsste eine Inhibition von IP_3 -Rezeptoren den transienten Ca^{2+} -Anstieg eindämmen. IP_3 -Rezeptoren können mit dem Inhibitor 2-Aminoethoxydiphenyl Borat (2-APB) geblockt werden (Ma *et al.*, 2000). 75 $\mu\text{mol/l}$ 2-APB bewirkte in der Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} eine signifikante Verringerung des transienten ET-1 induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieges von $122 \pm 13\%$ (n=8) (Kontrollbedingungen, siehe Abb.18) auf $29 \pm 6\%$ (n=8) (Abb.19). Die initiale, transiente Konstriktion wurde ebenfalls reduziert. Diese Beobachtung passt zu der Annahme einer IP_3 -Rezeptor-vermittelten Freisetzung von Ca^{2+} aus zytosolischen Speichern.

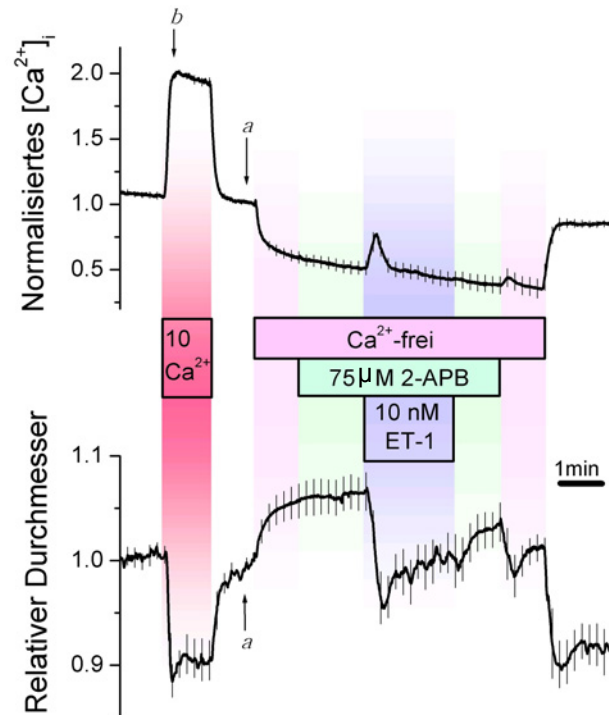


Abb.19: Effekt von Endothelin (ET-1) auf die $[Ca^{2+}]_i$ und den Gefäßdurchmesser in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} und Anwesenheit von 2-Aminodiphenyl Borat (2-APB):

Mittelwerte und sem von 8 Versuchen. Bemerkenswert ist, dass in der Anwesenheit von $75 \mu\text{mol/l}$ 2-APB nur ein schwacher, transients $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg stattfand, der sich in einer Abschwächung der transienten Konstriktion widerspiegelte. Die Plateauphase der Konstriktion war jedoch im Vergleich zum Vorexperiment (Abb.18) nur leicht vermindert. Die Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf 10 mmol/l diente als Kontrollexperiment. Die von ET-1 induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung und Konstriktion wurden auf den jeweiligen maximalen Effekt, der durch 10 mmol/l Ca^{2+} ausgelöst wurde, normalisiert (der Wert zur Zeit „a“ wurde in beiden Graphen gleich 1 und der zur Zeit „b“ wurde für den $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg gleich 2 gesetzt).

Wenn der ET-1 vermittelte transiente Ca^{2+} -Anstieg durch einen Ca^{2+} -Ausstrom aus zytosolischen Speichern zustande käme, wäre es zu erwarten, dass eine Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher den ET-1 induzierten zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg reduziert und die einhergehende Konstriktion abgeschwächt wird. Die zytosolischen Ca^{2+} -Speicher können mit Hilfe der Alkaloide Thapsigargin und Ryanodine entleert werden. Tatsächlich reduzierte $1 \mu\text{mol/l}$ Thapsigargin den transienten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg von $137 \pm 8\%$ ($n=12$) auf $6 \pm 1\%$ ($n=8$). Die simultan gemessene Konstriktion wurde ebenfalls signifikant abgeschwächt (siehe Abb.20).

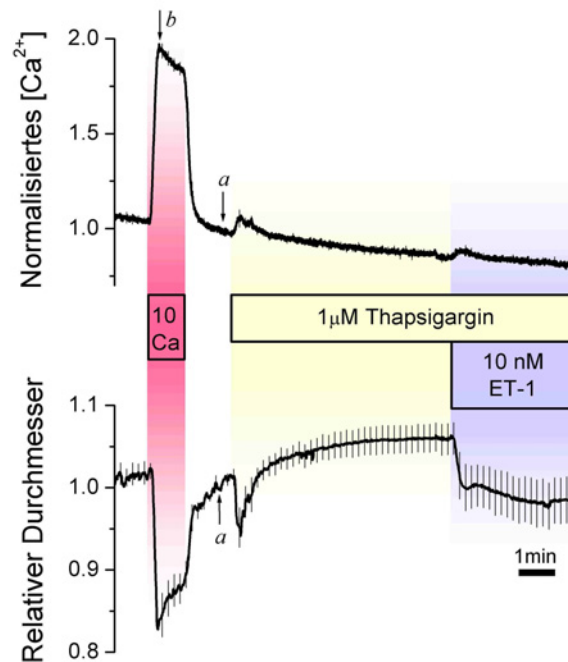


Abb.20: Effekt von Endothelin (ET-1) auf die $[Ca^{2+}]_i$ und den Gefäßdurchmesser in Anwesenheit von 1 $\mu\text{mol/l}$ Thapsigargin:

Mittelwerte und sem von 9 Experimenten. ET-1 induzierte keinen nennenswerten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg, jedoch noch eine signifikante Vasokonstriktion in der Anwesenheit von Thapsigargin. Die $[Ca^{2+}]_i$ -Messung wurde auf den Wert vor Applikation von Thapsigargin und auf den durch 10 mmol/l Ca^{2+} ausgelösten Wert normalisiert (der Wert zur Zeit „a“ wurde gleich 1 und der zur Zeit „b“ gleich 2 gesetzt). Die Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf 10 mmol/l diente als Kontrollexperiment. Der Gefäßdurchmesser wurde auf den Wert vor Applikation von Thapsigargin normalisiert (der Wert zur Zeit „a“ wurde gleich 1 gesetzt).

Entleerung der zytosolischen Ca^{2+} -Speicher durch Aktivierung des Ryanodine Ca^{2+} -Kanals mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Ryanodine führte zu einer Dilatation der A. cochlearis propria (Abb. 21A). Die anschließend durch 10 nmol/l ET-1 vermittelte Konstriktion wurde von $130 \pm 13\%$ auf $91 \pm 11\%$ signifikant abgeschwächt (Abb.21B). Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass ET-1 eine Ca^{2+} -Freisetzung von Thapsigargin- und Ryanodine-empfindlichen intrazellulären Ca^{2+} -Speichern auslöst und dass diese Ca^{2+} -Freisetzung zur ET-1 induzierten Konstriktion beiträgt.

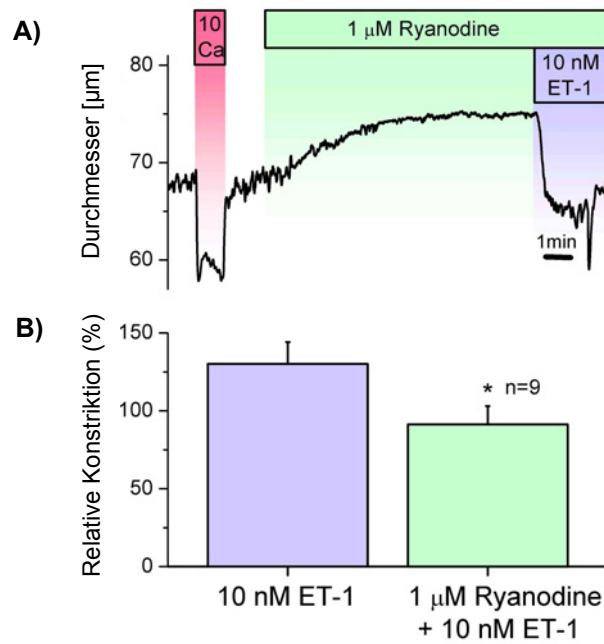


Abb. 21: Effekt von Endothelin (ET-1) auf den Gefäßdurchmesser in Anwesenheit von 1 μmol/l Ryanodine: A.) zeigt ein repräsentatives Experiment. Applikation von 1 μmol/l Ryanodine induziert eine Vasodilatation. Die anschließend von ET-1 induzierte Konstriktion ist schwächer als unter Kontrollbedingungen. B.) zeigt die Auswertung der 10 nmol/l ET-1 induzierten Konstriktion in An- und Abwesenheit von 1 μmol/l Ryanodine. In Gegenwart von 1 μmol/l Ryanodine ist die ET-1 induzierte Konstriktion signifikant reduziert. Die durch 10 mmol/l Ca²⁺ induzierte Konstriktion wurde gleich 100% gesetzt.

3.3.) Differentielle Desensibilisierung der ET_A Rezeptor-induzierten Ca²⁺-Mobilisierung und Vasokonstriktion

Dosiswirkungskurven für Agonisten können durch unterschiedliche Vorgehensweisen erstellt werden. Eine geläufige Methode besteht darin, die Agonistenkonzentration schrittweise zu erhöhen, wodurch mehrere Agonistenkonzentrationen in einem einzelnen Experiment untersucht werden können. Diese Methode wurde *kumulatives Protokoll* genannt und bei allen Agonisten angewendet (siehe Abb.12 und 13). Eine andere Methode besteht darin, in jedem Experiment den Effekt einer einzelnen Agonistenkonzentration zu untersuchen. Letztere Methode wurde *pulsatiles Protokoll* genannt und nur mit ET-1 angewendet (Abb.10). Wenn eine vorausgehende Agonistenkonzentration nicht den Effekt der nachfolgenden beeinflusst, sollten beide Protokolle vergleichbare Ergebnisse liefern. Unterschiede zwischen *pulsatilen* und *kumulativen* Dosis-Wirkungskurven können wiederum für eine Potenzierung oder Desensibilisierung des Rezeptors sprechen. Es wurden Dosis-Wirkungskurven nach beiden Protokollen für die ET-1 induzierte Konstriktion und [Ca²⁺]_i-Mobilisierung erstellt. Abb.10 zeigte bereits Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 *pulsatilen* Experimenten, in denen 10 nmol/l ET-1 einen raschen, transienten [Ca²⁺]_i-Anstieg und eine kräftige, langanhaltende Vasokonstriktion induzierte. Für das *kumulative Protokoll* ist ein repräsentatives Experiment in Abb.22 gezeigt. Die Dosis-Wirkungskurven für beide Protokolle sind in Abb.23 dargestellt, die korrespondierenden EC₅₀, E_{max} und Hill-Koeffizienten (h) sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Für die ET-1 induzierten Konstriktionen waren die *kumulative* und *pulsatile* Dosis-Wirkungskurve nicht signifikant verschieden. Für den [Ca²⁺]_i-Anstieg waren die Dosis-Wirkungskurven jedoch signifikant verschieden (Abb.23 und Tabelle 2). Diese Beobachtungen deuten auf eine ausgeprägte Desensibilisierung der ET-1

induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Mobilisierung hin, die interessanterweise nicht die simultan gemessene Konstriktion betrifft.

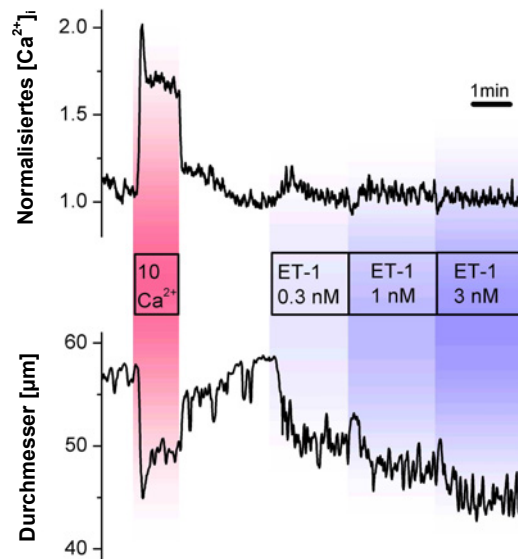


Abb.22: Effekt von ET-1 auf die $[Ca^{2+}]_i$ und den Gefäßdurchmesser der A. cochlearis propria:

Kumulative Dosen von ET-1 führten zu einem stufenartigen Anstieg der Konstriktion, während nach der ersten Dosis ET-1 kein nennenswerter Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ mehr zu beobachten war.

Tabelle 2: EC_{50} , E_{max} und Hill-Koeffizienten (h) der ET-1 induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Mobilisierung und Vasokonstriktion für Experimente nach dem kumulativen und pulsatilem Protokoll:

	Protokoll	EC_{50} (mol/l)	pEC_{50}	E_{max} (%)	h
Konstriktion	Pulsatil	$(7.4 \pm 2.1) \times 10^{-10}$ (n=57)	9.13 (n=57)	140 ± 11 (n=57)	1.20 ± 0.35 (n=57)
	Kumulativ	9.9×10^{-10} (n=21)	9.00 ± 0.09 (n=21)	140 ± 11 (n=21)	0.85 ± 0.17 (n=21)
$[Ca^{2+}]_i$- Anstieg	Pulsatil	$(2.2 \pm 0.6) \times 10^{-9}$ (n=53)	8.66 (n=53)	159 ± 13 (n=53)	1.09 ± 0.19 (n=53)
	Kumulativ	-- (n=11)	-- (n=11)	-- (n=11)	-- (n=11)

Beim pulsatilem Protokoll wurde der Datenschwarm aller Einzelexperimente einer Kurvenanpassung unterzogen. Der daraus entstehende EC_{50} und sem sind angegeben. Beim pulsatilem Protokoll wurden Dosiswirkungskurven für jedes einzelne Gefäßsegment berechnet. Die hieraus resultierenden EC_{50} wurden logarithmisch transformiert um anschließend gemittelt werden zu können. Aus diesem Grund wird beim kumulativen Protokoll die sem nur für den pEC_{50} angegeben.

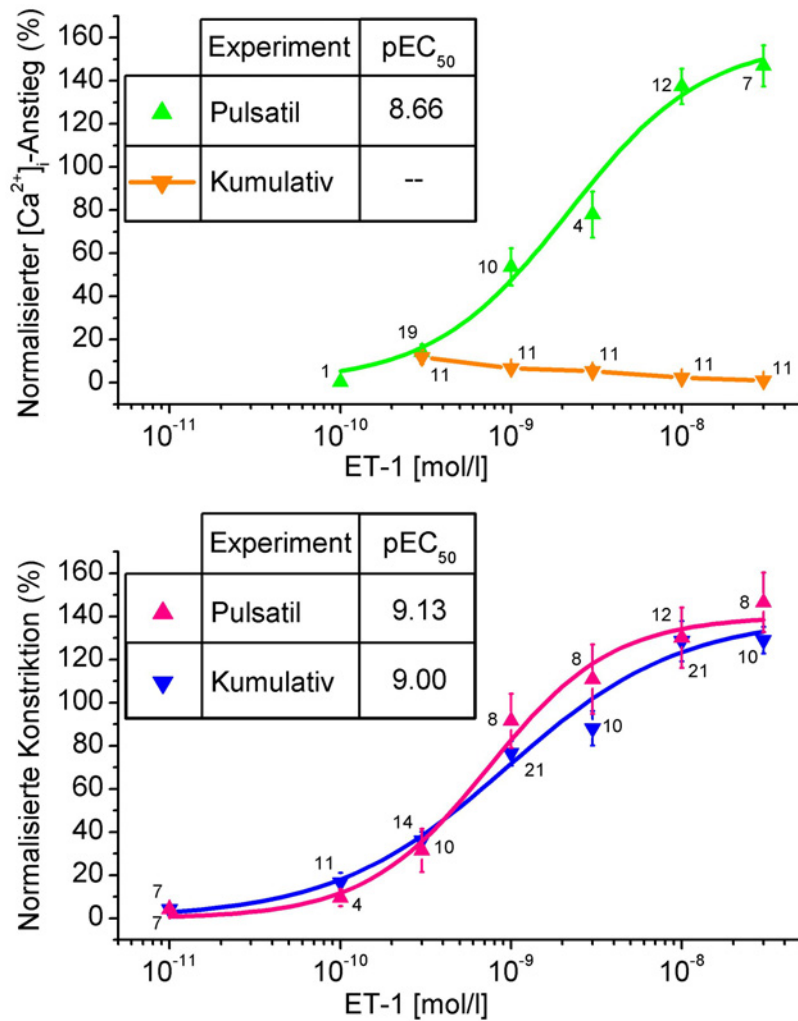


Abb.23: Effekt von ET-1 auf die $[Ca^{2+}]_i$ und den Gefäßdurchmesser der *A. cochlearis propria*:

Dosis-Wirkungskurven von pulsatilen und kumulativen Experimenten. Die Daten wurden auf den jeweils vorausgehenden, durch 10 mmol/l Ca^{2+} -induzierten Effekt normalisiert, der gleich 100% gesetzt wurde. Der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg war nur in den pulsatilen Experimenten Dosis-abhängig; in den kumulativen Experimenten zeigte sich kein signifikanter Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. Diese Diskrepanz spricht für eine schnelle Desensibilisierung der Ca^{2+} -Mobilisierung. Hingegen zeigen die Konstriktions-Dosis-Wirkungskurven keinen signifikanten Unterschied für beide Protokolle.

3.4.) ET_A -Rezeptor vermittelte Ca^{2+} -Sensitisierung der Myofilamente

Die durch ET-1 induzierte langanhaltende Konstriktion bedurfte nicht einer signifikanten Erhöhung der intrazellulären $[Ca^{2+}]_i$ (siehe Abb. 10). Daraus lässt sich folgern, dass ET-1 den kontraktilen Apparat für Ca^{2+} sensitisiert. Um die ET-1 induzierte Ca^{2+} -Sensitisierung in Form einer Dosiswirkungskurve darzustellen, wurde die extrazelluläre $[Ca^{2+}]_o$ in drei Schritten (von 0 auf 1, 3 und 10 mmol/l) erhöht und $[Ca^{2+}]_i$ sowie der Gefäßdurchmesser simultan gemessen. Erhöhung der extrazellulären $[Ca^{2+}]_o$ führte zu einem $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg, der mit einer Konstriktion einherging (Abb.24). Es wurde eine Serie von Kontrollexperimenten durchgeführt, um zu zeigen, dass Erhöhungen der extrazellulären $[Ca^{2+}]_o$ an einem Gefäßsegment wiederholt werden können, ohne signifikant unterschiedliche $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege und Konstriktionen zu induzieren (siehe Abb.24 und 25). In der ersten Hälfte der Kontrollexperimentserie wurde die extrazelluläre $[Ca^{2+}]_o$ von 0 auf 1, 3 und 10 mmol/l erhöht, während sie in der zweiten Hälfte bis auf 50 mmol/l erhöht wurde. In Abb.25A sind die aufeinanderfolgenden Experimente aus Abb.24 simultan dargestellt. Sowohl die $[Ca^{2+}]_i$ als auch die korrespondierenden Gefäßdurchmesser sind in der zweiten Hälfte der Kontrollexperimente nicht signifikant verschieden. Die Korrelation zwischen $[Ca^{2+}]_i$ und Gefäßdurchmesser ergibt die Dosiswirkungskurve für die Ca^{2+} -Sensitivität des kontraktilen Apparates (Abb.25B). Beide in Abb.25B abgebildeten Dosiswirkungskurven sind im Bereich von 0 bis 10 mmol/l Ca^{2+} linear und nicht signifikant verschieden. Erst bei weiterer Erhöhung der extrazellulären $[Ca^{2+}]_o$ auf 30 und 50 mmol/l beginnt die Dosiswirkungskurve abzuflachen.

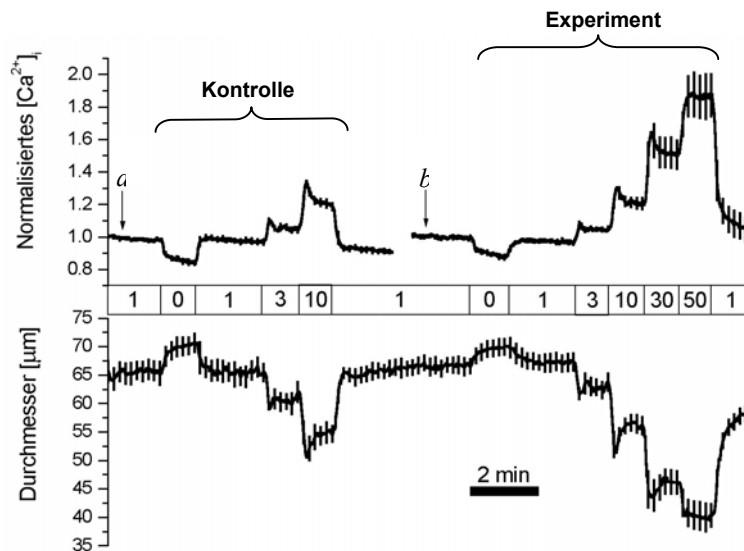


Abb. 24 Effekt der extrazellulären $[Ca^{2+}]_e$ auf $[Ca^{2+}]_i$ und Gefäßdurchmesser:

Dargestellt sind die Mittelwerte und sem von 6 Experimenten. In der ersten Hälfte der Experimente, der Kontrolle, wurde die extrazelluläre $[Ca^{2+}]_e$ von 0 auf 1, 3 und 10 mmol/l erhöht. In der zweiten Hälfte, dem eigentlichen Experiment, wurde die extrazelluläre $[Ca^{2+}]_e$ bis auf 50 mmol/l erhöht. Die Nummern in den Kästen entsprechen der extrazellulären $[Ca^{2+}]_e$ in mmol/l. Die $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege wurden auf die Werte zu den Zeiten „a“ und „b“ normalisiert, die gleich 1 gesetzt wurden.

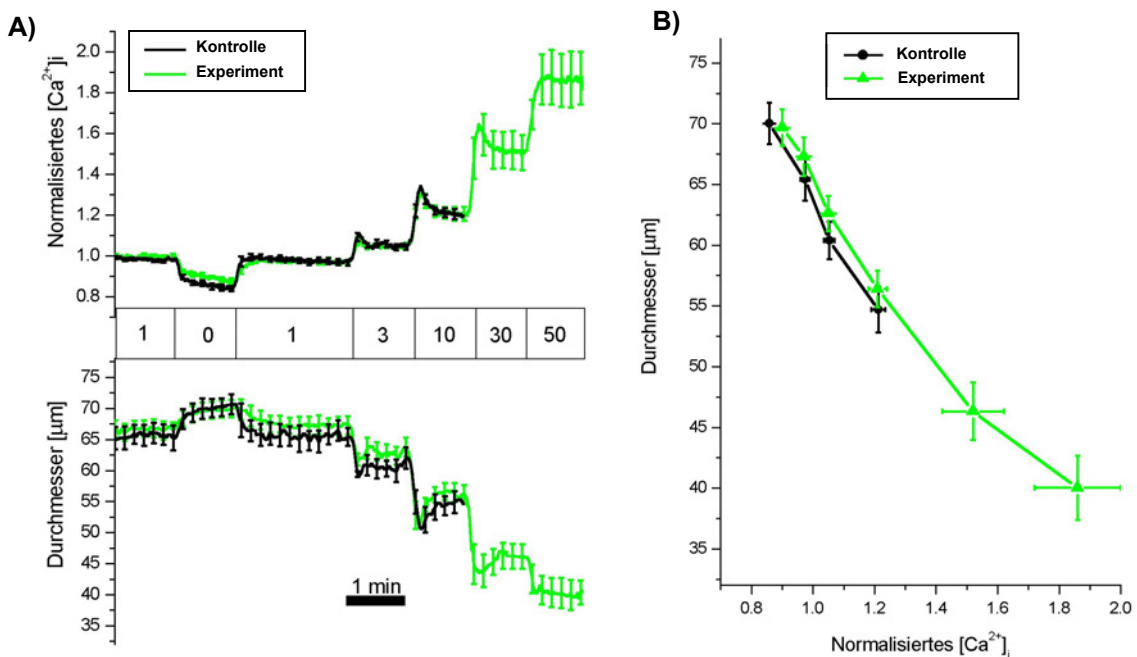


Abb.25: Effekt der extrazellulären $[Ca^{2+}]_e$ auf $[Ca^{2+}]_i$ und Gefäßdurchmesser:

In A) wurden Kontrolle und Experiment aus Abb.24 simultan dargestellt. Weder die induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege noch die einhergehenden Gefäßdurchmesser sind signifikant verschieden. Die Korrelationskurve zwischen $[Ca^{2+}]_i$ und Gefäßdurchmesser ist in B) dargestellt. Sie spiegelt die Ca^{2+} -Sensitivität des kontraktiven Apparates unter Kontrollbedingungen. Die in Abb. B) dargestellten Werte und Standardabweichungen entsprechen jeweils den Mittelwerten und sem der Plateauphasen (letzte 25 sec der unterschiedlichen extrazellulären $[Ca^{2+}]_e$).

Sollte ET-1 eine Ca^{2+} -Sensibilisierung des kontraktiven Apparates induzieren, wäre es zu erwarten, dass gleiche $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege mit stärkeren Konstriktionen als unter Kontrollbedingungen einhergehen. In Abb. 26 werden die durch Erhöhungen der extrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ ausgelösten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege und einhergehenden Gefäßdurchmesser in An- und Abwesenheit von 0.1 nmol/l ET-1 dargestellt. Obwohl die ausgelösten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege in der An- und Abwesenheit von 0.1 nmol/l ET-1 gleich bleiben, werden die einhergehenden Konstriktionen in Anwesenheit von ET-1 signifikant stärker. Die Korrelation zwischen den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegen und den Gefäßdurchmessern ist in Abb.26B dargestellt. Die Dosiswirkungskurve in Anwesenheit von 0.1 nmol/l ET-1 ist nach links verschoben. Die mit Ca^{2+} -freier Lösung erzielte maximale Dilatation war in An- oder Abwesenheit von ET-1 nicht signifikant verschieden. In Tabelle 3 sind die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege und einhergehenden Gefäßdurchmesser, die in An- oder Abwesenheit von 0.1 nmol/l ET-1 erzielt wurden, zusammengefasst. Die verstärkten Konstriktionen in Anwesenheit von 0.1 nmol/l ET-1, bei gleichbleibenden $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegen, belegen den Ca^{2+} -sensibilisierenden Effekt von ET-1 auf den kontraktiven Apparat.

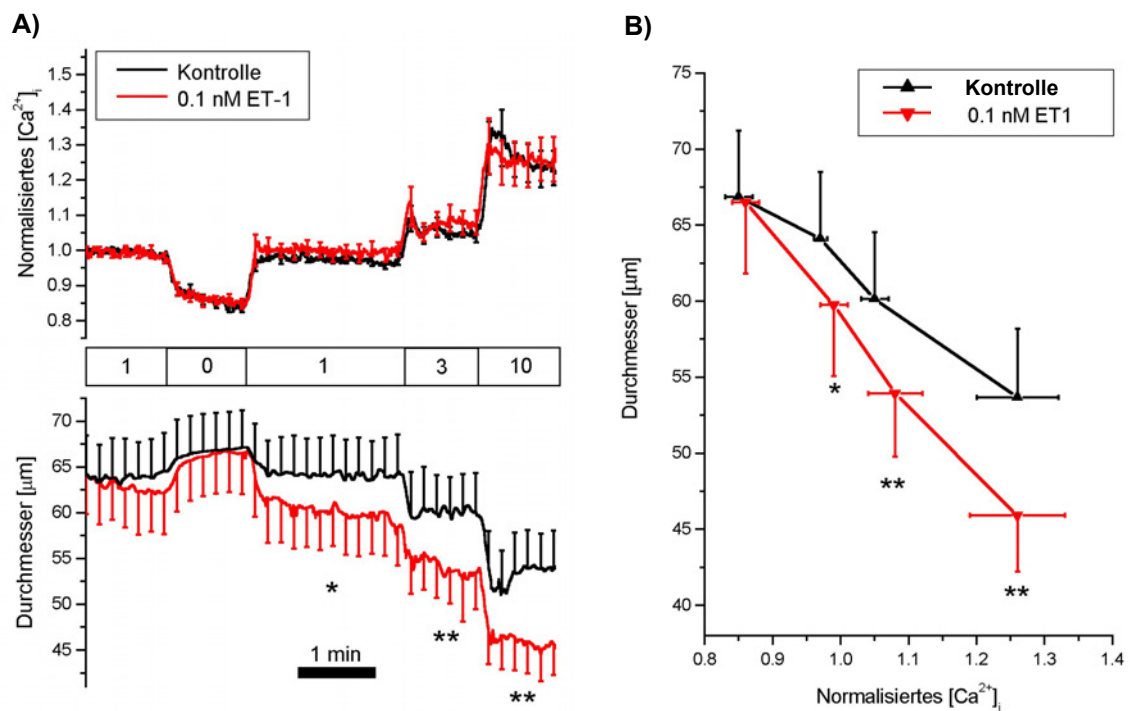


Abb. 26: Ca²⁺-Sensitisierung der Myofilamente durch 0.1 nmol/l ET-1:

A) zeigt Mittelwerte und sem von 8 gepaarten Experimenten. Die aufeinanderfolgenden Experimente wurden simultan dargestellt. Die [Ca²⁺]_i-Anstiege sind vor wie nach ET-1 Applikation nicht signifikant verschieden, während die einhergehenden Konstriktionen in Anwesenheit von ET-1 deutlich verstärkt werden. In B) ist jeweils die [Ca²⁺]_i gegen den Gefäßdurchmesser aufgetragen. 0.1 nmol/l ET-1 verschob die [Ca²⁺]_i-Konstriktions-Dosis-Wirkungskurve nach links, was einer ET-1 induzierten Ca²⁺-Sensitisierung der Myofilamente entspricht. Die in Abb. B) dargestellten Werte und Standardabweichungen entsprechen jeweils den Mittelwerten und sem der Plateauphasen (letzte 25 sec der unterschiedlichen extrazellulären [Ca²⁺]). **P*<0.05 vs Kontrolle; ***P*<0.001 vs Kontrolle.

Tabelle 3: Wirkung von 0.1 nmol/l ET-1 auf Gefäßdurchmesser und [Ca²⁺]_i:

Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten und sem der Plateauphasen aus Abb.26A). [Ca²⁺]_{ext} = extrazelluläre [Ca²⁺].

[Ca ²⁺] _{ext} (mmol/l)	Gefäßdurchmesser (μm)		Normalisiertes [Ca ²⁺] _i	
	Kontrolle	0.1 nM ET-1	Kontrolle	0.1 nM ET-1
0	66.87 ± 4.35	66.52 ± 4.67	0.85 ± 0.02	0.86 ± 0.02
1	64.11 ± 4.39	59.76 ± 4.66 *	0.97 ± 0.01	0.99 ± 0.02
3	60.15 ± 4.41	53.95 ± 4.17 **	1.05 ± 0.02	1.08 ± 0.04
10	53.69 ± 4.50	45.92 ± 3.70 **	1.26 ± 0.06	1.26 ± 0.07

P*<0.05 vs Kontrolle; *P*<0.001 vs Kontrolle; n=8

Um zu klären, ob der Rho-kinase Transduktionsweg an der ET-1 induzierten Ca^{2+} -Sensibilisierung beteiligt ist, wurde Rho-Kinase mit dem spezifischen Antagonisten Y-27632 geblockt (Uehata *et al.*, 1997). Die durch 0.1 nmol/l ET-1 induzierte Ca^{2+} -Sensibilisierung der Myofilamente konnte durch 1 $\mu\text{mol/l}$ Y-27632 verhindert werden (Abb. 27, n=6). Die Ca^{2+} -Konstriktions-Dosiswirkungskurven unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von 0.1 nmol/l ET-1 und 1 $\mu\text{mol/l}$ Y-27632 sind nicht signifikant verschieden (Abb.27B). 10 $\mu\text{mol/l}$ Y-27632 hemmte die durch 10 nmol/l ET-1 induzierte Konstriktion signifikant von 100% auf $36.9 \pm 2.1\%$ (Abb.28, n=7). Die ET-1 induzierte Konstriktion bildete sich nach Auswaschen von Y-27632 aus dem Superfusat wieder vollständig aus. Durch Präinkubieren der Gefäßsegmente mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Y-27632 wurde die ET-induzierte Konstriktion transient und spiegelte den intrazellulären Ca^{2+} -Verlauf wider (Abb. 29). 10 $\mu\text{mol/l}$ Y-27632 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ noch auf den erwarteten ET-1 induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Verlauf (Abb.29).

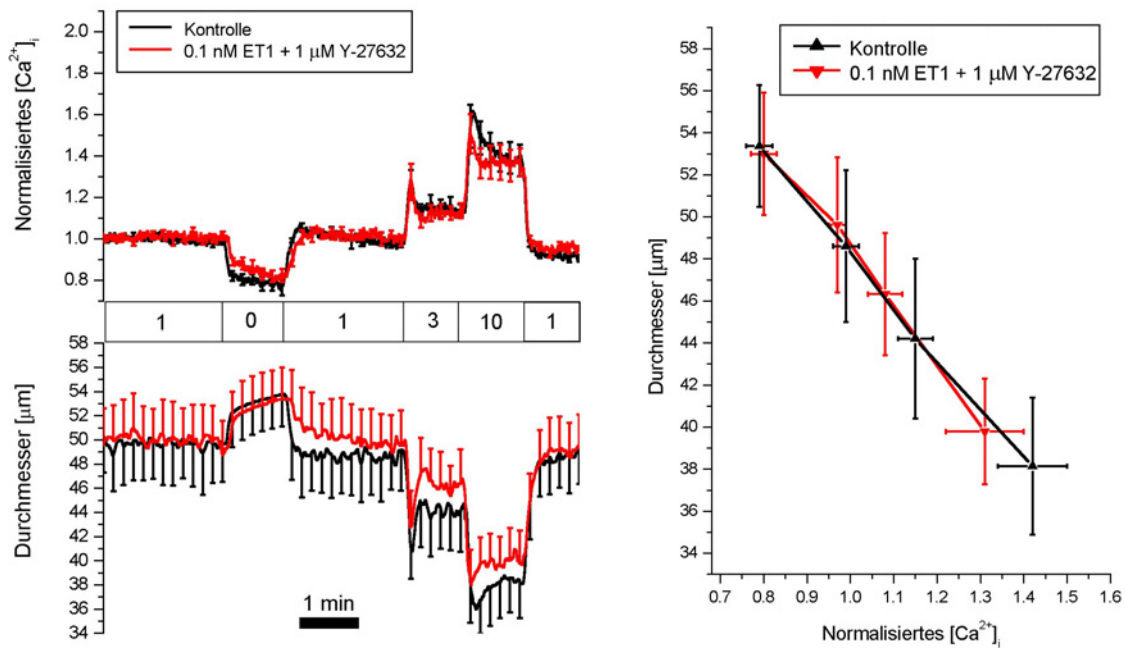


Abb.27: Inhibition der ET-1 induzierten Ca²⁺-Sensibilisierung durch 1 μmol/l Y-27632:

A) zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen von 6 gepaarten Experimenten. Die [Ca²⁺]_i, die durch unterschiedliche extrazelluläre [Ca²⁺] verändert wurde, ist vor wie nach der kombinierten Applikation von ET-1 und 1 μmol/l Y-27632 nicht signifikant verschieden. Ebenso wurde eine Verstärkung der einhergehenden Konstriktionen durch 0.1 nmol/l ET-1 in der Anwesenheit von 1 μmol/l Y-27632 verhindert. In B) ist jeweils die [Ca²⁺]_i gegen den Gefäßdurchmesser aufgetragen. Die in Abb.26B gezeigte Linksverschiebung der [Ca²⁺]_i-Konstriktions-Dosis-Wirkungskurve, wurde in der Anwesenheit von 1 μmol/l Y-27632 vollständig aufgehoben.

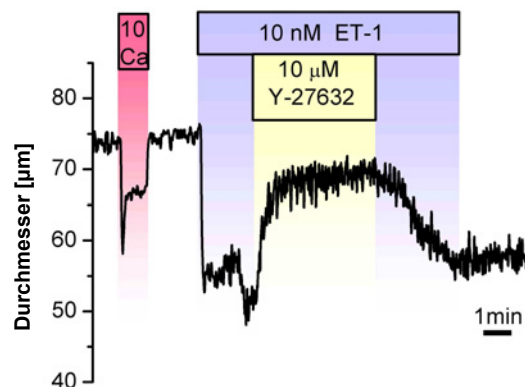


Abb.28: Effekt von 10 μmol/l Y-27632 auf die ET-1 induzierte Konstriktion:

Die durch 10 nmol/l ET-1 induzierte Konstriktion wird durch 10 μmol/l Y-27632 reversibel geblockt. Nach Auswaschen von Y-27632 aus dem Superfusat bildet sich die Konstriktion erneut aus. 10 μmol/l Y-27632 konnten die durch 10 nmol/l ET-1 ausgelöste Konstriktion nicht vollständig aufheben.

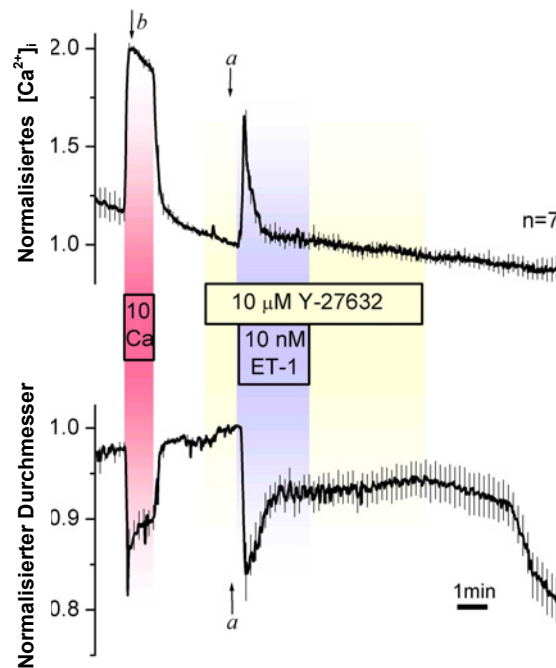


Abb.29: 10 nmol/l ET-1 induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen und Konstriktion in der Anwesenheit von 10 $\mu\text{mol/l}$ Y-27632:

Mittelwerte und sem von 7 Experimenten. In der Anwesenheit von 10 $\mu\text{mol/l}$ Y-27632 induzierten 10 nmol/l ET-1 einen transienten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg, der von einer transienten Konstriktion begleitet wurde. Nach Auswaschen von Y-27632 aus dem Superfusat stellte sich erneut eine vollständige Konstriktion ein. 10 $\mu\text{mol/l}$ Y-27632 konnte die ET-1 induzierte Konstriktion nicht vollständig blocken. Die $[Ca^{2+}]_i$ -Messung wurde auf den Wert vor Applikation von ET-1 und auf den durch 10 mmol/l Ca^{2+} ausgelösten Wert normalisiert (der Wert zur Zeit „a“ wurde gleich 1 und der zur Zeit „b“ gleich 2 gesetzt). Die Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf 10 mmol/l diente als Kontrollexperiment. Der Gefäßdurchmesser wurde auf den Wert vor Applikation von ET-1 normalisiert (der Wert zur Zeit „a“ wurde gleich 1 gesetzt).

IV. Diskussion

Diese Arbeit zeigt erstmalig, dass ET-1 eine ET_A-Rezeptor vermittelte Konstriktion der A. cochlearis propria auslöst. Die Endothelin-induzierte Konstriktion wurde von einem transienten [Ca²⁺]_i-Anstieg eingeleitet, der einem IP₃-Rezeptor-getriggertem Ca²⁺-Ausstrom aus zytosolischen Ca²⁺-Speichern entsprach. Dieser den [Ca²⁺]_i-Anstieg vermittelnde Transduktionsweg schaltete sich rasch ab, ohne dadurch die einhergehende Konstriktion signifikant zu schwächen. Der funktionell bedeutungsvollere Transduktionsweg der ET-1 induzierten Konstriktion war die von transienten [Ca²⁺]_i-Mobilisierungen unabhängige, über Rho-Kinase vermittelte Ca²⁺-Sensitisierung des kontraktiven Apparates. Dieser Transduktionsweg wird bereits durch Schwellenkonzentrationen von ET-1 (0.1 nmol/l) aktiviert. Dabei liegt dieser ET-1 induzierten Ca²⁺-Sensitisierung funktionell wahrscheinlich eine Rho-Kinase-abhängige Hemmung der MLCP zugrunde (Somlyo *et al.*, 1989; Matsui *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 1996).

Die ET-1 induzierte Konstriktion ist ET_A-Rezeptor vermittelt

Die Schlussfolgerung, dass ET_A-Rezeptoren die ET-1 induzierte Vasokonstriktion in der A. cochlearis propria vermitteln, wird von zwei Beobachtungen getragen. Erstens: die Wirksamkeitsreihenfolge der Endothelin-Rezeptor-Agonisten an der A. cochlearis propria ist charakteristisch für ET_A-Rezeptoren: ET-1 >> ET-3 > S6c (Vigne *et al.*, 1990a; Watanabe *et al.*, 1989; Rubanyi & Polokoff, 1994). Zweitens: Die K_{DB} -Werte für die Antagonisten BQ-123 und BQ-788 für die ET-1 induzierte Konstriktion in der A. cochlearis propria entsprechen dem Muster für ET_A-Rezeptoren. Dieses Muster wird von den K_{DB} -Werten für BQ-123 und BQ-788 von Geweben die entweder ET_A- oder ET_B-Rezeptoren exprimieren, beschrieben (siehe Abb.16). Die Annahme, dass eine Subpopulation von ET_B-Rezeptoren zur

Konstriktion beitragen, kann weitgehend ausgeschlossen werden, da der ET_B-Rezeptor Agonist Sarafotoxin S6c bis zu einer Konzentration von 100 nmol/l weder kontrahierend noch dilatierend wirkte (der zu erwartende EC₅₀ für Sarafotoxin S6c liegt im unteren nanomolaren Bereich) (LaDouceur *et al.*, 1993; Pang *et al.*, 1998; Seo *et al.*, 1994). Diese Daten zeigen somit, dass die ET-1 induzierte Vasokonstriktion in der A. cochlearis propria ausschließlich von ET_A-Rezeptoren vermittelt wird.

ET_A-Rezeptoren aktivieren unterschiedliche Transduktionswege

Im allgemeinen korreliert das Ausmaß der Konstriktion mit dem Umfang der Phosphorylierung der regulatorischen Myosin Leichtketten (MLC₂₀) (Kamm & Stull, 1985; Hartshorne, 1987). Der Phosphorylierungszustand der MLC₂₀ unterliegt der dualen Kontrolle durch die Myosin Leichtkettenkinase (MLCK) und der Myosin Leichtkettenphosphatase (MLCP) (Hartshorne *et al.*, 1998; Stull *et al.*, 1998). Der klassische Transduktionsweg, durch den Agonisten eine MLC₂₀-Phosphorylierung auslösen, beginnt mit einem Rezeptor-gesteuerten [Ca²⁺]_i-Anstieg. Ihm folgt eine Ca²⁺-Calmodulin abhängige Aktivierung der MLCK, welche die MLC₂₀ phosphoryliert und dadurch die Konstriktion einleitet. Der MLC₂₀-Phosphorylierung wirkt die MLCP entgegen (siehe Abb.1). Sie dephosphoryliert die MLC₂₀ und limitiert dadurch die Konstriktion. Die Aktivität der MLCP unterliegt einer Ca²⁺-unabhängigen Regulation. Eine Hemmung der MLCP erhöht den Phosphorylierungszustand der MLC₂₀ und somit das Ausmaß der Konstriktion bei gleichen [Ca²⁺]_i. Dieser Transduktionsweg führt zu einer „Ca²⁺-unabhängigen“ Konstriktion, was generell „Ca²⁺-Sensibilisierung der Myofilamente“ bezeichnet wird (Kitazawa *et al.*, 1991a; Somlyo & Somlyo, 1994; Somlyo & Somlyo, 2000). Diese Studie zeigt, dass Stimulierung von ET_A-Rezeptoren in der

A. cochlearis propria sowohl Ca^{2+} -mobilisierende als auch Ca^{2+} -sensibilisierende Transduktionswege aktiviert. Suggestiert wird diese Annahme durch den Befund, dass die ET-1 induzierte Konstriktion nicht mit dem $[Ca^{2+}]_i$ -Verlauf korreliert (siehe Abb.10). Der relativ schnell reversible intrazelluläre Ca^{2+} -Anstieg geht mit einer starken, andauernden Konstriktion einher, welche nach Auswaschen von ET-1 aus dem Superfusat für mindestens weitere 20 Minuten bestehen bleibt (Abb.10 und 11). Diese langanhaltende Konstriktion ist nicht eine intrinsische chemische Eigenschaft des Peptides oder ein experimenteller Artefakt, da sich der Antagonist BQ-123, ebenfalls ein Peptid, in einer 100-fach höheren Konzentration leicht auswaschen ließ und in anderen Präparationen homologe Beobachtungen gemacht wurden (Joshua, 1990; Kobayashi *et al.*, 1990).

ET_A-Rezeptor vermittelte Ca^{2+} -Mobilisierung

Die Ca^{2+} -mobilisierende Signaltransduktion von ET_A-Rezeptoren läuft in der A. cochlearis propria über eine Aktivierung von Phospholipase C mit darauf folgender, IP₃-vermittelter, Ca^{2+} -Mobilisierung aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern, sowie einem Ca^{2+} -Influx aus dem extrazellulären Kompartiment. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit anderen Studien (Vigne *et al.*, 1990a; Yang *et al.*, 1994). Der ET-1 induzierte transiente zytosolische Ca^{2+} -Anstieg entspricht hauptsächlich einer Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern, da er in der An- oder Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} gleich stark ausgeprägt war (Abb.10 und 18). Dieser ET-1 induzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Transient ist IP₃-Rezeptor vermittelt. Anhalt hierfür erbringt der IP₃-Rezeptor Antagonist 2-APB. Der Ca^{2+} -Transient wird durch 75 µmol/l 2-APB in der Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} signifikant geblockt (Abb.19). Es ist gezeigt worden, dass Konzentrationen von bis zu 100 µmol/l 2-APB IP₃-Rezeptoren hemmen, ohne

unspezifische Seiteneffekte auszulösen (Ma *et al.*, 2000). Mit Thapsigargin oder Ryanodine lassen sich die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher entleeren. Thapsigargin führt zu einer Speicherentleerung, indem es die sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA) blockt, welche kontinuierlich Ca^{2+} in die Speicher pumpt (Sagara & Inesi, 1991; Wictome *et al.*, 1992; Kijima *et al.*, 1991). Nach Applikation von 1 $\mu\text{mol/l}$ Thapsigargin wurde der ET-1 induzierte transiente $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg verhindert und die Konstriktion abgeschwächt (Abb.20). Das Epiphänomen des Thapsigargin-induzierten transienten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieges mit einhergehender transients Konstriktion (Abb.20), ist vereinbar mit kapazitivem Ca^{2+} -Influx (Putney, Jr., 1986; Berridge, 1995). Eine andere Erklärung wäre, dass es sich um die genuine Wirkung des intrazellulär freigesetzten Ca^{2+} handelt (Barritt, 1999). Dieser Thapsigargin-induzierte transiente Anstieg des globalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ belegt den unterschiedlichen Wirkungsmechanismus der Thapsigargin- im Gegensatz zur Ryanodine-induzierten Ca^{2+} -Speicherentleerung. Applikation von 1 $\mu\text{mol/l}$ Ryanodine öffnet Ryanodine-Rezeptorkanäle des endoplasmatischen Retikulums (Jaggar *et al.*, 2000). Da sich diese Ryanodine-Rezeptoren in unmittelbarer Nachbarschaft zur Plasmamembran befinden, kommt es zu einem lokalisierten Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im subplasmalemalem Kompartiment, ohne dass die globale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ansteigt. Der lokale subplasmalemale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg aktiviert Ca^{2+} -sensitive K^+ -Kanälen (BK_{Ca}) in der Plasmamembran, wodurch eine hyperpolarisationsbedingte Inhibition von spannungsabhängigen L-type Ca^{2+} -Kanälen stattfindet (Nelson *et al.*, 1995; Knot *et al.*, 1998). Dies führt zu einem Abfall des globalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit einhergehender Gefäßdilatation der A. cochlearis propria (Abb.21) (Wangemann *et al.*, 2001; Wangemann *et al.*, 1998). Homolog zur Thapsigargin-induzierten Ca^{2+} -Speicherentleerung ist, dass 1 $\mu\text{mol/l}$ Ryanodine die ET-1 induzierte Konstriktion ebenfalls signifikant abschwächt (Abb.21). Die

ET-1 induzierte Konstriktion ist auch von Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Kompartiment abhängig, da in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} die Konstriktion transient wurde und sich erst wieder nach erneutem Einstellen der normalen extrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ voll entfaltete (Abb.18). Eine durch ET-1 induzierte Zunahme des Ca^{2+} -Einstromes scheint jedoch in der A. cochlearis propria nicht stattzufinden, da das $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Plateau, welches sich nach dem ET-1 induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Peak einstellt, nahezu dem Ausgangsniveau der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ entspricht (Abb.10).

Der Transduktionsweg der zytosolischen Ca^{2+} -Mobilisierung wird rasch abgeschaltet, wenn ET-1 in kumulativen Dosen appliziert wird, wie die Daten in Abb. 22, 23 und Tab.2 zeigen. Die Annahme, dass es sich um eine Desensibilisierung des Transduktionsweges handelt und nicht lediglich um leergelaufene Ca^{2+} -Speicher, wird von drei Beobachtungen gestützt. Erstens beeinflussen leergelaufene Ca^{2+} -Speicher nicht nur den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg, sondern ebenfalls die Konstriktion (siehe Abb.20). Die ET-1 induzierte Konstriktion entfaltete sich jedoch uneingeschränkt. Zweitens war die Applikation von 0.3 nmol/l ET-1 ausreichend um den Ca^{2+} -Transduktionsweg für nachfolgende ET-1 Applikationen auszuschalten. Da 0.3 nmol/l ET-1 nur geringe $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege auslöst, ist es unwahrscheinlich, dass die zweiminütige Applikation ausreicht, die intrazellulären Speicher zu leeren. Und Drittens vermögen wiederholte Stimulierungen anderer $G_{q/11}$ gekoppelter Rezeptoren der A. cochlearis propria (α_{1A} -adrenerg, P_2Y) nicht, den Transduktionsweg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Mobilisierung abzuschalten (Scherer und Wangemann, *nicht publizierte Beobachtung*). Diese schnelle Desensibilisierung der ET-1 induzierten zytosolischen Ca^{2+} -Mobilisierung stimmt mit den Beobachtungen an anderen Präparationen überein (Miasiro & Paiva, 1990; Fu *et al.*, 1989; Oles *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 2000).

ET_A-Rezeptor vermittelte Ca²⁺-Sensibilisierung des kontraktiles Apparates

Die Tatsache, dass ET-1 induzierte Konstriktionen der A. cochlearis propria auch ohne Änderungen der [Ca²⁺]_i stattfinden, deutet auf die Aktivierung eines Ca²⁺-sensibilisierenden Transduktionsweges (siehe Abb.22, 23 und Tab.2). Die [Ca²⁺]_i-Konstriktionskurven in An- oder Abwesenheit von ET-1 verdeutlichen die Ca²⁺-sensibilisierende Wirkung von ET-1 (Abb. 26 und Tab.3). Abbildung 26 zeigt, dass in Anwesenheit von 0.1 nmol/l ET-1 die durch Erhöhen der extrazellulären [Ca²⁺] (von 0 auf 1, 3 und 10 mmol/l) ausgelösten [Ca²⁺]_i-Anstiege unbeeinflusst bleiben, während die einhergehenden Konstriktionen signifikant stärker werden (siehe auch Tab.3). Die [Ca²⁺]_i-Konstriktionskurve in Anwesenheit von 0.1 nmol ET-1 ist im Vergleich zur Kontrollkurve signifikant steiler und nach links verschoben (Abb.26). Die Linksverschiebung und zunehmende Steilheit der [Ca²⁺]_i-Konstriktionskurve reflektiert den Ca²⁺-sensibilisierenden Effekt von 0.1 nmol/l ET-1. Dass es sich bei den stärker werdenden Konstriktionen nicht um einen experimentellen Artefakt über die Zeit handelt, belegen die Kontrollexperimente in Abb. 24 und 25. Wiederholte Erhöhungen der extrazellulären [Ca²⁺] führten weder zu signifikanten Änderungen der [Ca²⁺]_i-Anstiege noch der einhergehenden Konstriktionen. Die Kontrollexperimente belegen ebenfalls, dass bei höheren [Ca²⁺]_i die [Ca²⁺]_i-Konstriktionskurve abflacht (Abb.25B). Es ist daher vorstellbar, dass die Kontroll- und ET-1-induzierten Dosiswirkungskurven bei genügend hohen [Ca²⁺]_i vergleichbare Konstriktionsmaxima erreichen. Dass bereits Schwellenkonzentrationen von ET-1 die Ca²⁺-Sensitivität und damit die Reagibilität der Myofilamente so ausgeprägt steigern, deutet darauf hin, dass dieser Mechanismus von grosser funktioneller Relevanz ist.

Eine Ca²⁺-Sensibilisierung des kontraktiles Apparates wird durch Inhibition der MLCP erreicht, was durch zwei Kinasen vermittelt werden kann: Proteinkina-

se C (PKC) und Rho-Kinase (Somlyo & Somlyo, 2000; Fukata *et al.*, 2001). ET_A Rezeptoren können die PKC aktivieren, da sie über trimerische G-Proteine (G_{q/11}) an die Phospholipase C (PLC) gekoppelt sind (siehe Einleitung und Abb.1) (Rubanyi & Polokoff, 1994). Stimulierung der PLC setzt neben IP₃ auch Diacylglycerol (DAG) frei, den Botenstoff, der die PKC aktiviert. PKC kann das Protein CPI-17 phosphorylieren, was dann an die MLCP bindet und sie dadurch hemmt (Masuo *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1998; Kitazawa *et al.*, 1999; Gokina & Osol, 1998; Kitazawa *et al.*, 2000). Der PLC Antagonist 1µmol/l U73122 (Yule & Williams, 1992) konnte die ET-1 induzierte Konstriktion vollständig aufheben (Abb.17). Das inaktive Isomer von U73122, U73343, diente als Kontrollsubstanz und zeigte keinen Einfluss auf die ET-1 induzierte Konstriktion (Abb.17). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass ET_A-Rezeptoren der A. cochlearis propria über heterotrimerische G-Proteine der Familie G_{q/11} an die PLC gekoppelt sind und diese Kopplung für die Konstriktion unerlässlich ist. Es ist somit wahrscheinlich, dass PKC eine noch ungeklärte Rolle in der ET-1 induzierten Konstriktion spielt. Hiermit stimmen die Befunde aus kultivierten Gefäßmuskelzellen der bovinen Aorta überein (Gohla *et al.*, 2000). Es muss angemerkt werden, dass der Antagonist U73122 in einigen Studien ebenfalls die Phospholipase A₂ (PLA₂) blockte (Heemskerk *et al.*, 1997; Lockhart & McNicol, 1999; Leis *et al.*, 2000). Eine Beteiligung der PLA₂ an der ET-1 Konstriktion kann somit nicht ausgeschlossen werden. Dies ist insbesondere interessant, da die durch PLA₂ freigesetzte Arachidonsäure ein Aktivator des Rho-Kinase Transduktionsweges ist (Gong *et al.*, 1992; Fu *et al.*, 1998; Araki *et al.*, 2001). In kultivierten glatten Muskelzellen konnte ebenfalls eine Kopplung von ET_A-Rezeptoren an PLA₂ nachgewiesen werden (Wu-Wong *et al.*, 1996b; Resink *et al.*, 1989; Reynolds *et al.*, 1989). Somit kann die durch den Antagonisten U73122 erreichte Inhibition

der ET-1 induzierten Konstriktion sowohl über eine PKC-vermittelte, als auch über eine Arachidonsäure-Rho-Kinase-vermittelte Ca^{2+} -Sensibilisierung erklärt werden.

Eindeutig ist hingegen die Beteiligung des Rho-Kinase Transduktionsweges an der ET-1 induzierten Konstriktion und Ca^{2+} -Sensibilisierung (Abb. 27, 28 und 29). Rho-Kinase hemmt die MLCP, indem sie ihre Myosinbindungsuntereinheit (MBS) phosphoryliert (Kimura *et al.*, 1996). Der selektive Rho-Kinase Antagonist 1 $\mu\text{mol/l}$ Y27632 (Uehata *et al.*, 1997) konnte die durch 0.1 nmol/l ET-1 induzierte Ca^{2+} -Sensibilisierung vollständig verhindern (Abb.27). Die durch 10 nmol/l ET-1 induzierte Konstriktion ließ sich durch 10 $\mu\text{mol/l}$ des Rho-Kinase Antagonisten Y-27632 nahezu aufheben (Abb.28). Ferner zeigt Abbildung 29, dass in Anwesenheit von 10 $\mu\text{mol/l}$ Y27632 der ET-1 vermittelte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg unbeeinflusst blieb, während die Konstriktion stark inhibiert wurde und daraufhin dem intrazellulären Ca^{2+} -Verlauf spiegelbildlich folgte. Diese Daten belegen, dass die ET-1 getriggerte Ca^{2+} -Sensibilisierung Rho-Kinase vermittelt ist, und dass dieser Transduktionsweg in der A. cochlearis propria der Wichtigste ist, um eine ET-1 induzierte Konstriktion auszulösen. Das bereits Schwellenkonzentrationen von 0.1 nmol/l ET-1 stark Ca^{2+} -sensibilisierend wirken, bekräftigt die physiologische Relevanz dieses Transduktionsweges. Die ausschlaggebende Rolle des Rho-Kinase-Transduktionsweges in der Ca^{2+} -Sensibilisierung von glatten Gefäßmuskelzellen, steht in Einklang mit einer Reihe von Studien die an permeabilisierten Gefäßen durchgeführt wurden (Uehata *et al.*, 1997; Fujihara *et al.*, 1997; Fu *et al.*, 1998). Bolz *et al.* haben die Ca^{2+} -sensibilisierende Rolle des RhoA- Rho-Kinase-Transduktionsweges in nativen, nicht permeabilisierten Widerstandsgefäßen nachgewiesen (Bolz *et al.*, 2000). Die Ergebnisse von Bolz *et al.* bestätigen die Resultate der vorliegenden Arbeit insbesondere, da die Ca^{2+} -

Sensitivität des kontraktiven Apparates mit einem vergleichbaren Protokoll an ebenfalls nativen Gefäßen bestimmt wurde. Die Rho-Kinase vermittelte, Ca^{2+} -sensibilisierende Rolle von ET-1 ist bisher nur an kultivierten Gefäßmuskelzellen (Gohla *et al.*, 2000) und Bronchial- bzw. Trachealmuskelzellen nachgewiesen worden (Yoshii *et al.*, 1999).

Physiologische Relevanz von ET-1, ET_A -Rezeptoren und Rho-Kinase in der A. cochlearis propria:

Obwohl die Transduktionswege von ET_A -Rezeptoren in der A. cochlearis propria noch nicht vollständig geklärt sind, lassen sich Hypothesen bezüglich der physiologischen und pathophysiologischen Relevanz dieses Rezeptors aufstellen. Die Regulation des Gefäßtonus der A. cochlearis propria durch ET-1 und ET_A -Rezeptoren erfolgt hauptsächlich auf parakriner und nicht endokriner Ebene. Diese Schlussfolgerung beruht auf zwei Tatsachen. Erstens ist die Plasmakonzentration von ET-1, die beim Menschen 5×10^{-13} mol/l beträgt (Lam *et al.*, 1991), 200-fach niedriger als die Schwellenkonzentration für die ET-1 induzierte Konstriktion. Und zweitens sezernieren kultivierte Endothelzellen bis zu 90% des ET-1 abluminal in Richtung der glatten Gefäßmuskelzellen (Yoshimoto *et al.*, 1991; Unoki *et al.*, 1999). Diese polarisierte ET-1 Sekretion gewährleistet physiologisch relevante ET-1 Konzentrationen im Interstitium und damit eine parakrine Regulation des Gefäßtonus. Unter pathophysiologischen Bedingungen (oxidativer Stress, Herz- und Hirninfarkt (Levin, 1995)) steigen die ET-1 Plasmakonzentrationen signifikant an. Diese Plasmakonzentrationen liegen immer noch etwa um das Zehnfache unter der Schwellenkonzentration, welche eine Konstriktion auslöst, jedoch bereits in einem Bereich, wo der Ca^{2+} -sensibilisierende Effekt von ET-1 zu greifen beginnt. Die Ca^{2+} -Sensibilisierung des

kontraktilen Apparates potenziert Konstriktionen durch andere vasoaktive Substanzen wie Norepinephrin (Scherer & Wangemann, nicht publizierte Beobachtung). Oxidativer Stress durch oxLDL und Toxine (wie z.B. LPS, einem Toxin Gram-negativer Bakterien) aktivieren ebenfalls den Rho-Kinase Transduktionsweg (Bolz *et al.*, 2000; Essler *et al.*, 2000) und regen zusätzlich das Endothel an, vermehrt ET-1 zu produzieren und sezernieren (Xie & Bevan, 1999). Im gesunden Gefäßbett besteht ein Gleichgewicht zwischen Ca^{2+} -sensitierenden und -desensitierenden Faktoren. Die am stärksten Ca^{2+} -desensitierenden Mediatoren sind allen voran NO (Stickstoffmonoxid) (Sauzeau *et al.*, 2000), das ebenfalls von Endothelzellen produziert wird und CGRP (Calcitonin gene related peptid), welches hauptsächlich von perivaskulären Nervenvesikeln sezerniert wird (Kawasaki *et al.*, 1988; Herzog *et al.*, 2001). Die NO-Synthese wird auch durch oxidativen Stress beeinträchtigt. Unter pathophysiologischen Bedingungen überwiegen die Ca^{2+} -sensitierenden Faktoren über die Ca^{2+} -desensitierenden. Für Krankheitsbilder wie der Subarachnoidalblutung oder dem Schlaganfall ist die pathophysiologische Bedeutung des Rho-kinase Transduktionsweg und von ET-1 im Tiermodell gesichert (Sato *et al.*, 2000; Toshima *et al.*, 2000; Satoh *et al.*, 2001). Das Ausmaß des Schadens kann hier durch Rho-Kinase Antagonisten wie Y-27632 und Fasudil eingeschränkt werden. Es ist somit denkbar, dass die oben aufgezählten Faktoren (oxidativer Stress, Toxine, systemisch erhöhte ET-1 Konzentrationen) über eine ET-1 induzierte Ca^{2+} -Sensibilisierung die Durchblutung der Cochlea einschränken können. Da die Gewebe des Innenohres sehr ischämieempfindlich sind, ist ein kausaler Zusammenhang zum Hörsturz naheliegend. Die Ursachen für den Hörsturz, einer häufigen Erkrankung des Innenohres, sind nach wie vor ungeklärt. Eine vaskuläre Genese wird seit langem diskutiert und favorisiert. Der Mechanismus

der ET-1 induzierten, Rho-Kinase vermittelten Ca^{2+} -Sensitisierung könnte somit ein Glied in der Pathogenese des Hörsturzes und dadurch ein Schritt in Richtung einer rationalen Pharmakotherapie des Hörsturzes darstellen.

Diese Arbeit zeigt erstmalig, dass ET-1 eine langanhaltende, ET_A -Rezeptor vermittelte Vasokonstriktion der A. cochlearis propria induziert. Stimulierte ET_A -Rezeptoren aktivieren unterschiedliche Transduktionswege in der A. cochlearis propria. Ein Transduktionsweg vermittelt den transienten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg. Dieser läuft über eine Aktivierung von PLC und IP_3 -Rezeptoren mit darauf folgender Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären, Thapsigargin- und Ryanodine-sensitiven Ca^{2+} -Speichern. Interessanterweise, erfährt dieser Transduktionsweg eine rasche Desensitisierung, ohne jedoch die ET-1 induzierte Konstriktion zu beeinträchtigen. Ein zweiter Transduktionsweg läuft über eine Aktivierung von Rho-Kinase. Dieser Transduktionsweg wird nicht abgeschaltet, vermittelt die langanhaltende Konstriktion und eine Ca^{2+} -Sensitisierung des kontraktilen Apparates. Bereits Konzentrationen von 0.1 nmol/l ET-1 induzieren eine Ca^{2+} -Sensitisierung der A. cochlearis propria. Die Tatsache, dass ET-1 eine sehr starke, irreversible Konstriktion der A. cochlearis propria auslöst und bei bereits sehr niedrigen Konzentration die Ca^{2+} -Empfindlichkeit des Kontraktilen Apparates erhöht, erklärt es zu einem Kandidaten, der an der Pathogenese des Hörsturzes direkt oder indirekt beteiligt sein könnte.

V. Zusammenfassung

Die Arteria cochlearis propria (A. spiralis modioli) ist die Versorgungsarterie der Cochlea. Die Blutflussregulation der A. cochlearis propria ist von großem Interesse, da eine Beeinträchtigung des Blutflusses entlang dieser Arterie mit der Pathogenese des Hörsturzes und mit Symptomen wie Tinnitus vergesellschaftet sein könnte. Ziel dieser Arbeit war es, die Endothelin-induzierten Effekte an der A. cochlearis propria zu untersuchen, sowie die Endothelin-Rezeptoren und Transduktionswege, über die diese Effekte vermittelt werden, zu bestimmen.

Die A. cochlearis propria wurde aus Felsenbeinen von Wüstenrennmäusen unter Verwendung mikrodissektorischer Techniken isoliert. Unter Verwendung der Video- und Fluoreszenzmikroskopie wurden Gefäßdurchmesser und intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) der isolierten A. cochlearis propria simultan gemessen.

ET-1 induzierte einen transienten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg und eine ausgeprägte, langanhaltende Konstriktion, mit einer halbmaximal wirksamen Konzentration (EC_{50}) von 0.6 nmol/l. Der EC_{50} für den Agonisten ET-3 war >10 nmol/l. Der ET_B -Rezeptor Agonist Sarafotoxin S6c zeigte keinen Effekt. Die Endothelin-Rezeptorantagonisten BQ-123 und BQ-788 hatten die Affinitätskonstanten (K_{DB}) 24 und 77 nmol/l. Diese Affinitätskonstanten liegen in dem für ET_A -Rezeptoren charakteristischen Bereich. Sowohl die Wirksamkeiten der Agonisten als auch die Affinitätskonstanten der Antagonisten belegen, dass die Endothelin-induzierte Konstriktion der A. cochlearis propria ausschließlich durch ET_A -Rezeptoren vermittelt wird.

Die durch ET-1 stimulierten ET_A -Rezeptoren aktivierten Ca^{2+} -mobilisierende und -sensitisierende Transduktionswege. Der Ca^{2+} -mobilisierende Transduktionsweg spiegelte sich in einem transienten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg. Dieser

Transduktionsweg war unabhängig von extrazellulärem Ca^{2+} -Influx, wurde durch den IP_3 -Rezeptor-Blocker (75 $\mu\text{mol/l}$) 2-APB gehemmt, durch Entleeren der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher mit (1 $\mu\text{mol/l}$) Thapsigargin verhindert und unterlag einer raschen Desensibilisierung. Entleeren der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher mit (1 $\mu\text{mol/l}$) Ryanodine schwächte die ET-1 induzierte Konstriktion ebenfalls signifikant ab. Blocken der Phospholipase C mit dem Antagonisten (1 $\mu\text{mol/l}$) U73122 löste die ET-1 induzierte Konstriktion nahezu vollständig auf. Die Ca^{2+} -sensibilisierende Wirkung von ET-1 fand bereits bei sehr geringen Konzentrationen statt. Bereits 0.1 nmol/l ET-1 erhöhte die Ca^{2+} -Empfindlichkeit der Myofilamente (Ca^{2+} -Sensibilisierung) und verschob die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konstriktions-Dosiswirkungskurve nach links. Die durch ET-1 induzierte Ca^{2+} -Sensibilisierung konnte mit dem selektiven Rho-Kinase Hemmer (1 $\mu\text{mol/l}$) Y-27632 aufgehoben werden. Die durch 10 nmol/l ET-1 ausgelösten Konstriktionen konnten ebenfalls durch Y-27632 geblockt werden.

Diese Arbeit demonstriert somit, dass die ET-1 induzierten Konstriktionen und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege in der A. cochlearis propria der Wüstenspringmaus über ET_A -Rezeptoren vermittelt werden. Die ET-1 induzierten, transienten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege waren IP_3 -Rezeptor-vermittelt und entsprachen einer Ca^{2+} -Freisetzung aus Thapsigargin- und Ryanodine-sensitiven intrazellulären Ca^{2+} -Speichern. Dieser Ca^{2+} -mobilisierende Transduktionsweg desensibilisiert rasch. Die ET-1 induzierte Konstriktion erfolgt hauptsächlich über eine Rho-Kinase vermittelte Ca^{2+} -Sensibilisierung des kontraktile Apparates. Dieser Transduktionsweg erfährt keine Desensibilisierung. Die zentrale Stellung von ET-1, ET_A -Rezeptoren und des Rho-Kinase Transduktionsweges in der Regulation des Gefäßtonus, sowie in der Pathogenese vieler Gefäßerkrankungen, machen sie zu potentiellen Kandidaten in der Pathogenese des Hörsturzes.

VI. Literaturverzeichnis

- Adachi, M., Yang, Y. Y., Furuichi, Y., & Miyamoto, C. (1991). Cloning and characterization of cDNA encoding human A-type endothelin receptor. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **180**, 1265-1272.
- Alessi, D., MacDougall, L. K., Sola, M. M., Ikebe, M., & Cohen, P. (1992). The control of protein phosphatase-1 by targeting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1. *Eur.J.Biochem.* **210**, 1023-1035.
- Araki, S., Ito, M., Kureishi, Y., Feng, J., Machida, H., Isaka, N., Amano, M., Kaibuchi, K., Hartshorne, D. J., & Nakano, T. (2001). Arachidonic acid-induced Ca²⁺ sensitization of smooth muscle contraction through activation of Rho-kinase. *Pflugers Arch.* **441**, 596-603.
- Barritt, G. J. (1999). Receptor-activated Ca²⁺ inflow in animal cells: a variety of pathways tailored to meet different intracellular Ca²⁺ signalling requirements. *Biochem.J.* **337 (Pt 2)**, 153-169.
- Berridge, M. J. (1995). Capacitative calcium entry [see comments]. *Biochem.J.* **312 (Pt 1)**, 1-11.
- Bolz, S. S., Galle, J., Derwand, R., de Wit, C., & Pohl, U. (2000). Oxidized LDL increases the sensitivity of the contractile apparatus in isolated resistance arteries for Ca²⁺ via a rho- and rho kinase- dependent mechanism. *Circulation* **102**, 2402-2410.

- Clark, A. J. (1933). *The Mode of Action of Drugs on Cells* E. Arnold and Co., London.
- Cyr, C., Huebner, K., Druck, T., & Kris, R. (1991). Cloning and chromosomal localization of a human endothelin ET_A receptor. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **181**, 184-190.
- Davis, H. (1965). A model for transducer action in the cochlea. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **30**, 181-190.
- Essler, M., Staddon, J. M., Weber, P. C., & Aepfelbacher, M. (2000). Cyclic AMP blocks bacterial lipopolysaccharide-induced myosin light chain phosphorylation in endothelial cells through inhibition of Rho/Rho kinase signaling. *J.Immunol.* **164**, 6543-6549.
- Evans, A. M., Cobban, H. J., & Nixon, G. F. (1999). ET(A) receptors are the primary mediators of myofilament calcium sensitization induced by ET-1 in rat pulmonary artery smooth muscle: a tyrosine kinase independent pathway. *British Journal of Pharmacology* **127**, 153-160.
- Fu, T., Chang, W., Ishida, N., Saida, K., Mitsui, Y., Okano, Y., & Nozawa, Y. (1989). Effects of vasoactive intestinal contractor (VIC) and endothelin on intracellular calcium level in neuroblastoma NG108-15 cells. *FEBS Lett.* **257**, 351-353.
- Fu, X., Gong, M. C., Jia, T., Somlyo, A. V., & Somlyo, A. P. (1998). The effects of the Rho-kinase inhibitor Y-27632 on arachidonic acid-, GTPgammaS-, and

phorbol ester-induced Ca^{2+} -sensitization of smooth muscle. *FEBS Lett.* **440**, 183-187.

Fujihara, H., Walker, L. A., Gong, M. C., Lemichez, E., Boquet, P., Somlyo, A. V., & Somlyo, A. P. (1997). Inhibition of RhoA translocation and calcium sensitization by in vivo ADP-ribosylation with the chimeric toxin DC3B. *Mol. Biol. Cell* **8**, 2437-2447.

Fukata, Y., Amano, M., & Kaibuchi, K. (2001). Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 32-39.

Gohla, A., Schultz, G., & Offermanns, S. (2000). Role for G(12)/G(13) in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction. *Circ. Res.* **87**, 221-227.

Gokina, N. I. & Osol, G. (1998). Temperature and protein kinase C modulate myofilament Ca^{2+} sensitivity in pressurized rat cerebral arteries. *Am. J. Physiol* **274**, H1920-H1927.

Gong, M. C., Fuglsang, A., Alessi, D., Kobayashi, S., Cohen, P., Somlyo, A. V., & Somlyo, A. P. (1992). Arachidonic acid inhibits myosin light chain phosphatase and sensitizes smooth muscle to calcium. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 21492-21498.

Hartshorne, D. J. (1987). Biochemistry of the Contractile Process in Smooth Muscle. In *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, ed. Johnson, L. R., pp. 423-482. Raven Press, New York.

- Hartshorne, D. J., Ito, M., & Erdodi, F. (1998). Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation
22. *J.Muscle Res.Cell Motil.* **19**, 325-341.
- Haynes, W. G., Strachan, F. E., & Webb, D. J. (1995). Endothelin ET_A and ET_B receptors cause vasoconstriction of human resistance and capacitance vessels in vivo. *Circulation* **92**, 357-363.
- Heemskerk, J. W., Feijge, M. A., Sage, S. O., & Farndale, R. W. (1997). Human platelet activation is inhibited upstream of the activation of phospholipase A2 by U73343. *Biochem.Pharmacol.* **53**, 1257-1262.
- Herrmann-Frank, A., Darling, E., & Meissner, G. (1991). Functional characterization of the Ca²⁺-gated Ca²⁺ release channel of vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Pflugers Arch.* **418**, 353-359.
- Herzog, M., Scherer, E. Q., Albrecht, B., Schimanski, S., Scofield, M. A., & Wangemann, P. Calcitonin-gene-related peptide (CGRP) receptors mediate vasodilation of the spiral modiolar artery (SMA). *Assoc.Res.Otolaryngol.* [24], 100. 2001. (Abstract)
- Hirata, Y., Emori, T., Eguchi, S., Kanno, K., Imai, T., Ohta, K., & Marumo, F. (1993). Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J.Clin.Invest* **91**, 1367-1373.
- Ihara, M., Yamanaka, R., Ohwaki, K., Ozaki, S., Fukami, T., Ishikawa, K., Towers, P., & Yano, M. (1995). [3H]BQ-123, a highly specific and reversible

radioligand for the endothelin ETA receptor subtype. *Eur.J.Pharmacol.* **274**, 1-6.

Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyauchi, T., Goto, K., & Masaki, T. (1989a). The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**, 2863-2867.

Inoue, A., Yanagisawa, M., Takuwa, Y., Mitsui, Y., Kobayashi, M., & Masaki, T. (1989b). The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 14954-14959.

Ishikawa, K., Ihara, M., Noguchi, K., Mase, T., Mino, N., Saeki, T., Fukuroda, T., Fukami, T., Ozaki, S., & Nagase, T. (1994). Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91** , 4892-4896.

Jaggar, J. H., Porter, V. A., Lederer, W. J., & Nelson, M. T. (2000). Calcium sparks in smooth muscle. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **278**, C235-C256.

Jinnouchi, K. (2001). Mechanism of endothelin 1 production in the cochlea of rats. *ORL J.Otorhinolaryngol.Relat Spec.* **63**, 6-11.

Jinnouchi, K., Tomiyama, S., Pawankar, R., Ikezono, T., & Yagi, T. (1997). Distribution of endothelin-1-like activity in the cochlea of normal guinea pigs. *Acta Otolaryngol.(Stockh)* **117**, 41-45.

- Joshua, I. G. (1990). Endothelin-induced vasoconstriction of small resistance vessels in the microcirculation of the rat cremaster muscle. *Microvasc.Res.* **40**, 191-198.
- Kamm, K. E. & Stull, J. T. (1985). The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle
37. Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol. **25**, 593-620.
- Kawasaki, H., Takasaki, K., Saito, A., & Goto, K. (1988). Calcitonin gene-related peptide acts as a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of the rat. *29. Nature* **335**, 164-167.
- Kenakin, T. Pharmacological Analysis of Drug-Receptor Interaction. 3rd edition. 1997. Lippincott Williams & Wilkins Publishers.
- Kijima, Y., Ogunbunmi, E., & Fleischer, S. (1991). Drug action of thapsigargin on the Ca²⁺ pump protein of sarcoplasmic reticulum
1. Journal of Biological Chemistry **266**, 22912-22918.
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., & Kaibuchi, K. (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* **273**, 245-248.
- Kitazawa, T., Eto, M., Woodsome, T. P., & Brautigan, D. L. (2000). Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein

of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 9897-9900.

Kitazawa, T., Gaylinn, B. D., Denney, G. H., & Somlyo, A. P. (1991a). G-protein-mediated Ca^{2+} sensitization of smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 1708-1715.

Kitazawa, T., Masuo, M., & Somlyo, A. P. (1991b). G protein-mediated inhibition of myosin light-chain phosphatase in vascular smooth muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**, 9307-9310.

Kitazawa, T., Takizawa, N., Ikebe, M., & Eto, M. (1999). Reconstitution of protein kinase C-induced contractile Ca^{2+} sensitization in triton X-100-demembranated rabbit arterial smooth muscle [see comments]. *J.Physiol (Lond)* **520 Pt 1**, 139-152.

Kloog, Y., Ambar, I., Sokolovsky, M., Kochva, E., Wollberg, Z., & Bdolah, A. (1988). Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. *Science* **242**, 268-270.

Knot, H. J., Standen, N. B., & Nelson, M. T. (1998). Ryanodine receptors regulate arterial diameter and wall $[\text{Ca}^{2+}]$ in cerebral arteries of rat via Ca^{2+} -dependent K^+ channels. *J.Physiol* **508 (Pt 1)**, 211-221.

Kobayashi, H., Hayashi, M., Kobayashi, S., Kabuto, M., Handa, Y., & Kawano, H. (1990). Effect of endothelin on the canine basilar artery. *Neurosurgery* **27**, 357-361.

- Kodama, M., Kanaide, H., Abe, S., Hirano, K., Kai, H., & Nakamura, M. (1989). Endothelin-induced Ca-independent contraction of the porcine coronary artery. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **160**, 1302-1308.
- Koyama, M., Ito, M., Feng, J., Seko, T., Shiraki, K., Takase, K., Hartshorne, D. J., & Nakano, T. (2000). Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho-kinase. *FEBS Lett.* **475**, 197-200.
- LaDouceur, D. M., Flynn, M. A., Keiser, J. A., Reynolds, E., & Haleen, S. J. (1993). ET_A and ET_B receptors coexist on rabbit pulmonary artery vascular smooth muscle mediating contraction. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **196**, 209-215.
- Lam, H. C., Takahashi, K., Ghatei, M. A., Warrens, A. N., Rees, A. J., & Bloom, S. R. (1991). Immunoreactive endothelin in human plasma, urine, milk, and saliva. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **17 Suppl 7**, S390-S393.
- Leis, H. J., Kofeler, H., Raspotnig, G., Zach, D., Fauler, G., & Windischhofer, W. (2000). Effect of the aminosteroid U73122 on prostaglandin E(2) production in a murine clonal osteoblast-like cell line, MC3T3-E1. *Biochem.Pharmacol.* **60**, 899-904.
- Levin, E. R. (1995). Endothelins. *N.Engl.J.Med.* **333**, 356-363.
- Li, L., Eto, M., Lee, M. R., Morita, F., Yazawa, M., & Kitazawa, T. (1998). Possible involvement of the novel CPI-17 protein in protein kinase C signal

transduction of rabbit arterial smooth muscle. *J.Physiol (Lond)* **508 (Pt 3)**, 871-881.

Limbird, L. E. Methods for characterization of receptors based on receptor-mediated responses in tissue or intact cell preparations. Limbird, L. E. 23-51. 1986. Boston, MA, Martinus Nijhoff. Cell surface Receptors: A short course on theory and methods.

Lockhart, L. K. & McNicol, A. (1999). The phospholipase C inhibitor U73122 inhibits phorbol ester-induced platelet activation. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **289**, 721-728.

Ma, H. T., Patterson, R. L., van Rossum, D. B., Birnbaumer, L., Mikoshiba, K., & Gill, D. L. (2000). Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca²⁺ channels. *Science* **287**, 1647-1651.

Masuo, M., Reardon, S., Ikebe, M., & Kitazawa, T. (1994). A novel mechanism for the Ca(2+)-sensitizing effect of protein kinase C on vascular smooth muscle: inhibition of myosin light chain phosphatase. *J.Gen.Physiol* **104**, 265-286.

Matsui, T., Amano, M., Yamamoto, T., Chihara, K., Nakafuku, M., Ito, M., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., & Kaibuchi, K. (1996). Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. 2. *EMBO J.* **15**, 2208-2216.

- Meyer, T., Oles, M., & Pott, L. (2000). Ca^{2+} entry but not Ca^{2+} release is necessary for desensitization of ET_A receptors in airway epithelial cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **361**, 120-126.
- Miasiro, N. & Paiva, A. C. (1990). Homologous desensitization of the effects of endothelin on rabbit aorta rings and on cultured rat aorta smooth muscle cells. *Eur.J.Pharmacol.* **179**, 151-158.
- Nakamura, S., Naruse, M., Naruse, K., Demura, H., & Uemura, H. (1990). Immunocytochemical localization of endothelin in cultured bovine endothelial cells. *Histochemistry* **94**, 475-477.
- Nakamuta, M., Takayanagi, R., Sakai, Y., Sakamoto, S., Hagiwara, H., Mizuno, T., Saito, Y., Hirose, S., Yamamoto, M., & Nawata, H. (1991). Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding human non-selective type of endothelin receptor. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **177**, 34-39.
- Nelson, M. T., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L. F., Bonev, A. D., Knot, H. J., & Lederer, W. J. (1995). Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* **270**, 633-637.
- Nishimura, J., Moreland, S., Ahn, H. Y., Kawase, T., Moreland, R. S., & van Breemen, C. (1992). Endothelin increases myofilament Ca^{2+} sensitivity in alpha-toxin- permeabilized rabbit mesenteric artery. *Circ.Res.* **71**, 951-959.

- Oles, M., Ewert, M., Meyer, T., & Pott, L. (1997). Rapid down regulation of Ca²⁺ signals induced by endothelin-1 in a human bronchial epithelial cell line. *Cell Calcium* **21**, 221-231.
- Ozaki, H., Sato, K., Sakata, K., & Karaki, H. (1989). Endothelin dissociates muscle tension from cytosolic Ca²⁺ in vascular smooth muscle of rat carotid artery. *Jpn.J.Pharmacol.* **50**, 521-524.
- Ozaki, S., Ihara, M., Saeki, T., Fukami, T., Ishikawa, K., & Yano, M. (1994). Endothelin ET_B receptors couple to two distinct signaling pathways in porcine kidney epithelial LLC-PK1 cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **270**, 1035-1040.
- Pang, C. Y., Zhang, J., Xu, H., Lipa, J. E., Forrest, C. R., & Neligan, P. C. (1998). Role and mechanism of endothelin-B receptors in mediating ET-1-induced vasoconstriction in pig skin. *American Journal of Physiology* **275**, t-74.
- Perez, G. J., Bonev, A. D., Patlak, J. B., & Nelson, M. T. (1999). Functional coupling of ryanodine receptors to KCa channels in smooth muscle cells from rat cerebral arteries. *J.Gen.Physiol* **113**, 229-238.
- Peter, M. G. & Davenport, A. P. (1996). Characterization of the endothelin receptor selective agonist, BQ3020 and antagonists BQ123, FR139317, BQ788, 50235, Ro462005 and bosentan in the heart. *British Journal of Pharmacology* **117**, 455-462.

- Putney, J. W., Jr. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* **7**, 1-12.
- Quirk, W. S., Laurikainen, E. A., Avinash, G., Nuttall, A. L., & Miller, J. M. (1992). The role of endothelin on the regulation of cochlear blood flow. *Assoc.Res.Otolaryngol.* 15 [37]. (Abstract)
- Resink, T. J., Scott-Burden, T., & Buhler, F. R. (1989). Activation of phospholipase A2 by endothelin in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **158**, 279-286.
- Reynolds, E. E., Mok, L. L., & Kurokawa, S. (1989). Phorbol ester dissociates endothelin-stimulated phosphoinositide hydrolysis and arachidonic acid release in vascular smooth muscle cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **160**, 868-873.
- Rubanyi, G. M. & Polokoff, M. A. (1994). Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol.Rev.* **46**, 325-415.
- Russell, F. D. & Davenport, A. P. (1996). Characterization of the binding of endothelin ET_B selective ligands in human and rat heart. *British Journal of Pharmacology* **119**, 631-636.
- Sadanaga, M., Liu, J., & Wangemann, P. (1997). Endothelin-A receptors mediate vasoconstriction of capillaries in the spiral ligament. *Hear.Res.* **112**, 106-114.

- Sagara, Y. & Inesi, G. (1991). Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentrations
10. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 13503-13506.
- Sakata, K., Ozaki, H., Kwon, S. C., & Karaki, H. (1989). Effects of endothelin on the mechanical activity and cytosolic calcium level of various types of smooth muscle. *British Journal of Pharmacology* **98**, 483-492.
- Sakurai, T., Yanagisawa, M., Takawa, Y., Miyazaki, H., Kimura, S., Goto, K., & Masaki, T. (1990). Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor [see comments]. *Nature* **348**, 732-735.
- Sato, M., Tani, E., Fujikawa, H., & Kaibuchi, K. (2000). Involvement of Rho-kinase-mediated phosphorylation of myosin light chain in enhancement of cerebral vasospasm. *Circ.Res.* **87**, 195-200.
- Satoh, S., Utsunomiya, T., Tsurui, K., Kobayashi, T., Ikegaki, I., Sasaki, Y., & Asano, T. (2001). Pharmacological profile of hydroxy fasudil as a selective rho kinase inhibitor on ischemic brain damage. *Life Sciences* **69**, 1441-1453.
- Sauzeau, V., Le Jeune, H., Cario-Toumaniantz, C., Smolenski, A., Lohmann, S. M., Bertoglio, J., Chardin, P., Pacaud, P., & Loirand, G. (2000). Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA- induced Ca^{2+} sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 21722-21729.

- Scherer, E. Q. & Wangemann, P. ETA receptor signaling in the spiral modiolar artery (SMA). (2001a) FASEB Journal 15, A112. (Abstract)
- Scherer, E. Q. & Wangemann, P. Signal transduction pathway of ETA receptors in the gerbil spiral modiolar artery. (2001b). Assoc.Res.Otolaryngol. [24], 28. (Abstract)
- Scherer, E. Q., Wonneberger, K., & Wangemann, P. Endothelin-A receptors mediate vasoconstriction of the gerbil spiral modiolar artery. (2000) Assoc.Res.Otolaryngol. 23, 690. (Abstract)
- Scherer, E. Q., Wonneberger, K., & Wangemann, P. (2001). Differential desensitization of Ca²⁺ mobilization and vasoconstriction by ET_A receptors in the gerbil spiral modiolar artery. *J.Membr.Biol.* **182**, 183-191.
- Schild, H. O. (1957). Drug antagonism and pAx. *Pharmacol.Rev.* **9**, 242-246.
- Seo, B., Oemar, B. S., Siebenmann, R., von Segesser, L., & Luscher, T. F. (1994). Both ET_A and ET_B receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels. *Circulation* **89** , 1203-1208.
- Shimizu, H., Ito, M., Miyahara, M., Ichikawa, K., Okubo, S., Konishi, T., Naka, M., Tanaka, T., Hirano, K., & Hartshorne, D. J. (1994). Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 30407-30411.

- Shirazi, A., Iizuka, K., Fadden, P., Mosse, C., Somlyo, A. P., Somlyo, A. V., & Haystead, T. A. (1994). Purification and characterization of the mammalian myosin light chain phosphatase holoenzyme. The differential effects of the holoenzyme and its subunits on smooth muscle. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 31598-31606.
- Simonson, M. S. & Dunn, M. J. (1990). Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *FASEB Journal* **4**, 2989-3000.
- Smith, R. J., Sam, L. M., Justen, J. M., Bundy, G. L., Bala, G. A., & Bleasdale, J. E. (1990). Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **253**, 688-697.
- Somlyo, A. P., Kitazawa, T., Himpens, B., Matthijs, G., Horiuti, K., Kobayashi, S., Goldman, Y. E., & Somlyo, A. V. (1989). Modulation of Ca²⁺-sensitivity and of the time course of contraction in smooth muscle; a major role of protein phosphatases? *Adv.Protein Phosphatases* **5**, 181-195.
- Somlyo, A. P. & Somlyo, A. V. (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* **372**, 231-236.
- Somlyo, A. P. & Somlyo, A. V. (2000). Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J.Physiol (Lond)* **522 Pt 2**, 177-185.

- Somlyo, A. P., Wu, X., Walker, L. A., & Somlyo, A. V. (1999). Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* **134**, 201-234.
- Somlyo, A. V., Bond, M., Somlyo, A. P., & Scarpa, A. (1985). Inositol trisphosphate-induced calcium release and contraction in vascular smooth muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* **82**, 5231-5235.
- Stull, J. T., Lin, P. J., Krueger, J. K., Trehwella, J., & Zhi, G. (1998). Myosin light chain kinase: functional domains and structural motifs. *Acta Physiol Scand.* **164**, 471-482.
- Sudjarwo, S. A., Hori, M., Tanaka, T., Matsuda, Y., & Karaki, H. (1995). Coupling of the endothelin ETA and ETB receptors to Ca²⁺ mobilization and Ca²⁺ sensitization in vascular smooth muscle. *Eur.J.Pharmacol.* **289**, 197-204.
- Tasaki, I. & Spyropoulos, C. (1959). Stria vascularis as source fo endocochlear potential. *J.Neurophysiol.* **22**, 149-155.
- Tayag, E. C., Jeng, A. Y., Savage, P., & Lehmann, J. C. (1996). Rat striatum contains pure population of ETB receptors. *Eur.J.Pharmacol.* **300**, 261-265.
- Thalman, I., Marcus, N. Y., & Thalman, R. (1979). Adenine nucleotides of the stria vascularis. *Arch.Otorhinolaryngol.* **224**, 89-95.
- Thalman, R., Miyoshi, T., & Thalman, I. (1972). The influence of ischemia upon the energy reserves of inner ear tissues. *Laryngoscope* **82**, 2249-2272.

- Toshima, Y., Satoh, S., Ikegaki, I., & Asano, T. (2000). A new model of cerebral microthrombosis in rats and the neuroprotective effect of a Rho-kinase inhibitor. *Stroke* **31**, 2245-2250.
- Tsukahara, H., Ende, H., Magazine, H. I., Bahou, W. F., & Goligorsky, M. S. (1994). Molecular and functional characterization of the non-isopeptide-selective ET_B receptor in endothelial cells. Receptor coupling to nitric oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 21778-21785.
- Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M., & Narumiya, S. (1997). Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* **389**, 990-994.
- Unoki, H., Fan, J., & Watanabe, T. (1999). Low-density lipoproteins modulate endothelial cells to secrete endothelin-1 in a polarized pattern: a study using a culture model system simulating arterial intima. *Cell Tissue Res.* **295**, 89-99.
- Vigne, P., Breittmayer, J. P., Marsault, R., & Frelin, C. (1990a). Endothelin mobilizes Ca²⁺ from a caffeine- and ryanodine-insensitive intracellular pool in rat atrial cells. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 6782-6787.
- Vigne, P., Marsault, R., Breittmayer, J. P., & Frelin, C. (1990b). Endothelin stimulates phosphatidylinositol hydrolysis and DNA synthesis in brain capillary endothelial cells. *Biochem.J.* **266**, 415-420.

- Wangemann, P., Berge, S., Scherer, E. Q., & Herzog, M. (2001) Ca^{2+} -sparks mediate vasodilation of the spiral modiolar artery via iberiotoxin-sensitive K^+ channels. *Assoc.Res.Otolaryngol.* 24, 102. (Abstract)
- Wangemann, P., Cohn, E. S., Gruber, D. D., & Gratton, M. A. (1998). Ca^{2+} -dependence and nifedipine-sensitivity of vascular tone and contractility in the isolated superfused spiral modiolar artery in vitro. *Hear.Res.* **118**, 90-100.
- Wangemann, P. & Gruber, D. D. (1998). The isolated in vitro perfused spiral modiolar artery: pressure dependence of vasoconstriction. *Hear.Res.* **115**, 113-118.
- Wangemann, P., Liu, J., & Marcus, D. C. (1995). Ion transport mechanisms responsible for K^+ secretion and the transepithelial voltage across marginal cells of stria vascularis in vitro. *Hear.Res.* **84**, 19-29.
- Watanabe, H., Miyazaki, H., Kondoh, M., Masuda, Y., Kimura, S., Yanagisawa, M., Masaki, T., & Murakami, K. (1989). Two distinct types of endothelin receptors are present on chick cardiac membranes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **161**, 1252-1259.
- Wictome, M., Henderson, I., Lee, A. G., & East, J. M. (1992). Mechanism of inhibition of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum by thapsigargin 2. *Biochem.J.* **283 (Pt 2)**, 525-529.

Williams, D. L., Jr., Jones, K. L., Pettibone, D. J., Lis, E. V., & Clineschmidt, B. V. (1991). Sarafotoxin S6c: an agonist which distinguishes between endothelin receptor subtypes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **175**, 556-561.

Wonneberger, K., Scofield, M. A., & Wangemann, P. (2000). Evidence for a Calcium-Sensing Receptor in the Vascular Smooth Muscle Cells of the Spiral Modiolar Artery. *J.Membr.Biol.* **175**, 203-212.

Wu-Wong, J. R., Chiou, W., Magnuson, S. R., Bianchi, B. R., & Lin, C. W. (1996a). Human astrocytoma U138MG cells express predominantly type-A endothelin receptor. *Biochim.Biophys.Acta* **1311**, 155-163.

Wu-Wong, J. R., Dayton, B. D., & Opgenorth, T. J. (1996b). Endothelin-1-evoked arachidonic acid release: a Ca^{2+} -dependent pathway. *Am.J.Physiol* **271**, C869-C877.

Xie, H. & Bevan, J. A. (1999). Oxidized low-density lipoprotein enhances myogenic tone in the rabbit posterior cerebral artery through the release of endothelin-1
1. *Stroke* **30**, 2423-2429.

Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., & Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**, 411-415.

Yang, C. M., Yo, Y. L., Ong, R., Hsieh, J. T., & Tsao, H. L. (1994). Calcium mobilization induced by endothelins and sarafotoxin in cultured canine

tracheal smooth muscle cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.*
350, 68-76.

Yoshii, A., Iizuka, K., Dobashi, K., Horie, T., Harada, T., Nakazawa, T., & Mori, M.
(1999). Relaxation of contracted rabbit tracheal and human bronchial
smooth muscle by Y-27632 through inhibition of Ca²⁺ sensitization.
Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. **20**, 1190-1200.

Yoshimoto, S., Ishizaki, Y., Sasaki, T., & Murota, S. (1991). Effect of carbon
dioxide and oxygen on endothelin production by cultured porcine cerebral
endothelial cells. *Stroke* **22**, 378-383.

Yule, D. I. & Williams, J. A. (1992). U73122 inhibits Ca²⁺ oscillations in response
to cholecystinin and carbachol but not to JMV-180 in rat pancreatic acinar
cells. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 13830-13835.

VII. Abkürzungen

2-APB	2-Aminoethoxydiphenyl Borat, IP ₃ -R Antagonist
AA	Arachidonsäure
BQ-123	ET _A -Antagonist
BQ-788	ET _B -Antagonist
[Ca ²⁺]	Ca ²⁺ -Konzentration
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Ca ²⁺ -Konzentration
CaM	Calmodulin
CPI-17	Phosphoprotein, welches selektiv in glatten Muskelzellen exprimiert wird und MLCP inhibiert.
DAG	Diacylglycerol
EC ₅₀	Agonistenkonzentration, welche den halbmaximalen Effekt auslöst
EGTA	Ethylene glycol-bis(beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid. Selektiver Ca ²⁺ Chelator
E _{max}	maximal erreichter Effekt
ET-1, ET-2 und ET-3	Endothelin-1, -2 und -3
ET _A	Endothelin-A Rezeptor
ET _B	Endothelin-B Rezeptor
<i>h</i>	Hill-Koeffizient; beschreibt die Steigung der Dosis-Wirkungskurve
HEPES	4(2Hydroxyethyl)piperazine-1ethanesulfonic acid
IP ₃	Inositoltriphosphat
IP ₃ R	IP ₃ -Rezeptor
kDa	KiloDalton: 1Da = Molekulargewicht eines H ⁺
K _{DB}	Affinitätskonstante

MLC ₂₀	Regulatorische Leichtketten des Myosins
MLCK	Myosin Leichtkettenkinase
MLCP	Myosin Leichtkettenphosphatase
MBS	<u>M</u> yo <u>s</u> in <u>B</u> inding <u>S</u> ubunit von MLCP
mRNA	Messenger RNA
RNA	Ribonukleinsäure
NO	nitric oxide (Stickstoffmonoxid)
pEC_{50}	negativer dekadischer Logarithmus des EC_{50}
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PKC	Proteinkinase C
pK_{DB}	negativer dekadischer Logarithmus der K_{DB}
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
RyaR	Ryanodine Rezeptor
sem	Standardabweichung vom Mittelwert
SERCA	Sarkoplasmatische Ca ²⁺ -ATPase
U73122	PLC-Antagonist
U73343	inaktives Isomer von U73122. Dient als Kontrollsubstanz für U73122
Y-27632	Rho-Kinase Antagonist (+)-(R)-trans-4(1-aminoethyl)-N-(4-pyridyl)
RhoA	Monomeres G-Protein, aktiviert wenn an GTP und inaktiv wenn an GDP gebunden.
Rho-Kinase	Eine Serin/Threonin-Kinase. Wird, u.a. durch RhoA-GTP aktiviert.

VIII. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Philine Wangemann. Sie hat mir das Thema überlassen und mich in das wissenschaftliche Arbeiten eingeführt. Ihre hervorragende Betreuung der Arbeit war gezeichnet durch uneingeschränkte Unterstützung. Mit Rat und Tat stand sie mir jederzeit zur Seite. Ihr Perfektionismus hat mich und diese Arbeit geprägt und wird mich mein Leben lang begleiten. Weiterhin danke ich ihr für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die großzügige Finanzierung meiner Stelle sowie dieses Forschungsprojektes. Diese Arbeit wurde vollständig von Frau Prof. Dr. Philine Wangemann's Grant RO1-DC04280 (Institute on Deafness and Other Communication Disorders; National Institutes of Health) finanziert.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Arnold möchte ich dafür danken, dass er mich in dieses Labor vermittelt und mich für den Zeitraum dieser Studie beurlaubt hat. Ohne seinen Rückhalt wäre es mir nicht möglich gewesen, dieses Projekt anzutreten.

Herrn Dr. Steffen-Sebastian Bolz möchte ich ganz außerordentlich für seine freundschaftliche Verbundenheit und Unterstützung danken. Er hat diese Arbeit, dank seiner langjährigen Erfahrung mit dem Rho-Kinase Transduktionsweg in Mikrogefäßen, durch kritische Anmerkungen und gezielte Ratschläge ganz entscheidend beeinflusst. Außerdem haben seine Revisionen des Manuskriptes die Verständlichkeit der Arbeit wesentlich verbessert.

Mein Dank gilt weiterhin den Mitarbeitern des Physiologischen Instituts der Kansas State University und insbesondere ihrem Ordinarius, Herrn Prof. Dr. Frank Blecha, die mich warmherzig aufgenommen und in den letzten zwei Jahren begleitet haben. Ihnen verdanke ich viele anregende und konstruktive Diskussionen zu dieser Arbeit.

Meine Kollegen Dr. Kai Wonneberger und Dr. Michael Herzog haben mir bei zahlreichen Präparationen und Versuchen geholfen; ihnen gilt mein aufrichtiger Dank. Dr. Martin Güthlin, Dr. Michael Herzog, Dr. Claudius Fauser und Beatrice Albrecht danke ich ebenfalls für die Revision des Manuskriptes.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die mich stets bestärkt haben und ohne deren Unterstützung eine solche Arbeit nicht möglich gewesen wäre.