
1. Einleitung

In der Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes von 1999 sind Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems mit 429.407 Fällen die mit Abstand häufigste Todesursache in Deutschland. Das sind 48,5% aller Todesfälle. Ischämische Herzkrankheiten, im wesentlichen der Herzinfarkt und das akute koronare Syndrom, stellen das Gros der Herz-Kreislaufkrankheiten dar, wobei der akute Myokardinfarkt auch die häufigste Einzeltodesursache darstellt.

Das Kreislaufsystem erlaubt im menschlichen Körper einen schnellen Substanztransport und ermöglicht bei erhöhtem Bedarf an Sauerstoff bei z.B. körperlicher Belastung, eine gezielte Verteilung sowie eine rasche Adaption. Die Funktion des arteriellen Schenkels des Kreislaufsystems besteht darüber hinaus vor allem in der Regulation des Blutdrucks und in der Blutflussgeschwindigkeit. Eine besondere Aufgabe in der Blutdruckregulation kommt dabei den glatten Gefäßmuskelzellen in der Gefäßwand zu. Glatte Gefäßmuskelzellen befinden sich in gesunden Gefäßen im Bereich der Media. Bei der Entstehung von chronischen Herz-Kreislauferkrankungen, wie z.B. der Atherosklerose, wandern glatte Gefäßmuskelzellen aus der Media der Gefäßwand in die Intima. Typisch für diese Erkrankungen ist dabei eine phänotypische Modulation der glatten Gefäßmuskelzellen von einem kontraktilem hin zu einem proliferativem Funktionszustand (1). Bei diesem Vorgang kommt es zu vielfältigen strukturellen Änderungen. So wird z.B. die Sekretion extrazellulärer Matrixproteine wie Kollagen und Fibronectin gesteigert. Gekennzeichnet ist die phänotypische Modulation der glatten Gefäßmuskelzellen weiterhin durch eine reduzierte Expression kontraktiler Proteine, wie smooth muscle-myosin heavy chain (SM-MHC), smooth muscle- α -actin (SM- α -actin) oder Calponin, die charakteristisch für differenzierte glatte Gefäßmuskelzellen sind. So kommt es bei der Entwicklung von Atherosklerose zu einer

Dedifferenzierung von glatten Gefäßmuskelzellen. Glatte Gefäßmuskelzellen haben dabei eine verminderte Fähigkeit zur Kontraktion und wandeln sich in einen Zustand um, der durch Proliferation und Matrixproduktion charakterisiert ist. Diese dedifferenzierten glatten Gefäßmuskelzellen können jedoch schrittweise wieder in ihren differenzierten Zustand zurück modulieren, so dass sie ihre wichtigste Funktion, die der Kontraktion wieder regelgerecht ausführen können (2).

Differenzierte glatte Gefäßmuskelzellen sind charakterisiert durch eine hohe Expression von kontraktilen Proteinen (3). Die Expression der SM-MHC-Isoformen SM-1 und SM-2 ist für glatte Gefäßmuskelzellen spezifisch und kann somit als ein Marker für den Differenzierungsgrad von glatten Gefäßmuskelzellen genutzt werden, da in dedifferenzierten glatten Gefäßmuskelzellen die Expression von SM-MHC herunterreguliert ist (4,5,6).

Einer der Signaltransduktionswege, über den extrazelluläre Signale in den Zellkern übertragen werden, ist die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade (68). Klassischerweise wird die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade nach Ligandenbindung an Tyrosinkinase-Rezeptoren aktiviert, aber auch nach Aktivierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren kann es zur Transaktivierung von Tyrosinkinase-Rezeptoren, mit anschließender Aktivierung der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade kommen. Tyrosinkinase-Rezeptoren vermitteln häufig proliferative Signale in die Zelle. Über die Aktivierung der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade durch einen G-Protein gekoppelten Rezeptor ist bisher wenig bekannt. Durch einen G-Protein gekoppelten Rezeptor kann eine Kalzium und Proteinkinase C-abhängige Formation des Ras/Raf-1 Komplexes zu einer ERK-Phosphorylierung führen (8,9). Alternativ dazu kann Ras auch ein Ziel einer Kalzium und Calmodulin abhängigen Aktivierung von Pyk2 und anschließender Src Aktivierung sein (10). Dies kann sowohl unter Einschluss einer Rezeptor Tyrosinkinase als auch unter Umgehung dieser Kinase geschehen (11,12,13,14,15). Transduktion des Signals zur

Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade kann über einen Proteinkomplex, bestehend u.a. aus β -Arrestin und c-Src, erfolgen. Dieser Komplex kann dann zu einer ligandenunabhängigen Aktivierung eines Tyrosinkinase-Rezeptors führen und so Ras aktivieren (16,17). Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass eine direkte Assoziation zwischen $G\beta\gamma$ und Raf existiert (18). Aktiviertes Ras führt zu einer Rekrutierung der MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK) Raf, einer Serin-Threonin Proteinkinase, an die Plasmamembran, wo es durch ein weiteres Tyrosinkinasesignal zu einer vollständigen Aktivierung von Raf kommt (19,20). Somit sind letztendlich zwei Signale für die Aktivierung von Raf notwendig. Die aktivierte MAPKKK Raf führt dann zu einer Phosphorylierung zweier Serin-/Threoninreste der MAPKK (MAP-Kinase-Kinase) MEK (21,22). Die aktivierte MAPKK MEK führt wiederum zu einer Phosphorylierung der MAPK ERK1 und ERK2. ERK1/2 besitzen mehrere Effektoren auf der Ebene von Transkriptionsfaktoren (23,24). Über die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade werden Signale vermittelt, die sowohl eine Proliferation als auch eine Differenzierung auslösen können. In PC12-Zellen wurde näher untersucht, welche Faktoren eine Proliferation oder eine Differenzierung auslösen (25). So liegen die Unterschiede zum einen in der Quantität des extrazellulären Reizes und zum anderen in der Dauer der ERK-Aktivierung (26). So kommt es bei differenzierenden Vorgängen, z.B. Stimulation mit NGF, zu einer anhaltenden Aktivierung von ERK1/2 und zu einer Translokation von ERK1/2 in den Zellkern, während es bei proliferativen Reizen, z.B. FGF oder EGF, nur zu einer kurzzeitigen Aktivierung und zu keiner Translokation kommt (27,28,29,30). Diese Wirkungsweise ist jedoch offensichtlich Zelltyp spezifisch. So ist z.B. der beschriebene Effekt in Fibroblasten genau umgekehrt (31,32,33). Bei der Differenzierung von neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen war die genaue Beteiligung der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade bisher nicht bekannt. Eine gesteigerte Expression kontraktiler Proteine in neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen konnte z.B. durch die

Inkubation mit fötalem Kälberserum erzielt werden. Durch RNase-Protection-Assays konnten einzelne Bestandteile des fötalen Kälberserums untersucht werden, um festzustellen, welche Substanzen eine Differenzierung von glatten Gefäßmuskelzellen bewirken könnten. So führte z.B. Thrombin zu einer gesteigerten Transkription der SM-MHC Isoformen SM-1/SM-2 (7).

Thrombin ist eine Serinprotease, die bei der Aktivierung von vielfältigen Zellfunktionen beteiligt ist (34,35,36). Bekannteste Funktionen sind unter anderem folgende Wirkungen: Gerinnung, Thrombozytenaggregation, Vasodilatation an normalen Gefäßen und Vasokonstriktion an ischämisch bzw. arteriosklerotisch veränderten Gebieten (68,69,70,71,72,73). Zusätzlich ist auch eine mitogene Wirkung von Thrombin auf verschiedene Zelltypen bekannt. So sind proliferative Effekte unter anderem auf adulte glatte Gefäßmuskelzellen, Astrozyten oder auch Keratinozyten beobachtet worden (37,38,39).

Thrombin bindet an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor. Insgesamt sind 4 Subtypen dieser Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR) bekannt: PAR-1, PAR-2, PAR-3, PAR-4 (40). Am PAR-1 können 3 Subfamilien von G-Proteinen koppeln: G_q , G_i und $G_{12/13}$ (41). Diese heterotrimeren G-Proteine bestehen aus einer α -Untereinheit, die GTP bindet und hydrolysiert, sowie je einer β - und γ -Untereinheit (42,43,44). Die α -Untereinheit weist strukturelle und funktionelle Homologien zu anderen Mitgliedern der Superfamilie Guaninnukleotid-bindender Proteine auf. Die β - und γ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine werden als funktionelle Einheit angesehen, da sie einen unter *in vivo* Bedingungen undissoziierbaren Komplex bilden. Das heterotrimere G-Protein durchläuft bei der Signalübertragung vom aktivierten Rezeptor zum Effektor einen Aktivierungs-Inaktivierungs-Zyklus und kann somit als regulierbarer molekularer Schalter fungieren. Im inaktiven Zustand ist der $\beta\gamma$ -Komplex mit der GDP-gebundenen α -Untereinheit assoziiert. In dieser Form kann das G-Protein von einem geeigneten

aktivierten Rezeptor, in diesem Falle dem Thrombinrezeptor, erkannt werden, an den das Heterotrimer dann bindet und die GDP-Dissoziation von der α -Untereinheit bewirkt. Dabei wird GDP durch GTP ersetzt. Die Bindung von GTP induziert eine Konformationsänderung der α -Untereinheit, die dazu führt, dass die α -Untereinheit einerseits vom Rezeptor als auch vom $\beta\gamma$ -Komplex dissoziiert. Die GTP-gebundene α -Untereinheit sowie der $\beta\gamma$ -Komplex sind nun in der Lage, mit Effektorproteinen zu interagieren. Eine der α -Untereinheit inhärente intrinsische GTPase-Aktivität führt zu einer Terminierung der G-Protein-Aktivierung. Das aus der Hydrolyse aus GTP entstehende GDP bleibt an der α -Untereinheit gebunden, die nun mit dem $\beta\gamma$ -Komplex reassoziert. Die durch G-Proteine regulierten Effektoren können sowohl von der α -Untereinheit als auch durch den $\beta\gamma$ -Komplex reguliert werden. Zwei wesentliche Effektorsysteme sind dabei die Signalkaskaden, die über Adenylyl-Zyklasen, sowie über die Phospholipase C- β aktiviert werden. Phospholipase C- β katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat und generiert damit die second-messenger Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP-3) und Diacylglycerol (DAG) (45). IP-3 führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration, während DAG über die Proteinkinase C ihre Wirkung entfaltet. Es ist bekannt, dass an der Regulation der Phospholipase C- β mindestens zwei verschiedene G-Protein vermittelte Mechanismen beteiligt sind, die sich durch die Sensitivität gegenüber der inhibitorischen Wirkung von Pertussistoxin (PTX) unterscheiden. Die durch PTX katalysierte ADP-Ribosylierung von G-Proteinen des G_i -Typs interferiert mit der Rezeptor-G-Protein-Interaktion, wodurch eine rezeptorvermittelte Aktivierung des G-Proteins nicht mehr möglich ist (46,47). Alle bekannten Isoformen der Phospholipase C- β können zusätzlich durch Mitglieder der Pertussistoxin-insensitiven $G\alpha_q$ -Familie der G-Proteine stimuliert

werden (18). Dagegen erfolgt die Pertussistoxin-sensitive Regulation der Phospholipase C- β_2 über die $\beta\gamma$ -Untereinheit der G_i-Familie (48,49,50,51).

Die folgenden Experimente sollen nun dazu dienen, die Signalkaskade näher zu untersuchen, über die Thrombin eine differenzierende Wirkung auf neonatale glatte Gefäßmuskelzellen ausübt. Als Fragestellung ergab sich zunächst, welches G-Protein durch Thrombinbindung am Protease-aktivierten Rezeptoren aktiviert wird. Desweiteren sollte die Beteiligung von Kalzium untersucht werden. Weiterhin ist die mögliche Beteiligung der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade an der Signalkaskade der Thrombin-induzierten Differenzierung von neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen Gegenstand dieser Arbeit.