

3. Ergebnisse

Die Anwesenheit von Serum ist essentiell für das Wachstum von glatten Gefäßmuskelzellen in Zellkultur. Neben den mitogenen Eigenschaften von fötalem Kälberserum ist in früheren Studien eine verstärkte Induktion der Expression kontraktiler Proteine, wie z.B. smooth muscle-myosin heavy chain (SM-MHC) in neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen beobachtet worden (7). Serum beinhaltet eine große Anzahl von verschiedenen Wachstumsfaktoren, vasoaktiven Stoffen und anderer Agonisten, die ihre Wirkung durch die Aktivierung verschiedenster Signalkaskaden vermitteln. Von den bisher untersuchten Substanzen induzierte Thrombin gegenüber Hungermedium eine ca. 10-fach gesteigerte RNA steady-state-Expression von SM-1 und SM-2. Die über Proteinase aktivierte Rezeptoren (PAR) vermittelte Thrombinwirkung und Teilaspekte der Aktivierung des SM-MHC-Promotors sind Gegenstand der folgenden Untersuchungen.

3.1 Einfluß von Thrombin auf die SM-MHC-Promotor CAT-Aktivität

Um die an der vermehrten mRNA- als auch Protein-Expression von SM-MHC beteiligten Signalwege zu charakterisieren, wurde zunächst die Wirkung von Thrombin auf den SM-MHC-Promotor untersucht. Die SM-MHC-Promotoraktivität wurde unter Verwendung eines Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT)-Promotor-Fusionskonstruktes studiert. Vorversuche hatten gezeigt, dass das pCAT-1352 Konstrukt die höchste Expression von CAT nach Stimulation mit Serum ergab (74). Zur Bestimmung der basalen Hintergrundaktivität wurde der pCAT-basic Vektor verwendet, der keine SM-MHC-Promotorfragmente enthält. Als Positivkontrolle wurde das pCAT-control Konstrukt verwendet. Neonatale glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte wurden mit pCAT-basic, pCAT-control oder pCAT-1352 transient transfiziert und dann für 48 h

mit einem Hungermedium QM oder Thrombin (2 U/ml) stimuliert. Die gemessene CAT-Aktivität wurde für die eingesetzte Proteinmenge korrigiert und als relativ zur Basalaktivität (pCAT-basic mit QM inkubiert) dargestellt (Abbildung 1).

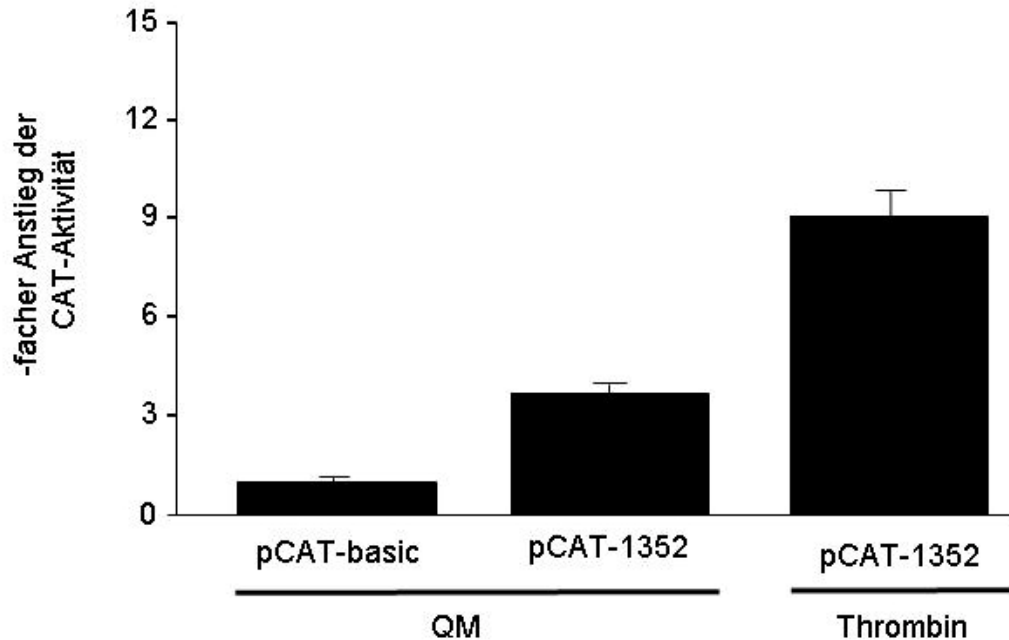


Abbildung 1: Einfluß von Thrombin auf die SM-MHC-Promotor (pCAT-1352) CAT-Aktivität

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden in 6-Lochplatten subkultiviert und mit pCAT-basic oder pCAT-1352 transient transfiziert. Nach 48 Stunden Inkubationszeit mit QM oder Thrombin (2 U/ml) wurden die Zellen lysiert und die CAT-Aktivität gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert +/- der Standardabweichung von 4 Experimenten mit jeweils 3-fach Bestimmung.

Die 56-fach höhere CAT-Aktivität von pCAT-control ist nicht dargestellt. Die gemessene 10-fach stärkere CAT-Aktivität von pCAT-1352 (mit Thrombin inkubiert) gegenüber der Basalaktivität, sowie der ca. doppelt so hohen CAT-Aktivität gegenüber pCAT-1352 (mit QM inkubiert) zeigt, dass Thrombin zu einer verstärkten SM-MHC-Promotoraktivierung in neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen führt.

3.2 Induktion des SM-MHC-Promotors nach Ko-Transfektion mit konstitutiv aktiven Ga-Untereinheiten

Thrombin bindet an einen Proteinase aktivierten Rezeptor (PAR) in der Zellmembran. An diesen Rezeptor können 3 verschiedene Subfamilien von G-Proteinen koppeln : G_q , G_i und $G_{12/13}$. Um herauszufinden über welches dieser G-Proteine die differenzierende Thrombinwirkung vermittelt wird, wurden konstitutiv aktive $G\alpha_q$, $G\alpha_{12}$ oder $G\alpha_{13}$ -Untereinheiten in steigender Konzentration mit pCAT-1352 in neonatale glatte Gefäßmuskelzellen transient kotransfiziert. Verwendet wurden: $G\alpha_q$ (pCIS- $G\alpha_q$ R183C), $G\alpha_{12}$ (pCIS- $G\alpha_{12}$ Q229L) und $G\alpha_{13}$ (pCIS- $G\alpha_{13}$ Q226L). Um die Gesamtmenge der transient transfizierten DNA konstant zu halten (1 μ g/Transfektion), wurde den Versuchsansätzen pCAT-basic hinzugefügt (Abbildung 2).

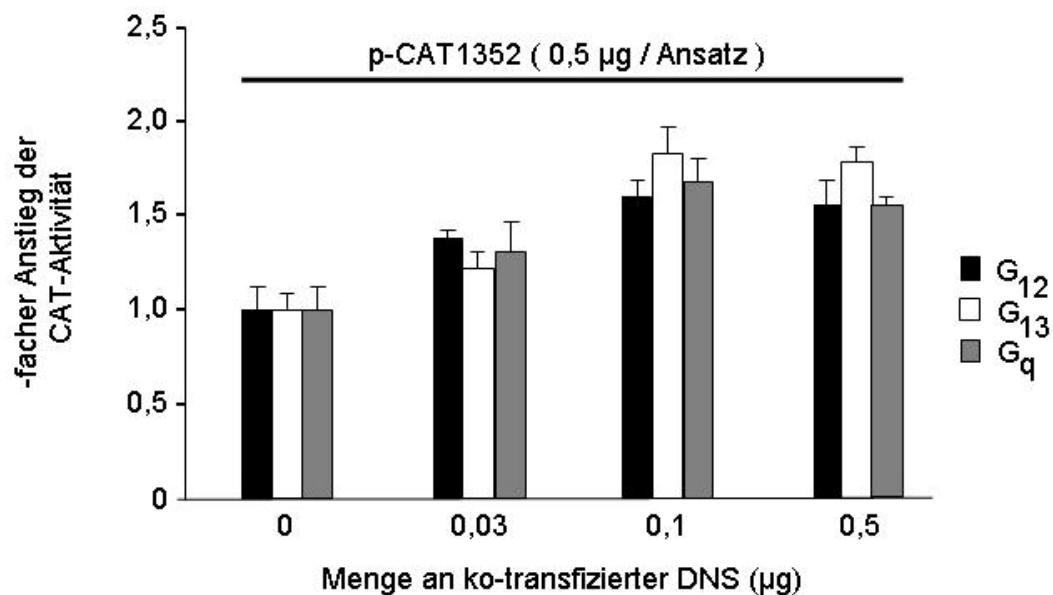


Abbildung 2: Induktion des SM-MHC-Promotors nach Ko-Transfektion mit konstitutiv aktiven Ga-Untereinheiten

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden mit steigenden Mengen (0,03 μ g bis 0,5 μ g) der folgenden Plasmide transfiziert: pCIS- $G\alpha_{12}$ Q229L, pCIS- $G\alpha_{13}$ Q226L und pCIS- $G\alpha_q$ R183C. Ko-transfiziert wurden die Zellen mit dem Plasmid für den SM-MHC-Promotor pCAT-1352 (0,5 μ g) sowie pCAT-basic (Gesamt-DNA-Menge entsprechend auf 1 μ g aufgefüllt). Nach 48 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert und anschließend die CAT-Aktivität bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm der Standardabweichung von 4 Experimenten mit jeweils 3-fach Bestimmung.

Bei diesen Versuchen konnte aber nur eine bis zu 2-fach höhere CAT-Aktivität bei allen verwendeten Konstrukten und Konzentrationen gemessen werden. Ein 2-facher Anstieg der CAT-Aktivität erklärt nur unzureichend die Beteiligung des entsprechenden G-Proteins, da Thrombin einen ca. 10-fachen Anstieg der SM-MHC-CAT Aktivität bewirkt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der Thrombineffekt nicht über $G\alpha_q$, $G\alpha_{12}$ oder $G\alpha_{13}$ vermittelt wird, sondern dass möglicherweise G_i -Proteine an der Signaltransduktion beteiligt sein könnten.

3.3 Bedeutung des G_i -Proteins in der Signalkaskade

Um eine mögliche Rolle von G_i -Proteinen in der Thrombin-induzierten SM-MHC-CAT Aktivität zu untersuchen, wurde Pertussistoxin (PTX) verwendet, da es die α -Untereinheit des G_i -Proteins inaktiviert, indem es die ADP-Ribosylierung der α -Untereinheit des G-Proteins bewirkt. Die Zellen wurden mit 100 ng/ml Pertussistoxin (PTX) für 18 h vorbehandelt und anschließend mit Thrombin (2 U/ml) für 48 h stimuliert (Abbildung 3A). Zusätzlich wurden in einem weiteren Versuchsansatz die Zellen mit Serum anstatt mit Thrombin stimuliert. Als Negativkontrolle wurde serumfreies Medium als Stimulation verwendet. Die Thrombin-induzierte transkriptionelle Aktivität des SM-MHC-Promotors wurde durch die Vorbehandlung der neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen mit PTX komplett aufgehoben. Zusätzlich wurde ebenfalls die Serum-induzierte transkriptionelle Aktivität des SM-MHC-Promotors vollständig inhibiert. Dieses Ergebnis legt nahe, dass nicht nur die durch Thrombin, sondern sogar die von allen im Serum befindlichen Komponenten vermittelte Wirkung auf den SM-MHC-Promotor über G_i vermittelt werden.

3.4 G $\beta\gamma$ -Untereinheit des G $_i$ -Proteins aktiviert den SM-MHC-Promotor

G $_i$ -Proteine können ihre Effekte entweder über die α -Untereinheit oder signalaktive G $\beta\gamma$ -Komplexe vermitteln. Zur Klärung dieser Frage wurden in einem ersten Versuchsansatz, neonatale glatte Gefäßmuskelzellen mit der konstitutiv aktiven G α_i -Untereinheit G α_i Q205L und pCAT-1352 transient kotransfiziert. In einem zweiten Versuchsansatz wurden neonatale glatte Gefäßmuskelzellen mit G $\beta_1\gamma_2$ -Untereinheiten und pCAT-1352 transient kotransfiziert (Abbildung 3B).

In beiden Versuchsansätzen erfolgte die Transfektion mit steigenden Mengen an Plasmid für die entsprechenden Untereinheiten. Um die Gesamtmenge der DNA bei 1 μ g konstant zu halten, wurde pCAT-basic in entsprechenden Mengen hinzugefügt. Zur Bestimmung der Basalaktivität wurden neonatale glatte Gefäßmuskelzellen nur mit pCAT-basic transient transfiziert (in Abbildung nicht dargestellt). Als Ergebnis zeigte sich, dass die gemessene CAT-Aktivität nach G α_i -Kotransfektion sogar unter die CAT-Aktivität von nur mit pCAT-1352 transfizierten neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen fiel. Im Gegensatz dazu führt die Kotransfektion von G $\beta\gamma$ -Untereinheiten zu einer dosisabhängigen Erhöhung bis auf das 10-fache der basalen CAT-Aktivität. Dieses Ergebnis legt nahe, dass das Signal der Thrombin-induzierten SM-MHC-Promotor-Aktivität in neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen über die G $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins vermittelt wird.

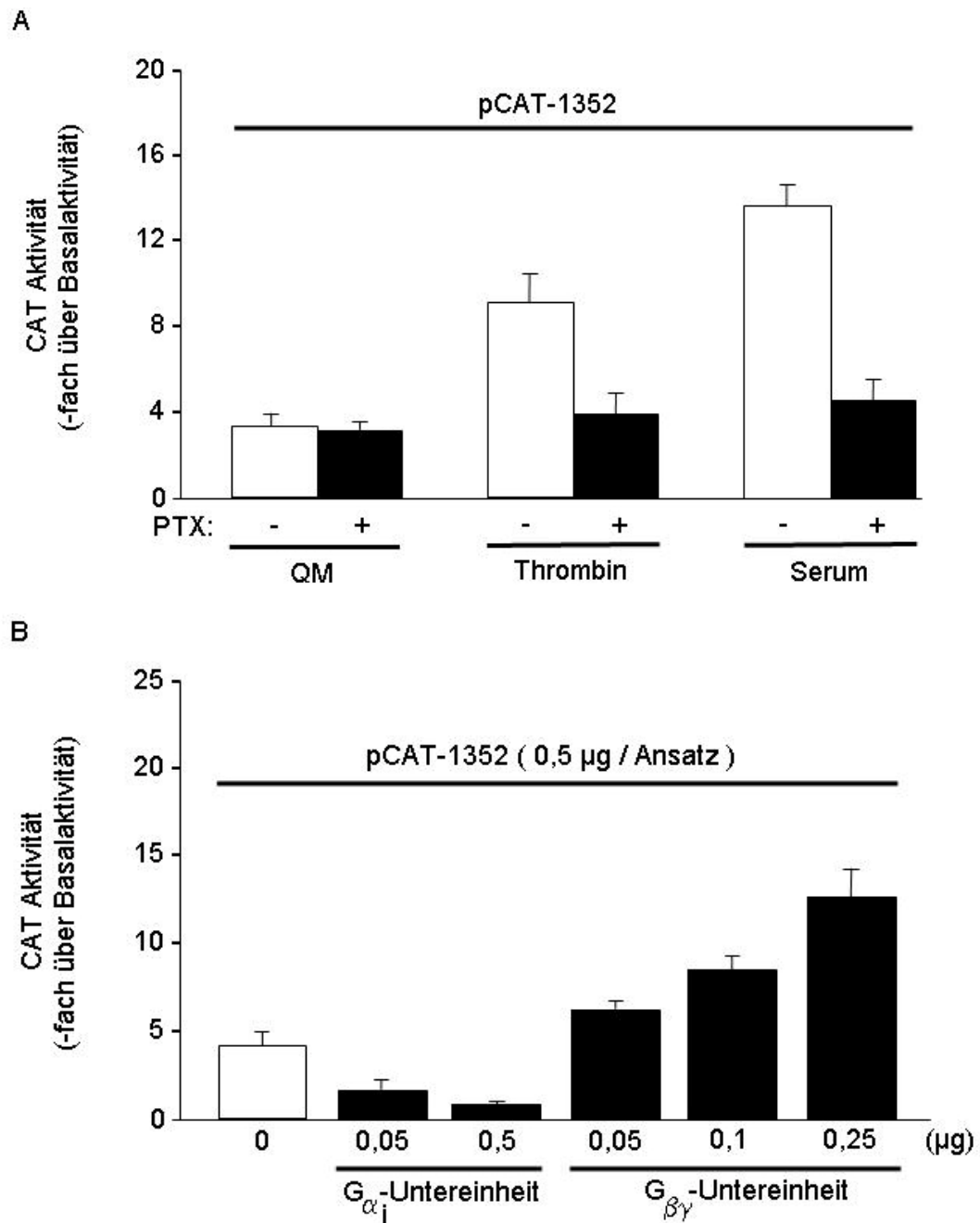


Abbildung 3: G $\beta\gamma$ -Untereinheiten aktivieren den SM-MHC-Promotor

A) Mit pCAT-1352 transfizierte glatte Gefäßmuskelzellen wurden mit PTX (100 ng/ml) für 18 Stunden vorbehandelt und dann für 48 Stunden mit serumfreiem Medium (QM), mit Thrombin (2 U/ml) oder mit 10% Serum in QM inkubiert. B) Die CAT-Aktivität wurde in unstimulierten Zellen bestimmt, die mit pCAT-1352 (0,5 µg/Loch) und den angegebenen Mengen (in µg) an Plasmiden entweder für konstitutiv aktiven G α_i oder gleichen Mengen an G β_1 und G γ_2 . Um vergleichbare DNA-Mengen zu erhalten wurde mit pCAT-basic auf 1 µg/Loch aufgefüllt. Dargestellt ist der Mittelwert +/- der Standardabweichung von 4 Experimenten mit jeweils 3-fach Bestimmung.

3.5 Thrombin induziert die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2

Die Frage, ob in der Signalkaskade der Thrombin-induzierten Differenzierung von neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen neben dem G_i-Protein auch die Kinasen ERK1/2 involviert sind, war Gegenstand der folgenden Experimente. Um eine Beteiligung der Kinasen ERK1/2 nachzuweisen, wurden neonatale glatte Gefäßmuskelzellen mit 2 U/ml Thrombin stimuliert und anschließend Immunoblots zur Darstellung der beiden Kinasen angefertigt. Dabei fanden primäre Antikörper Verwendung, die die aktivierte, phosphorylierte Kinasen detektierten. Die Kinetik der Kinasen-Phosphorylierung wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation über einen Zeitraum von 3 h beobachtet. Dargestellt ist die durch Thrombin erzielte biphasische Kinetik der ERK1/2-Phosphorylierung (Abbildung 4). Der Immunoblot zeigt nach 3-15 min eine frühe Phase der ERK1/2-Phosphorylierung. Anschließend kam es nach einer Phase verminderter ERK1/2-Aktivierung wiederum zu einer verstärkten ERK1/2-Phosphorylierung. Diese zweite Phase der ERK1/2-Aktivierung begann nach 60 min und hielt für mindestens weitere 2 h an.

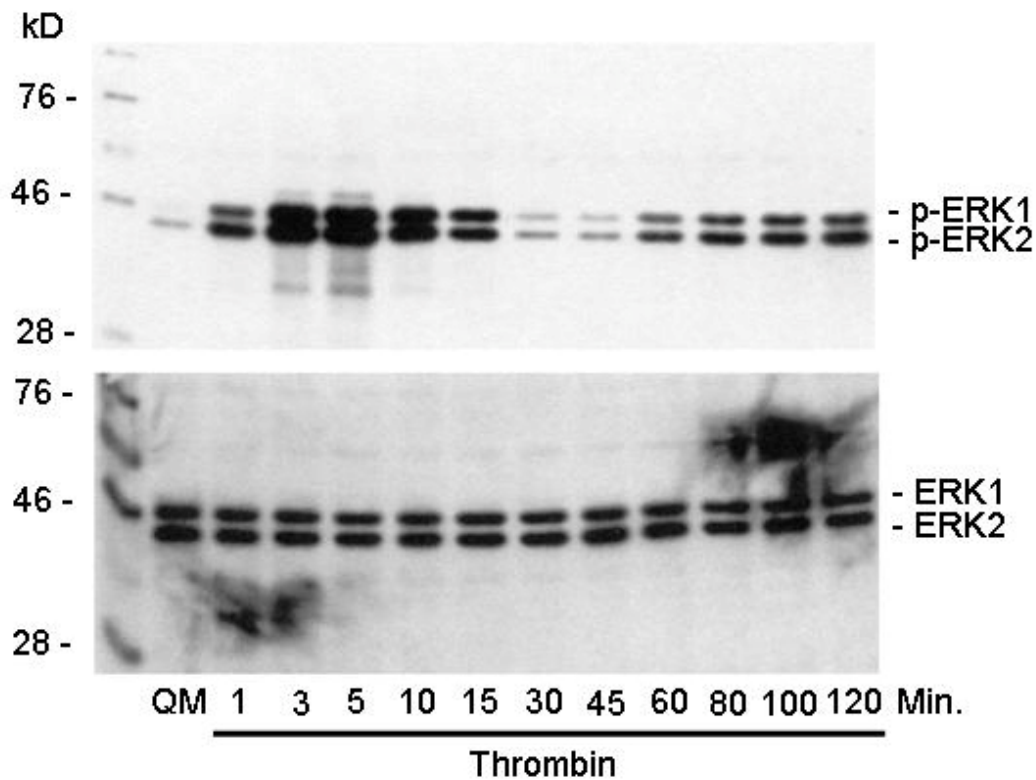


Abbildung 4: Thrombin induziert die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2

Serumentzogene glatte Gefäßmuskelzellen wurden mit Thrombin (2 U/ml) für die angegebenen Zeiten stimuliert. Die Gesamtzelllysate wurden in 10% SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und elektrogeblotted. Aktiviertes ERK1/2 wurde mit einem phosphospezifischen anti-ERK 1/2 Antiserum detektiert. Zum Nachweis der gleichen Beladung wurden Aliquots der gleichen Probe mit einem anti-ERK 1/2 Antiserum dargestellt.

3.6 MEK-Inhibitor PD98059 reduziert die Thrombin-induzierte Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2

Als nächste Fragestellung wurde untersucht, durch welche Kinase ERK1/2 aktiviert wird. Dass die Aktivierung von ERK1/2 durch die MAP-Kinase-Kinase MEK vermittelt wird, konnte durch Einsatz des MEK-Inhibitors PD98059 bewiesen werden. Neonatale glatte Gefäßmuskelzellen wurden mit steigenden Konzentrationen von PD98059 behandelt, bevor eine 5 minütige Thrombinstimulation (2 U/ml) erfolgte. Steigende Konzentrationen von PD98059 reduzieren die im Immunoblot dargestellte Phosphorylierung von ERK1/2 (Abbildung 5).

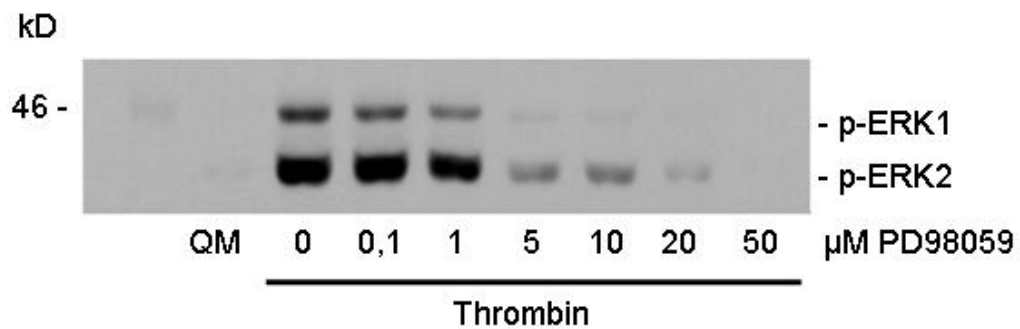


Abbildung 5: MEK-Inhibitor PD98059 blockiert die Thrombin-induzierte Phosphorylierung der MAP Kinasen ERK1/2

Gehungerte glatte Gefäßmuskelzellen wurden 30 Minuten mit den angegebenen Konzentrationen des MEK-Inhibitors PD98059 vorbehandelt, bevor sie 5 min mit Thrombin (2 U/ml) stimuliert wurden. Die Gesamtzelllysate wurden im 10 % SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und elektrogeblotted. Aktiviertes ERK1/2 wurde mit einem phosphospezifischen anti-ERK1/2 Antiserum detektiert.

Ab einer Konzentration von 20 μM PD98059 war fast keine Phosphorylierung von ERK1/2 mehr nachweisbar.

3.7 MEK-Inhibitor PD98059 reduziert die SM-MHC-Promotor CAT-Aktivität

Zur Klärung der Frage, ob die Thrombin-induzierte Aktivierung von ERK1/2 ein essentieller Schritt der Induktion des SM-MHC-Promotors ist, wurden neonatale glatte Gefäßmuskelzellen mit pCAT-1352 transient transfiziert und anschließend mit steigenden Konzentrationen des MEK-Inhibitors PD98059 behandelt, bevor eine 48 stündige Thrombinstimulation (2 U/ml) erfolgte. Die mit steigender Konzentration von PD98059 zu beobachtende Inhibition der CAT-Aktivität (Abbildung 6) betrug dabei bis zu 50 % (bei 20 μM PD98059) im Vergleich zu nicht inhibierten neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen.

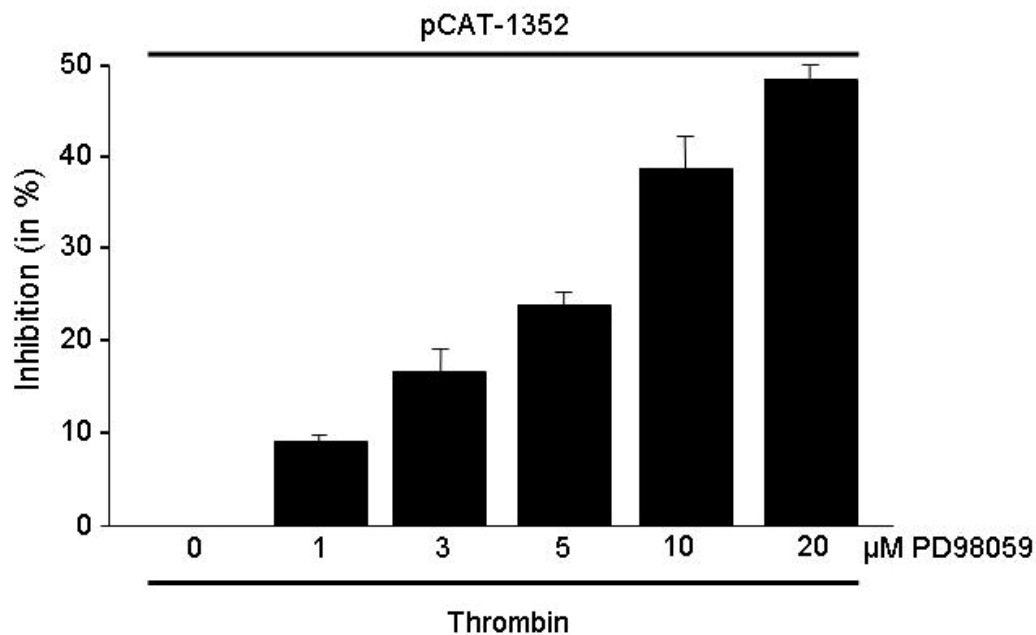


Abbildung 6: MEK-Inhibitor PD98059 reduziert die SM-MHC-Promotor CAT-Aktivität

Gehungerte glatte Gefäßmuskelzellen wurden mit pCAT-1352 transfiziert. Anschließend erfolgte eine 30 minütige Vorbehandlung mit den angegebenen Mengen des MEK-Inhibitors PD98059. Nach 48 stündiger Stimulation mit Thrombin (2 U/ml) wurden die Zellen lysiert und die CAT-Aktivität bestimmt. Graphisch dargestellt ist die erzielte Inhibition durch PD98059 auf die SM-MHC-Promotor Aktivität durch Thrombinstimulation.

Aus diesen Resultaten lässt sich schlussfolgern, dass ERK1/2 an der Signaltransduktion der differenzierenden Thrombinwirkung beteiligt sind.

3.8 PTX inhibiert die Thrombin-induzierte Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2

Die Wirkung von Thrombin auf das G_i-Protein und die Aktivierung von ERK1/2 wurden bisher nur getrennt untersucht. Ein möglicher Zusammenhang zwischen dem G_i-Protein und einer biphasischen Kinetik von ERK1/2 sollte durch den Einsatz von PTX untersucht werden. Dazu wurden neonatale glatte Gefäßmuskelzellen mit 100 ng/ml Pertussistoxin (PTX) über Nacht (12-16 h) vorbehandelt. Anschließend wurden die neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen mit 2 U/ml Thrombin stimuliert. Als Kontrolle wurden Zellen, die keiner Vorbehandlung mit PTX unterzogen waren, mit 2 U/ml Thrombin stimuliert (Abbildung 7).

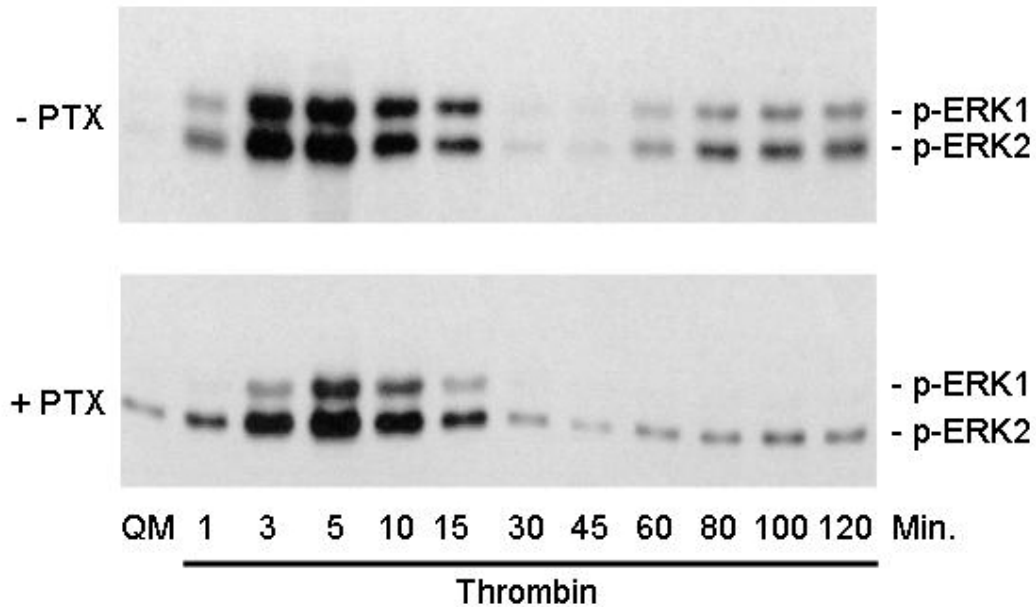


Abbildung 7: PTX inhibiert die Thrombin-induzierte Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden in 60 mm Platten subkultiviert und teilweise über Nacht (12-16 Stunden) mit PTX vorbehandelt (+ PTX). Anschließend erfolgte die Stimulation mit Thrombin (2 U/ml) für die angegebenen Zeiten. Die Gesamtzelllysate wurden in 10% SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und elektroblotted. Aktiviertes ERK1/2 wurde mit einem phosphospezifischen anti-ERK1/2 Antiserum detektiert.

Beim Vergleich der Immunoblots der Versuche mit und ohne PTX-Vorbehandlung ist eine leicht verminderte 1. Phase der ERK1/2-Phosphorylierung und eine komplett fehlende 2. Phase der ERK1/2-Phosphorylierung zu erkennen.

3.9 EGTA/BAPTA-AM inhibieren die durch Thrombin induzierte Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und der MAP-Kinasen Kinase (MEK)

Die durch Thrombin aktivierte Signalkaskade in neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen führt zu einer intrazellulären Kalziumkonzentrationserhöhung. Die Bedeutung dieser intrazellulären Kalziumkonzentrationserhöhung als Bindeglied zwischen aktiviertem G_i-Protein und den MAP-Kinasen ERK1/2 sollte mit zwei Experimentserien belegt werden. Unter Verwendung der Komplexbildnern EGTA (3 mM) und BAPTA-AM (20

μM), die den Zellen sowohl das extrazelluläre Kalzium als auch das intrazelluläre Kalzium entziehen, wurden neonatale glatte Gefäßmuskelzelle mit Thrombin (2 U/ml) stimuliert. Die biphasische Thrombin-induzierte Kinetik von ERK1/2 wurde durch diesen Kalziumentzug fast vollständig aufgehoben (Abbildung 8A). In einem weiteren Immunoblot mit einem primären Antikörper, welcher phosphoryliertes MEK detektiert, wurde diese Wirkung auch auf Ebene der MAP-Kinase-Kinase MEK nachgewiesen (Abbildung 8B).

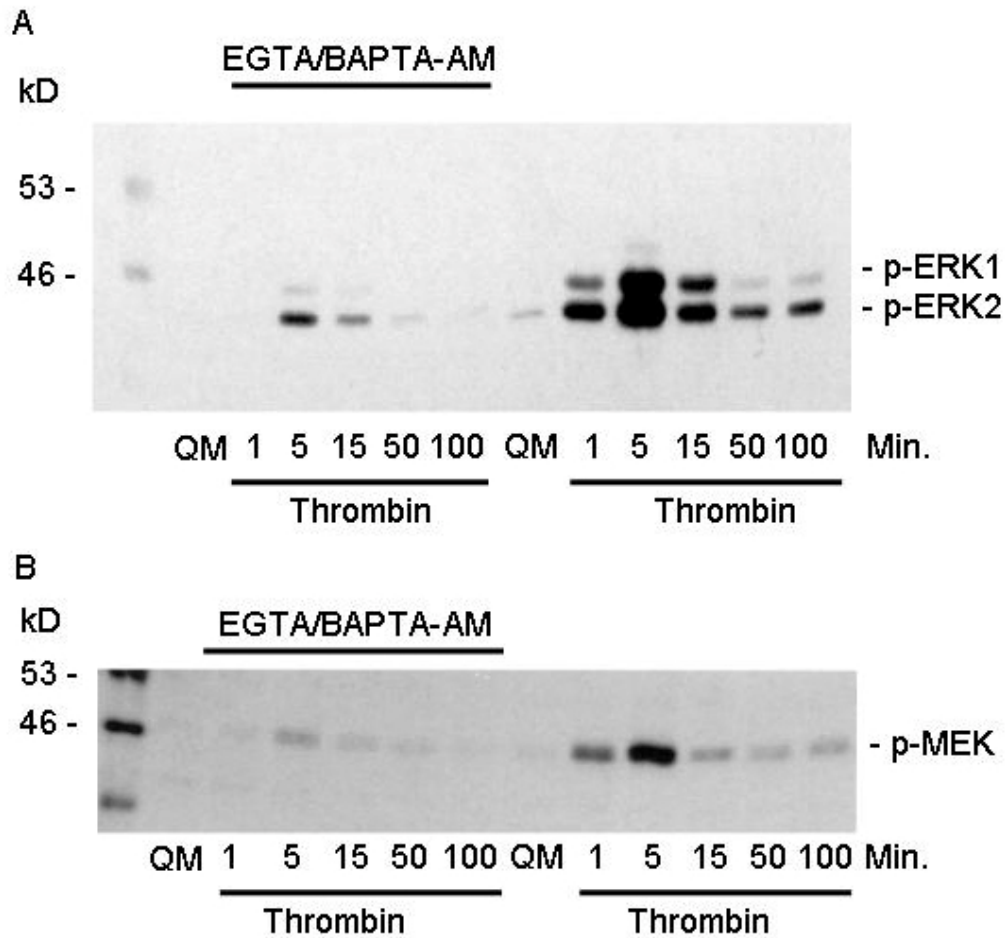


Abbildung 8: EGTA/BAPTA-AM inhibiert die durch Thrombin induzierte Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und der MAP-Kinasen Kinase (MEK)

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden in 60 mm Platten subkultiviert und mit EGTA (3 mM) und BAPTA (20 μ M) für 20 Minuten vorbehandelt, bevor mit Thrombin (2 U/ml) stimuliert wurde. Zum Vergleich wurden Zellen ohne EGTA/BAPTA-AM mit Thrombin stimuliert. Die Gesamtzelllysate wurden in 10% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und elektrogeblotted. Aktiviertes ERK1/2 bzw. MEK wurde mit einem phosphospezifischen anti-ERK1/2 bzw. anti-MEK Antiserum detektiert. Zur Größenabschätzung der Banden wurde auf der ersten Spur ein biotinylierter Proteinmarker zum Größenvergleich aufgetragen.

3.10 Ionomycin und A23187 induzieren eine Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und der MAP-Kinasen Kinase (MEK)

In einer weiteren Experimentserie wurde eine intrazelluläre Kalziumkonzentrationserhöhung durch den Einsatz der Kalziumionophoren Ionomycin (1 μ M) und A23187 (1 μ M) erzielt (Abbildung 9A). Durch diese Ionophoren-induzierte Kalziumkonzentrationserhöhung kam es zu einer Phosphorylierung von ERK1/2 mit einem Maximum der Aktivität zwischen 5 und 15 min. Diese ähnelt der ersten Phase der ERK-Phosphorylierung, welche durch Thrombin induziert wurde. Jedoch kommt es im Gegensatz zu Thrombin nicht zu einer verzögerten zweiten Phase der Phosphorylierung von ERK1/2. In einem weiteren Immunoblot mit einem primären Antikörper gegen phosphoryliertes MEK wurde diese Wirkung auch auf der Ebene der MAP-Kinase-Kinase MEK nachgewiesen (Abbildung 9B). Nicht dargestellt sind die Immunoblots zum Nachweis der gleichen Beladung der Spuren.

Die Ergebnisse aus den Kalziumexperimenten zeigen die Bedeutung der Anwesenheit von Kalzium bei der Thrombinwirkung. So ist Kalzium für die Differenzierung notwendig, reicht jedoch alleine nicht aus, die Thrombinwirkung nachzuahmen. Neben der Erhöhung des intrazellulären Kalziums müssen weitere Signalmoleküle aktiviert werden, um eine Thrombin-vermittelte Differenzierung in neonatalen Gefäßmuskelzellen der Ratte zu induzieren.

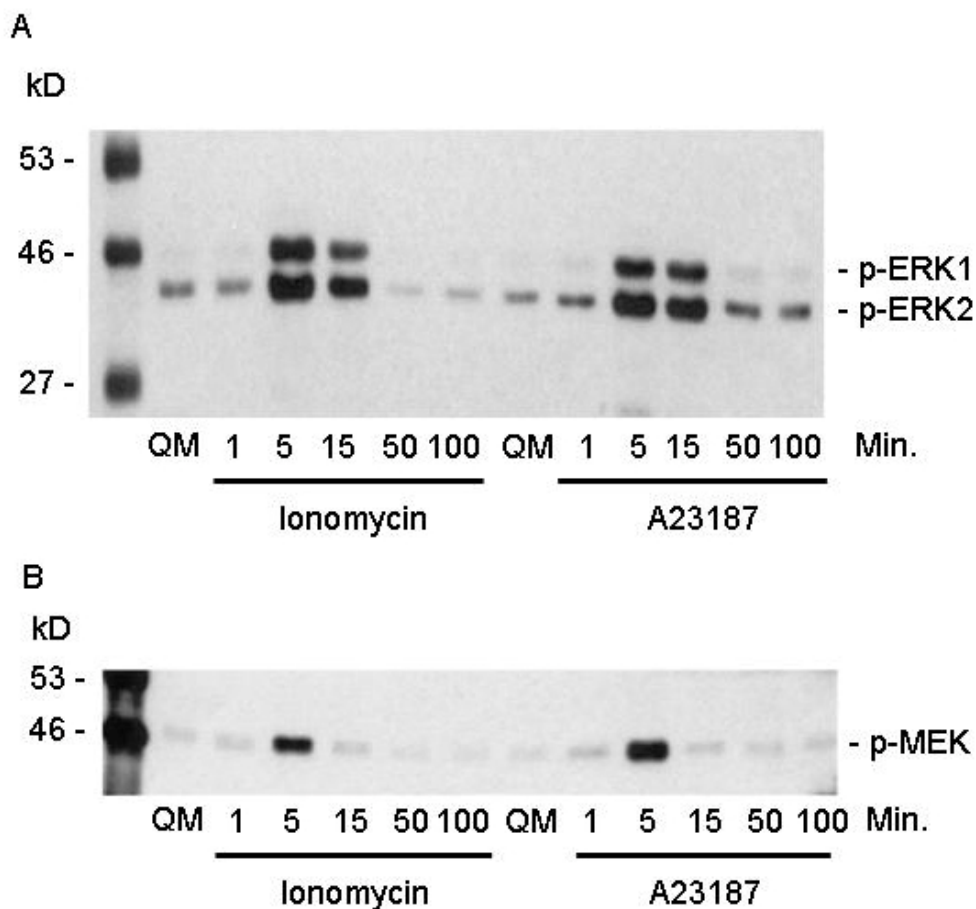


Abbildung 9: Ionomycin und A23187 induzieren eine Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und der MAP-Kinasen Kinase (MEK)

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden in 60 mm Platten subkultiviert und mit Ionomycin (1 μ M) oder A23187 (1 μ M) stimuliert. Die Gesamtzelllysate wurden in 10% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und elektrogeblotted. Aktiviertes ERK1/2 bzw. MEK wurde mit einem phosphospezifischen anti-ERK1/2 bzw. anti-MEK Antiserum detektiert. Zur Größenabschätzung der Banden wurde auf der ersten Spur ein biotinylierter Proteinmarker zum Größenvergleich aufgetragen.