
4. Diskussion

In dieser Doktorarbeit wird eine rezeptorvermittelte Signalkaskade für Thrombin beschrieben, die zur Differenzierung von neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen führt. Thrombin führt über die Aktivierung eines Proteinase aktivierten Rezeptors (PAR) zur Aktivierung von G_i -Proteinen. Aktivierte $G\beta\gamma$ -Untereinheiten konnten als die Untereinheiten identifiziert werden, die an der Vermittlung des durch Thrombin induzierten Signals beteiligt sind. Die durch die $G\beta\gamma$ -Untereinheit ausgelöste Signalkaskade induziert eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Weiterhin führt das Signal über die Kinase MEK zu einer biphasischen Kinetik der ERK1/2-Phosphorylierung. Diese biphasische Kinetik ist Voraussetzung für eine Aktivierung des SM-MHC (smooth muscle-myosin heavy chain) Promotors. Da die Expression der SM-MHC-Isoformen SM-1 und SM-2 für glatte Gefäßmuskelzellen spezifisch und für die Kontraktilität der Zellen von entscheidender Bedeutung ist, deutet die vermehrte Anwesenheit von SM-MHC nach Thrombinstimulation auf eine Differenzierung von neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen hin.

4.1 Wirkung von Thrombin an Proteinase aktivierten Rezeptoren

Thrombin kann drei Rezeptoren aus der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren proteolytisch aktivieren (40). Diese Rezeptoren gehören zur Klasse der Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR). Vier Subtypen dieser PAR sind bisher bekannt. Thrombin kann allerdings nur drei dieser Rezeptoren aktivieren : PAR-1, PAR-3 und PAR-4. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass Thrombin eine differenzierende Wirkung über PAR-1 vermittelt. Viele Zellen im menschlichen Organismus exprimieren PAR-1 und es werden viel geringere Thrombinkonzentrationen benötigt um ihn zu aktivieren, als es zum Beispiel für PAR-3 und PAR-4 der Fall ist (53). PAR-1-

Rezeptoren sind auch bei vaskulären Reaktionen auf Gefäßverletzungen beschrieben. Eine differenzierende Wirkung von Thrombin konnte bei Fibroblasten in der Lunge beobachtet werden. So kommt es bei der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten durch Thrombin nach der Aktivierung von PAR-1 zu einer Proteinkinase C abhängigen Signalkaskade (54).

In früheren Arbeiten konnte PAR-1 auf glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen werden (82). Da die Thrombin-induzierte Differenzierung in Fibroblasten über PAR-1 bekannt ist, vermuten wir, dass die in dieser Arbeit untersuchten Thrombinwirkungen in neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen ebenfalls über PAR-1 vermittelt werden. Experimente mit spezifischen Peptidliganden werden diese Frage definitiv klären.

4.2 Vermittlung des Thrombinsignals über ein G_i-Protein

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Thrombin-induzierte Differenzierung neonataler glatter Gefäßmuskelzellen über die G $\beta\gamma$ -Untereinheit von G_i-Proteinen vermittelt wird. Dass Thrombin seine Wirkung über die G $\beta\gamma$ -Untereinheit vermitteln kann, wird auch durch andere Arbeitsgruppen bestätigt. So wurde von Nagao et al. gezeigt, dass Thrombin in Myoblasten der quergestreiften Muskulatur über die G $\beta\gamma$ -Untereinheit eines PTX-sensitiven G-Proteins die Expression von MHC inhibiert (55). Diese Gemeinsamkeit des molekularen Mechanismus in der Vermittlung der Thrombinwirkung stützt die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse. Allerdings spricht das Ergebnis der verminderten Expression von MHC für eine Inhibierung der Differenzierung in Myoblasten und ist somit genau der entgegengesetzte Vorgang zu der Thrombin-induzierten Differenzierung in neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen. Eine mögliche Erklärung für diese genau entgegengesetzten Wirkungen von Thrombin über die G $\beta\gamma$ -Untereinheit des G_i-Proteins sind die unterschiedlichen Zelllinien. In

dieser Arbeit wurden glatte Gefäßmuskelzellen von neonatalen Ratten verwendet, während Nagao et al. mit Myoblasten der Skelettmuskulatur von Mäusen arbeiteten.

4.3 Beteiligung der Phospholipase C- β und der Proteinkinase C an der Signaltransduktion

Die Signalkaskade, die durch die $G\beta\gamma$ -Untereinheiten aus G-Proteinen aktiviert wird, war Gegenstand der Untersuchung von Reusch et al.. Wie es durch eine Aktivierung der $G\beta\gamma$ -Untereinheit zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration kommt, kann durch Daten aus der Literatur und Ergebnissen von Reusch et al. postuliert werden. So aktiviert die $G\beta\gamma$ -Untereinheit die Phospholipase C- β (77). Es existieren vier verschiedene Isoformen der Phospholipase C- β (56). Die Phospholipase C- β_1 , Phospholipase C- β_3 und Phospholipase C- β_4 werden durch die α -Untereinheit der PTX-insensitiven G_q -Familie reguliert. Die Phospholipase C- β_2 wird durch $G\beta\gamma$ -Untereinheiten reguliert. Die 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). DAG führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase C. Als Proteinkinase C (PKC) bezeichnet man eine Gruppe von Kalzium- und Phospholipid-abhängigen Proteinkinase-Isoformen, die an multiplen Signaltransduktionswegen beteiligt sind. Die PKC besteht aus einem Serin/Threonin-Proteinkinase-System mit einer großen Substratspezifität. Untersuchungen hinsichtlich der Beteiligung an diesen Signalwegen werden durch die Tatsache erschwert, dass die meisten Zellen verschiedene Isoformen der PKC exprimieren. Es konnte nachgewiesen werden, dass in glatten Gefäßmuskelzellen vor allem die Isoform PKC- α exprimiert wird (57). Von Reusch et al. bisher nicht veröffentlichte Daten zeigen eine Beteiligung der Proteinkinase C an der Thrombin-

induzierten Differenzierung von neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen. Es erscheint daher wahrscheinlich, dass die Phospholipase C- β_2 an der Signalkaskade beteiligt ist, da die Aktivierung der Proteinkinase C indirekt von der Phospholipase C- β_2 abhängt. Ein direkter Nachweis der Phospholipase C Isoformen in glatten Gefäßmuskelzellen gestaltet sich schwierig, da sie nicht zu jedem Zeitpunkt in glatten Gefäßmuskelzellen nachweisbar sind. So ist der Nachweis unter anderem auch davon abhängig, in welchem Grad der Differenzierung die Zelle vorliegt.

4.4 Bedeutung von Kalzium bei der Signaltransduktion

Anhand der gezeigten Daten wurde eine Beteiligung von Kalzium an der Signalkaskade der Thrombin-induzierten Differenzierung von neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen. Es konnte bei Myoblasten der Skelettmuskulatur beobachtet werden, dass eine verminderte intrazelluläre Kalziumkonzentration zu einer verminderten Expression von MHC und Myogenin führt (78). Eine Differenzierung, die durch Kalzium induziert wird, wurde z.B. auch bei Parotiszellen oder Keratinozyten beobachtet (79,80). Kalzium kann aber auch die Differenzierung von Zellen inhibieren, wie es z.B. in Adipozyten nachgewiesen wurde (81). Diese Daten sind jedoch schwer miteinander zu vergleichen, da die Experimentbedingungen und die Auswertungskriterien sehr unterschiedlich sind. Die in dieser Arbeit erstellten Ergebnisse zeigen, dass Thrombin ohne intrazelluläres Kalzium keine Phosphorylierung von ERK1/2 induzieren kann. Daher scheint die Anwesenheit von Kalzium eine notwendige Bedingung für die biphasische ERK1/2-Aktivierung zu sein. Eine alleinige Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Kalzium-Ionophoren führte allerdings nicht zu einer biphasischen Aktivierung von ERK1/2, sondern nur zu einer Phosphorylierung von ERK1/2 zwischen 5 und 15 min. Dies zeigt, dass eine intrazelluläre Kalziumkonzentrationserhöhung keine hinreichende Bedingung für eine

biphasische ERK1/2-Aktivierung darstellt. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass mindestens 2 unabhängige Signalkaskaden für die frühe und die späte ERK1/2-Aktivierung nötig sind. Allerdings besitzt Kalzium bei vielen Prozessen innerhalb der Zelle eine wesentliche Bedeutung und unterliegt somit auch vielen Regulationsmechanismen.

4.5 Bedeutung der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade

Aktivierte extrazellulär-signalregulierte Kinasen (ERK1/2) sind alleine oder aber unter Mitaktivierung anderer MAP-Kinasen in der Lage die Expression kontraktiler Proteine zu steigern. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten zeigen, dass die Thrombin-induzierte SM-MHC Expression über die Kinasen MEK und ERK1/2 vermittelt wird. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Thrombin-Stimulation neonataler glatter Gefäßmuskelzellen zu einer ERK1/2-Aktivierung, nicht aber zu einer Aktivierung anderer Mitglieder der MAPK-Familie wie p38 oder c-Jun-Kinasen führt (Reusch et al., bisher unveröffentlicht). Die Aktivierung von ERK1/2 scheint daher sowohl ausreichend als auch notwendig für eine Rezeptor-vermittelte Differenzierung neonataler glatter Gefäßmuskelzellen zu sein.

Die ERK1/2-Phosphorylierung kann durch viele verschiedene Signalkaskaden bewirkt werden. Noch nicht veröffentlichte Daten von Reusch et al. beweisen die Beteiligung von Ras und Raf an der Thrombin-induzierten SM-MHC Expression, so dass von einer Signalkaskade ausgegangen werden kann, bei der aktiviertes Ras zu einer Aktivierung der MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK) Raf führt. Die aktivierte MAPKKK Raf führt dann zu einer Phosphorylierung zweier Serin-/Threoninreste der MAPKK (MAP-Kinase-Kinase) MEK. Die aktivierte MAPKK MEK führt wiederum zu einer Phosphorylierung der MAPK ERK1 und ERK2. Diese Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade reguliert zwei einander gegenüberstehende Prozesse. Über die ERK-Aktivierung kann

sowohl zelluläre Proliferation als auch Differenzierung vermittelt werden (58,59,60). Die hier dargestellten Daten zeigen, dass eher eine lang andauernde als eine kurze ERK-Phosphorylierung für eine Differenzierung von glatten Gefäßmuskelzellen nötig ist. Auch andere zelluläre Modelle, wie z.B. Megakaryozyten, Thymozyten und PC12-Zellen, unterstützen die These, dass die lang dauernde gegenüber der kurzen ERK-Aktivierung einen wesentlichen Einfluss auf die Auswirkung hinsichtlich zellulärer Proliferation oder Differenzierung besitzt (61,62,63). Diese Auswirkungen wurden ebenfalls in Makrophagen untersucht. So lösen Substanzen wie MCSF, die einen proliferativen Effekt besitzen, in Makrophagen eine frühe ERK-Phosphorylierung nach 5 Minuten aus (75). Eine Substanz wie LPS, die eine Differenzierung der Makrophagen bewirkt, führt zu einer ERK-Phosphorylierung nach 15 Minuten. Eine Regulation zwischen Differenzierung und Proliferation in Makrophagen wird somit auch durch die Kinetik der ERK-Aktivierung bestimmt. Allerdings konnte hier bei einem differenzierenden Signal keine frühe ERK-Phosphorylierung erkannt werden, wie es bei neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen nach Thrombinstimulation der Fall ist. Somit ist anscheinend auch bei Makrophagen die ERK-Aktivierung von verschiedenen Signalkaskaden abhängig und stützt die These, dass mindestens zwei unabhängige Wege die frühe und verzögerte Phase der ERK-Aktivierung kontrollieren.

Auch in Human Erythroleukemia (Hel)-Zellen finden sich ähnliche Signaltransduktionswege wie in neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen (64). So konnte in Human Erythroleukemia-Zellen gezeigt werden, dass die ERK1/2-Aktivierung Rezeptorspezifisch ist und nicht notwendigerweise einen proliferativen Reiz darstellen muss. Ebenfalls nachgewiesen wurde die Abhängigkeit der ERK 1/2-Phosphorylierung von einer intrazellulären Kalziumkonzentrationserhöhung und der Funktionsfähigkeit der Proteinkinase C. Allerdings ist eine alleinige Kalziumkonzentrationserhöhung nicht ausreichend um eine ERK1/2-Aktivierung zu erklären. Desweiteren wird das

Thrombinsignal auch in HeI-Zellen über MEK auf ERK1/2 vermittelt. Im Gegensatz zu neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen wird das Thrombinsignal in HeI-Zellen jedoch über ein Pertussistoxin (PTX) insensitive G-Protein weitergeleitet.

Diese Daten verdeutlichen, dass die in dieser Arbeit gezeigte Kinetik der ERK-Aktivierung in neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen nicht unbedingt zellspezifisch ist, sondern unabhängig vom jeweiligen Zelltyp Auswirkungen in Richtung Differenzierung oder Proliferation besitzt.

4.6 Vermittlung der differenzierenden Thrombinwirkung in den Zellkern

Die Signalweiterleitung von ERK in den Zellkern und die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren ist bisher relativ wenig untersucht worden. Daher liegen noch nicht viele Daten vor. Die aus der Literatur bekannten Daten sind stark von den jeweiligen Zelltypen abhängig. So ist bekannt, dass ERK1/2 verschiedene Transkriptionsfaktoren in glatten Gefäßmuskelzellen reguliert, die dafür bekannt sind, dass sie das Wachstum und die Differenzierung beeinflussen (65). Weitere noch nicht veröffentlichte Daten von Reusch et al. identifizieren diese Transkriptionsfaktoren und deren Bindungsstelle an den SM-MHC Promotor.

Zu der bisher erläuterten Signalkaskade ist eine weitere Signalkaskade neben der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade gefunden worden, über die Thrombin seine Wirkung in den Zellkern von glatten Gefäßmuskelzellen vermitteln kann. So kommt es über PAR-1 zu einer Aktivierung von JAK2 und TYK2, zweier intrazellulären Tyrosinkinase (66). Diese scheinen oberhalb der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade ihre Wirkung zu vermitteln. Die Signale dieser Kaskade werden dann durch die p38 MAP-Kinase und die Translokation von STAT1 (signal transducers and activators of transcription) und STAT3 in den Zellkern vermittelt. Im Gegensatz zur Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade vermittelt sie aber eher proliferative Signale. Reusch et al. konnten keine Beteiligung

der p38 MAP-Kinase an der Thrombin-induzierten Differenzierung von neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen nachweisen. Eine mögliche Ursache für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte sein, dass die JAK-STAT Signalkaskade bisher nur in adulten glatten Gefäßmuskelzellen gezeigt wurde, während in dieser Arbeit neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen untersucht wurden.