

3. Resultate

3.1 Serum induziert eine Aktivierung des SM-MHC-Promotors

Serum induziert *in vitro* eine Differenzierung neonataler glatter Gefäßmuskelzellen. Über welche Mechanismen Serum die Differenzierung in neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen bewirkt und welche Signaltransduktionswege die vermehrte Expression des Differenzierungsmarkers SM-MHC vermitteln, sollte durch Experimente mit einem SM-MHC-Promotor-CAT-Fusionsprodukt geklärt werden, das unter der Kontrolle der -1352 bp zählenden Promotor-Region des SM-MHC-Promotors steht.

Stimulation mit serumfreiem Medium führte zu einer 4-6-fach höheren CAT-Aktivität der mit pCAT-1352 transfizierten GMZ im Vergleich zu den mit dem promotorlosen pCAT-basic-Vektor transfizierten Zellen (Daten nicht gezeigt). Die Behandlung der neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen mit Serum steigerte die CAT-Aktivität noch einmal um das $5,1 \pm 0,5$ -fache (Abb. 2a), während die CAT-Expression angetrieben durch einen SV40-Promotor (pCAT-control) nach Serum-Stimulation um das 11-fache höher war (Abb. 2a). Eine Transfektion von pCAT-1352 in Swiss 3T3-Fibroblasten führte weder unter Serum-Entzug noch nach Stimulation mit Serum zu einer signifikanten Steigerung der CAT-Aktivität (Daten nicht gezeigt). Die relativen CAT-Aktivitäten sind ausgedrückt als Mittelwert \pm Standardabweichung. Alle Assays wurden 3-4 mal in jeweils 6 Ansätzen wiederholt. Die in der Abbildung 2a gezeigten Resultate belegen, dass es unter Serumeinfluß zu einer transkriptionellen Aktivierung der SM-MHC in neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen kommt. Das pCAT-1352-Konstrukt zeigte eine 25-fache Aktivität gegenüber pCAT-basic.

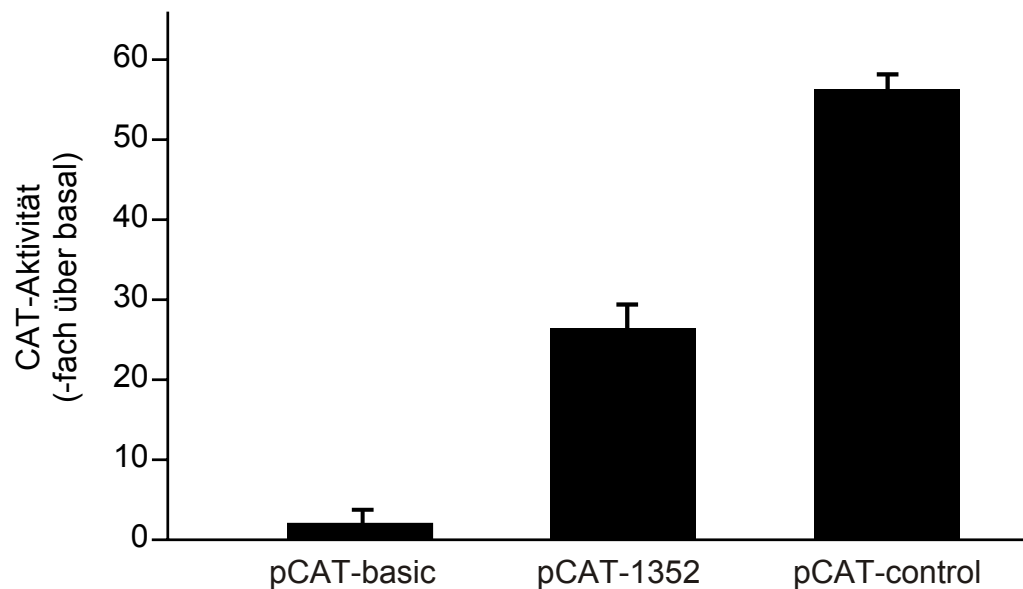


Abbildung 2a. **Einfluß von Serum auf die SM-MHC-Promotoraktivität.** Die mit dem pCAT-basic-Vektor transient transfizierten GMZ zeigen nach Wachstumssynchronisierung (Serumentzug für 48 h) und anschließender Serumstimulation basale Promotoraktivität und dienen als Negativkontrolle. Parallel wurden GMZ mit pCAT-control und einem 5'- Deletionskonstrukt transient transfiziert und identisch behandelt. Die mit dem pCAT-control-Vektor transient transfizierten GMZ zeigen 56-fach gesteigerte SM-MHC-Promotoraktivität über pCAT-basic und dienen als Positivkontrolle.

3.2 Thrombin induziert eine Aktivierung des SM-MHC-Promotors

Serum enthält eine Vielzahl an verschiedenen Wachstumsfaktoren, vasoaktiven Stoffen und anderen Agonisten, die ihre Wirkung durch die Aktivierung verschiedenster Signalkaskaden vermitteln. Durch RNase-Protection-Assays konnte nachgewiesen werden, dass Thrombin eine 10-fach gegenüber Hungermedium gesteigerte steady-state-Expression von SM-1 und SM-2 bewirkt (Reusch et al., 2001). Daher sollte zunächst der mögliche Einfluß von Thrombin auf die SM-MHC-Promotoraktivität mittels Einsatz des CAT-SM-MHC-Promotor-Fusionskonstruktes

untersucht werden. Nachfolgende Experimente wurden mit dem pCAT-1352-Konstrukt, im Vergleich zu pCAT-basic und pCAT-control durchgeführt. In den mit Hungermedium vorbehandelten Zellen führte die Stimulation mit 1 U/ml Thrombin zu einem $2 \pm 0,1$ -fachen Anstieg der CAT-Aktivität verglichen zu in Serum-freiem Medium (Quiescent Medium, QM) kultivierten Zellen (Daten nicht gezeigt; Reusch et al., 2001). Zur Bestimmung der basalen Hintergrundaktivität des CAT-Assays wurde die CAT-Aktivität der mit dem pCAT-basic-Vektor transfizierten Zellen gleich 1 gesetzt und die CAT-Aktivitäten des Konstruktes darauf bezogen. Das Konstrukt pCAT-control diente mit einer CAT-Aktivität von 50-fach über pCAT-basic als Positivkontrolle. Die CAT-Aktivität des pCAT-1352-Konstruktes zeigte unter Thrombinstimulation eine 30-fach gesteigerte Aktivität über pCAT-basic. Die relativen CAT-Aktivitäten wurden in Mittelwert \pm Standardabweichung ausgedrückt. Alle Assays wurden 3-4 mal in jeweils 6 Ansätzen wiederholt.

Die Daten zeigen (Abb. 2b), dass es unter Thrombineinfluß zu einer transkriptionellen Aktivierung des SM-MHC-Promotors in neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen kommt. Ausgehend von diesem Nachweis sollten die Signaltransduktionswege von der Stimulation des Protease-aktivierten-Thrombinrezeptors (PAR1) bis zur Phosphorylierung potentieller nukleärer Transkriptionsfaktoren des SM-MHC-Promotors untersucht werden.

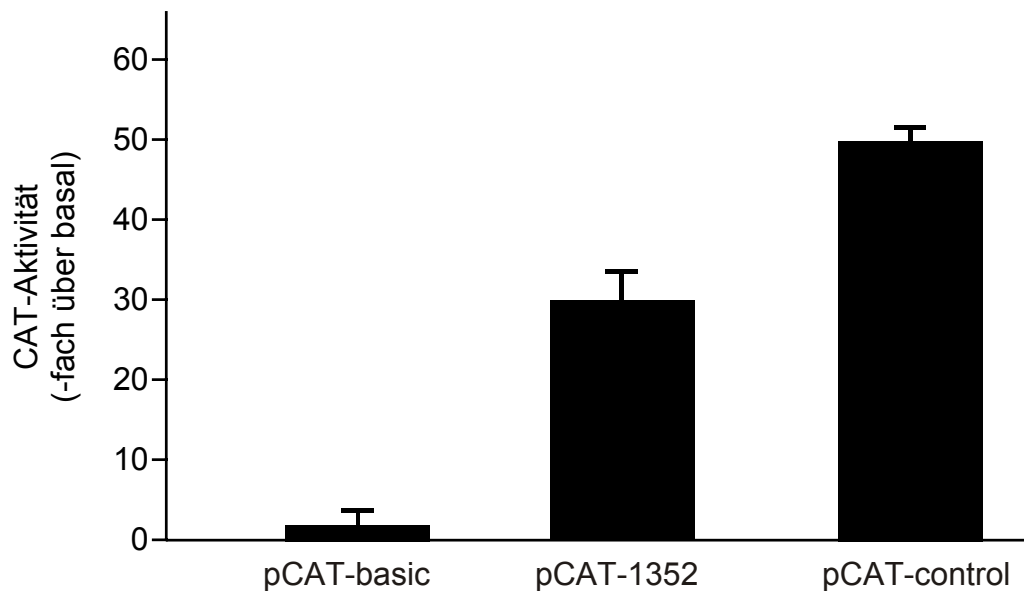


Abbildung 2b. **Einfluß von Thrombin auf die SM-MHC-Promotoraktivität.** Die mit dem pCAT-basic-Vektor transient transfizierten GMZ zeigen nach Wachstumssynchronisierung (Serumentzug für 48 h) und anschließender Thrombinstimulation (1U/ml für 48 h) basale Promotoraktivität und dienen als Negativkontrolle. Parallel wurden GMZ mit pCAT-control und pCAT-1352 transient transfiziert und identisch behandelt. Die mit dem pCAT-control-Vektor transient transfizierten GMZ zeigen 50-fach gesteigerte SM-MHC-Promotoraktivität über pCAT-basic und dienen als Positivkontrolle für Transfektion und CAT-Aktivität. Der pCAT-1352-Vektor hat mit 30-fach über pCAT-basic signifikant gesteigerte Aktivität.

3.3 Dominant negatives Ras oder dominant negatives Raf reduzieren die Thrombin-induzierte ERK1/2-Aktivierung

In Vorarbeiten konnte die Beteiligung der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade bei der Serum-induzierten Expression des SM-MHC-Gens in neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen werden. Um eine mögliche Beteiligung von Mitgliedern der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade an der Thrombin-induzierten Aktivierung des SM-MHC-Promotors nachzuweisen, wurden neonatale glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte mit dem Reporter-Gen-Konstrukt pCAT-1352 und steigenden Mengen an Plasmid-DNA, die für dominant negatives N17-Ras oder N17-Raf kodiert, transient

kotransfiziert. In allen Kotransfektionsexperimenten wurde die Gesamtmenge an zu transfizierender Plasmid-cDNA, durch Zugabe von promotorloser pCAT-basic-cDNA konstant bei 1 µg Gesamt-DNA gehalten.

Die gemessene CAT-Aktivität des Kotransfektionsexperimentes (Abb. 3) zeigt, dass die Thrombin-induzierte CAT-Aktivität durch Koexpression von dominant-negativem N17-Ras oder N17-Raf konzentrationsabhängig reduziert werden kann. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der Thrombin-induzierte Anstieg der SM-MHC-Promotor-Aktivität intakte Ras-/Raf-Signalproteine benötigt.

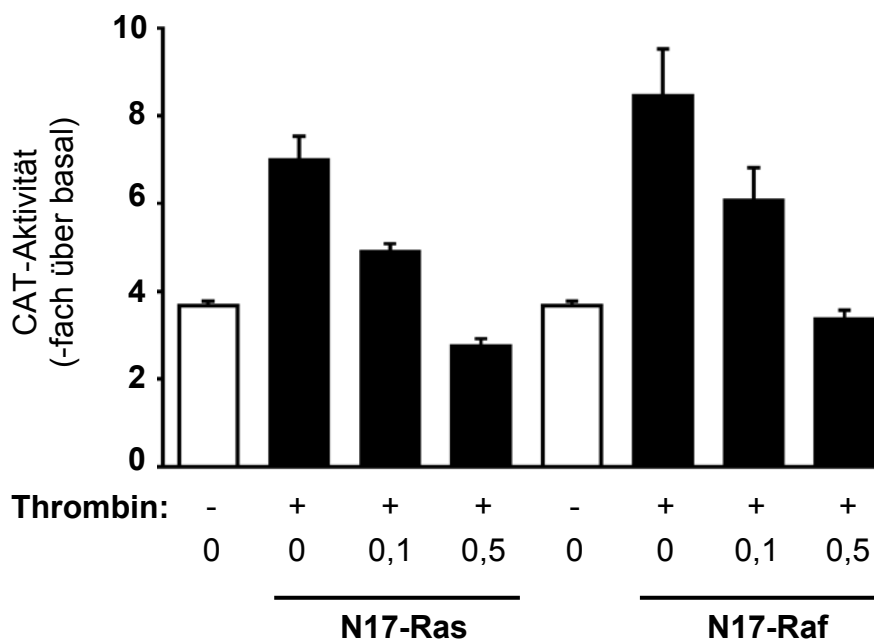


Abbildung 3. **Beeinflussung der Thrombin-induzierten SM-MHC-Promotor-Aktivität durch transiente Kotransfektion von dominant negativem N17-Ras oder N17-Raf in neonatalen glatten Gefäßmuskel-Zellen.** Glatte Gefäßmuskelzellen wurden in 6-Loch-Platten subkultiviert und 48 h mit serumfreiem Medium behandelt. Anschließend erfolgte eine transiente Kotransfektion von pCAT-1352 mit N17-Ras oder N17-Raf. Nach Stimulation mit 1 U/ml Thrombin für 48 h wurde die CAT-Aktivität gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SE von mindestens drei vergleichbaren Experimenten.

Während die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade und ihre Beteiligung an der Proliferation und Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen schon intensiv studiert wurde, jedoch die oberhalb von Ras gelegenen Signalwege und ihre Beteiligung an der Differenzierung neonataler glatter Gefäßmuskelzellen der Ratte noch unzureichend charakterisiert sind, sollten weitere potentiell beteiligte Signalproteine identifiziert werden.

3.4 Die Proteinkinase C ist an der ERK1/2-Phosphorylierung nach Thrombinstimulation neonataler glatter Gefäßmuskelzellen beteiligt

Eine Beteiligung der Proteinkinase C (PKC) an Proliferation und Differenzierung konnte bisher für verschiedene Zellreihen, nicht aber bei der Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen nachgewiesen werden. Um zu untersuchen, welche Bedeutung die Proteinkinase C an der Differenzierung kultivierter GMZ hat, wurden Experimente durchgeführt, bei denen ein Teil der wachstumssynchronisierten GMZ für 24 h mit 1 μ M Phorbol-12-myristat-13-azetat (PMA) behandelt wurden. Ein anderer Teil kultivierter GMZ wurde für 24 h mit serumfreiem Medium vorbehandelt. Nach Ablauf dieser Zeit wurden beide Teile mit 2 U/ml Thrombin stimuliert. Als Negativkontrolle dienten GMZ, die mit serumfreiem Medium (QM) stimuliert wurden.

In Zellen, die noch über eine aktivierbare Proteinkinase C verfügten, konnte ein deutliches Signal der phosphorylierten ERK1/2 nach Thrombinstimulation detektiert werden. Die Zellen, deren Proteinkinase C durch PMA-Stimulation über 24 h inaktiviert wurde, zeigten eine verminderte ERK1/2-Aktivierung. Dies läßt vermuten, dass die Proteinkinase C ein Bestandteil der durch Thrombinstimulation aktivierten Signalkaskade ist, die zur Differenzierung neonataler glatter Gefäßmuskelzellen führt.

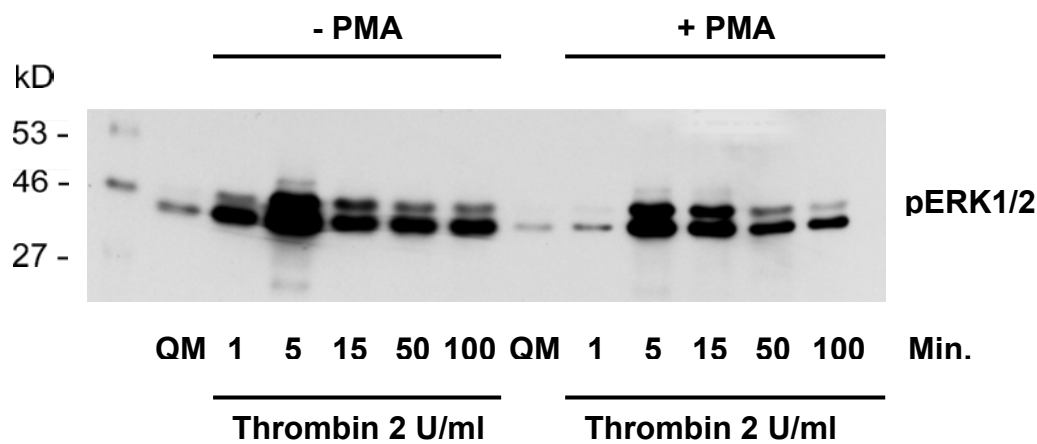


Abbildung 4a. **Einfluß der PMA-Vorbehandlung auf die Thrombin-induzierte ERK1/2-Aktivität neonataler glatter Gefäßmuskelzellen.** Glatte Gefäßmuskelzellen wurden in 60 mm Platten subkultiviert und für 24 h mit 1 μ M PMA bzw. ohne PMA vorbehandelt. Nach Ablauf der Zeit wurden die GMZ für 1, 5, 15, 50 oder 100 min mit 2 U/ml Thrombin stimuliert. Im Anschluß daran Lyse der GMZ und Analyse mittels Immunoblots in denen der primäre Antikörper phosphoryliertes ERK1/2 detektiert. Die gezeigte Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei vergleichbare Experimente.

In einem weiteren Immunoblot mit einem primären Antikörper gegen phosphoryliertes MEK, wurde diese Beteiligung auch auf Ebene der oberhalb von ERK1/2 gelegenen MAP-Kinase-Kinase MEK nachgewiesen (Abb. 4b).

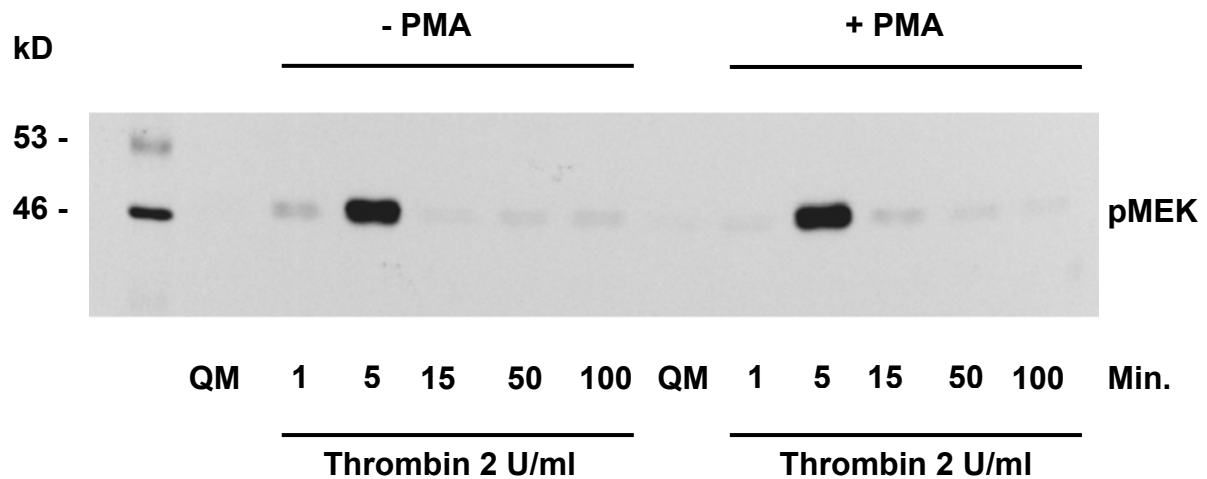


Abbildung 4b. **Einfluß der PMA-Vorbehandlung auf die Thrombin-induzierte MEK-Aktivität neonataler glatter Gefäßmuskelzellen.** Glatte Gefäßmuskelzellen wurden in 60 mm Platten subkultiviert und für 24 h mit 1 μ M PMA bzw. ohne PMA vorbehandelt. Nach Ablauf der Zeit wurden die GMZ für 1, 5, 15, 50 oder 100 min mit 2 U/ml Thrombin stimuliert. Im Anschluß Lyse der GMZ und Analyse mittels Immunoblots in denen der primäre Antikörper phosphoryliertes MEK detektiert. Die gezeigte Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei vergleichbare Experimente.

Um die Bedeutung der Proteinkinase C an der Thrombin-vermittelten Differenzierung neonataler glatter Gefäßmuskelzellen zu verifizieren, wurden weitere Experimente durchgeführt (Abb. 4c), in denen kultivierte neonatale glatte Gefäßmuskelzellen entweder mit PMA oder Bisindolylmaleimid (BIM), einem pharmakologischen PKC-Inhibitor, vorbehandelt wurden. Als Kontrolle dienten mit serumfreiem Medium (QM) behandelte GMZ. Anschließend wurden die Zellen mit Thrombin, EGF oder PMA für 5 min und ein weiterer Teil mit Thrombin für 120 min stimuliert. Durch einen Immunoblot mit einem primären Antikörper gegen phosphoryliertes ERK1/2 konnte die ERK-Aktivierung nachgewiesen werden. Zum Nachweis der gleichen Protein-Beladung der Spuren wurden Immunoblots mit einem Antikörper durchgeführt, der unselektiv alle aktivierten und nicht-aktivierten ERK1/2-Formen erkennt.

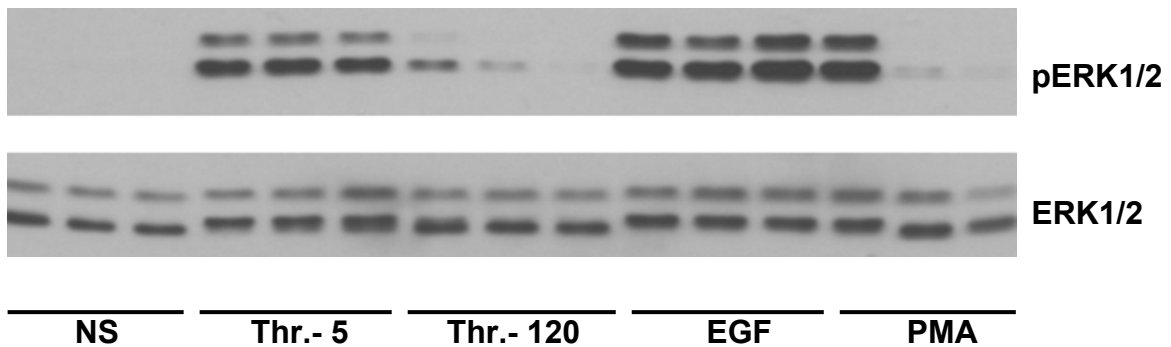


Abbildung 4c. **Einfluß von BIM- und PMA-Vorbehandlung auf die Thrombin-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung neonataler glatter Gefäßmuskelzellen.** GMZ wurden in 60 mm Platten subkultiviert und für 24 h mit 1 μ M PMA bzw. für 30 min mit 1 μ M BIM vorbehandelt. Danach Stimulation der Zellen mit Thrombin, EGF oder PMA für 5 min bzw. 120 min. Im Anschluß daran Lyse der GMZ und Analyse mittels Immunoblots in denen der primäre Antikörper phosphoryliertes ERK1/2 detektiert. Zum Nachweis der exakten Proteinbeladung der Spuren wurden Immunoblots mit primären Antikörpern durchgeführt, die sowohl phosphoryliertes als auch unphosphoryliertes ERK1/2 detektieren. Jedes der gezeigten Triplikate repräsentiert in identischer Reihenfolge die Art der Vorbehandlung mit (1) QM, (2) BIM und (3) PMA. Die gezeigte Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei vergleichbare Experimente.

Die nicht stimulierten, mit serumfreiem Medium behandelten Zellen zeigen erwartungsgemäß, unabhängig von einer Inhibition der Proteinkinase C mit BIM oder PMA, keine Phosphorylierung von ERK1/2. Dagegen zeigen die für 5 min mit Thrombin stimulierten neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen trotz Vorbehandlung mit PKC-Inhibitoren eine deutliche ERK1/2-Phosphorylierung.

Für 120 min mit Thrombin stimulierte neonatale glatte Gefäßmuskelzellen zeigen ein deutliches Signal der ERK1/2-Phosphorylierung für nicht-PKC-inhibierte Zellen, während durch BIM und PMA inhibierte GMZ erwartungsgemäß nur sehr geringe bzw. keine ERK-Aktivität zeigen.

Die starke ERK1/2-Phosphorylierung nach Stimulation neonataler glatter Gefäßmuskelzellen mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) ist durch eine Proteinkinase C-unabhängige Aktivierung der MAP-Kinasen zu erklären. Die Agonist-abhängige Aktivierung des EGF-Rezeptors induziert Signale, die eine p21ras-Aktivierung benötigen und Proteinkinase C-unabhängig sind (van Biesen et al., 1996). Dieses EGF-Experiment dient auch als Nachweis dafür, dass die verwendeten Inhibitoren die Proteinkinase C selektiv inhibieren und die Vitalität der Zellen nicht beeinflussen.

Mit PMA stimulierte Zellen zeigen eine deutliche ERK1/2-Phosphorylierung für nicht-PKC-inhibierte Zellen. PMA gilt als einer der stärksten Proteinkinase C- und ERK-Aktivatoren ist. Dagegen zeigen Proteinkinase C-inhibierte Zellen nach PMA-Stimulation keine ERK1/2-Aktivierung.

3.5 Der Src-Kinase-Inhibitor PP2 verhindert die Thrombin-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung

Bei einer Vielzahl von Zellsystemen spielt die Familie der Src-Kinasen eine Schlüsselrolle in der Signaltransduktion mitogener Reize nach Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Die genauen Mechanismen, über welche Effektoren aktivierter G-Protein-gekoppelter-Rezeptoren die Src-Familie-Kinasen stimulieren, ist weiterhin unklar. Um den Stellenwert der Src-Kinase bei der MAPK-Aktivierung in kultivierten neonatalen GMZ zu charakterisieren, wurden Experimente mit PP2, einem potenten und selektiven Inhibitor von Tyrosinkinase der Src-Familie durchgeführt. Kultivierte neonatale glatte Gefäßmuskelzellen wurden mit 0,01 bis 1 μM PP2 für 30 min inkubiert und im Anschluß für 5 min mit 1 U/ml Thrombin stimuliert. Durchgeführte Immunoblots mit primären Antikörpern, die phosphoryliertes ERK1/2 detektieren, zeigen, dass steigende Konzentrationen von PP2 die ERK1/2-Aktivität reduzieren (Abb. 5). Daher kann eine Beteiligung der Src-Kinase am G-Protein-gekoppelten Signalweg vom Protease-aktivierten-Rezeptor (PAR) zur phosphorylierten ERK1/2-Kinase in kultivierten neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte angenommen werden.

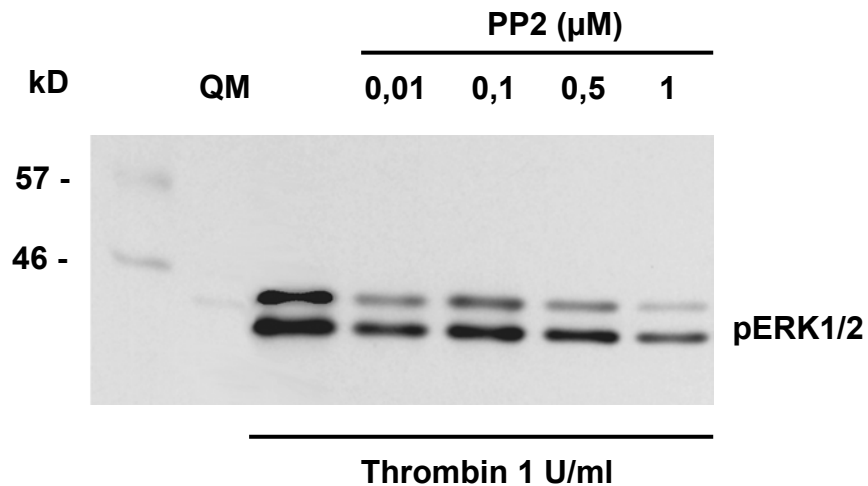


Abbildung 5. **Einfluß von PP2 auf die Thrombin-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung neonataller glatter Gefäßmuskelzellen.** GMZ wurden in 60 mm Platten subkultiviert und für 30 min mit PP2, einem selektiven Inhibitor der Src-Kinase vorbehandelt. Danach 5 minütige Stimulation der Zellen mit 1 U/ml Thrombin. Im Anschluß daran Lyse der GMZ und Analyse mittels Immunoblots in denen der primäre Antikörper phosphoryliertes ERK1/2 detektiert. Zur Längenabschätzung der Banden wurde auf der ersten Spur ein biotinylierter Proteinmarker (New England BioLabs) zum Größenvergleich aufgetragen. Die gezeigte Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei vergleichbare Experimente.

Um die Beteiligung der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Src an der Thrombin-vermittelten ERK1/2-Phosphorylierung zu verifizieren, wurden Experimente mit Genistein im Vergleich zu PP2 durchgeführt. Genistein verhindert die Thrombin-induzierte Ras-vermittelte ERK-Phosphorylierung. Dabei geht man davon aus, dass die Ras-Phosphorylierung über bisher nicht eindeutig identifizierte intrazelluläre Phosphoproteinkinasen geschieht. Kultivierte GMZ wurden mit 50 µM Genistein oder 1 µM PP2 für 30 min vorbehandelt. Als Kontrolle dienten mit serumfreiem Medium behandelte Zellen. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen mit 1 U/ml Thrombin, 10 ng/ml EGF oder 1 µM PMA für 5 min behandelt. Ein weiterer Teil der Zellen wurde mit 1 U/ml Thrombin für 120 min stimuliert. In anschließenden Immunoblots wurden primäre Antikörper verwendet, die phosphoryliertes ERK1/2 detektieren. Zum Nachweis der gleichen Proteinbeladung der Spuren wurden Immunoblots mit

primären Antikörpern durchgeführt, die sowohl phosphoryliertes als auch nicht-phosphoryliertes ERK1/2 detektieren (Abb. 6).

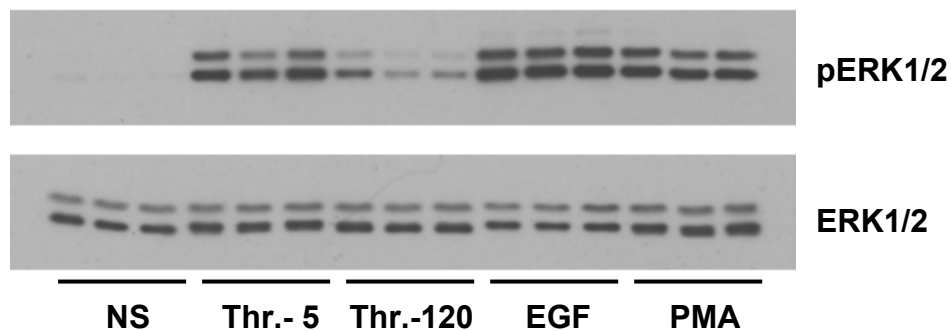


Abbildung 6. **Einfluß von Genistein und PP2 auf die ERK1/2-Phosphorylierung neonataler glatter Gefäßmuskelzellen nach Stimulation mit Thrombin vs. EGF und PMA.** Glatte Gefäßmuskelzellen wurden in 60 mm Platten subkultiviert und mit serumfreiem Medium (als Kontrolle), 50 μ M Genistein und 1 μ M PP2 für 30 min inkubiert. Im Anschluß daran Stimulation der GMZ mit 1 U/ml Thrombin, 10 nM EGF und 1 μ M PMA für 5 min bzw. mit 1 U/ml Thrombin für 120 min. Danach Lyse der GMZ und Analyse mittels Immunoblots in denen der primäre Antikörper phosphoryliertes ERK1/2 detektiert. Zum Nachweis der exakten Proteinbeladung der Spuren wurden Immunoblots mit primären Antikörpern durchgeführt, die sowohl phosphoryliertes als auch unphosphoryliertes ERK1/2 detektieren. Jedes der gezeigten Triplikate repräsentiert in identischer Reihenfolge die Art der Vorbehandlung mit (1) QM, (2) Genistein und (3) PP2. Die gezeigte Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei vergleichbare Experimente.

Für die nicht-stimulierten Zellen konnte erwartungsgemäß keine ERK1/2-Aktivierung nachgewiesen werden. Dagegen zeigten neonatale glatte Gefäßmuskelzellen, die für 5 min mit Thrombin stimuliert wurden, trotz Vorbehandlung mit Genistein und PP2 keine signifikante Verminderung der ERK1/2-Aktivität gegenüber der nicht-inhibierten Kontrolle. Nach 120 minütiger Thrombinstimulation zeigt sich eine signifikant reduzierte Phosphorylierung von ERK1/2 bei den mit Genistein und PP2 vorbehandelten Zellen. Dies läßt die Notwendigkeit des Vorhandenseins von Src und/oder bestimmten Phosphoproteinkinasen an der späten Phase der Thrombin-

vermittelten ERK1/2-Aktivierung vermuten. Sowohl inhibierte als auch nicht vorbehandelte glatte Gefäßmuskelzellen zeigen nach EGF- und PMA-Stimulation eine signifikante ERK1/2-Phosphorylierung und dienen somit als Nachweis Src-unabhängiger Aktivierung der ERK1/2 über den EGF-Rezeptor und die Proteinkinase C. Weiterhin demonstrieren diese Daten die Unversehrtheit der Zellen nach Inhibitor-Vorbehandlung, so dass die gezeigte verminderte ERK1/2-Aktivierung nach 120-minütiger Thrombinstimulation nicht auf geschädigte Zellen zurückzuführen ist.

3.6 Der EGF-Rezeptor-Kinase-Inhibitor AG 1478 inhibiert die Thrombin-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung

Um die Beteiligung des EGF-Rezeptors an der PAR-Rezeptor-abhängigen Signalkaskade nachzuweisen, wurden kultivierte neonatale glatte Gefäßmuskelzellen für 15 min mit steigenden Mengen Tyrphostin AG 1478, einem potenten und hochselektiven Inhibitor der EGF-Rezeptor-Tyrosin-Kinase inkubiert und im Anschluß für 5 min mit 1 U/ml bzw. 0,01 U/ml Thrombin stimuliert (Abb. 7).

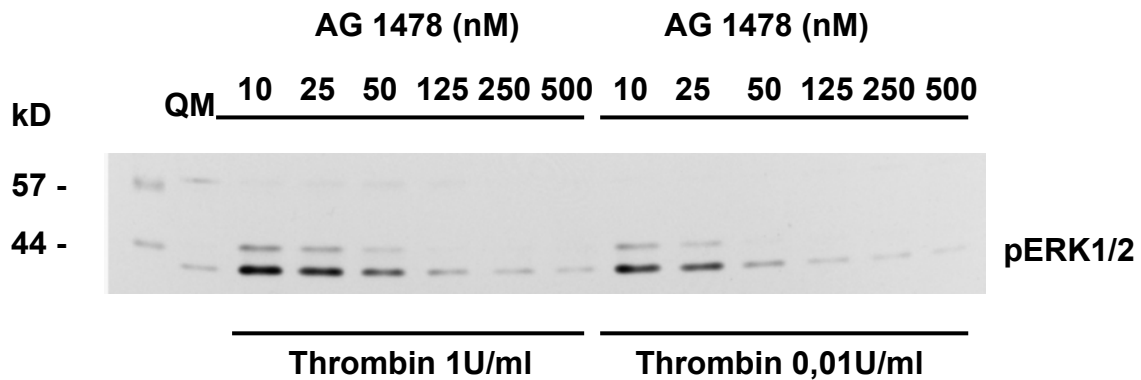


Abbildung 7. **Einfluß von AG 1478 auf die Thrombin-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung neonataler glatter Gefäßmuskelzellen.** Glatte Gefäßmuskelzellen wurden in 60 mm Platten subkultiviert und für 15 min mit 10 bis 500 nM AG 1478 inkubiert. Im Anschluß daran wurden die GMZ für 5 min mit 1 U/ml bzw. 0,01 U/ml Thrombin stimuliert. Danach erfolgte die Lyse der GMZ und deren Analyse mittels Immunoblots in denen der primäre Antikörper phosphoryliertes ERK1/2 detektiert. Zur Längenabschätzung der Banden wurde auf der ersten Spur ein biotinylierter Proteinmarker (New England BioLabs) zum Größenvergleich aufgetragen. Die gezeigte Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei vergleichbare Experimente.

Nach Thrombinstimulation kann durch steigende Konzentrationen des EGF-Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitors Tyrphostin AG 1478 das Phosphorylierungssignal von ERK1/2 reduziert beziehungsweise völlig verhindert werden. Bei höheren Konzentrationen von Thrombin werden entsprechend höhere Konzentrationen des EGF-Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitors benötigt, um das Phosphorylierungssignal vollständig zu unterdrücken.

Um unspezifische, Rezeptor-unabhängige Effekte der Serin-Protease Thrombin bei einer möglichen EGF-Rezeptor-Transaktivierung in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen auszuschließen, wurden Versuche mit einem Thrombin-Rezeptor aktivierenden Peptid (TRAP) durchgeführt, das mit dem intramolekularen „angeketteten“ Liganden des PAR1-Rezeptors korrespondiert. Dazu wurden in serumfreiem Medium wachstumssynchronisierte GMZ mit 250 ng/ml AG 1478 für

15 min inkubiert. Als Kontrolle dienten mit 1 ml serumfreiem Medium (QM) vorbehandelte Zellen. Nach Ablauf der Zeit wurden die glatten Gefäßmuskelzellen für 5 min mit 250 ng/ml AG 1478, 1 U/ml Thrombin, 50 µg/ml TRAP oder 1 ng/ml platelet-derived growth factor (PDGF, Thrombozyten-Wachstumsfaktor) stimuliert (Abb. 8).

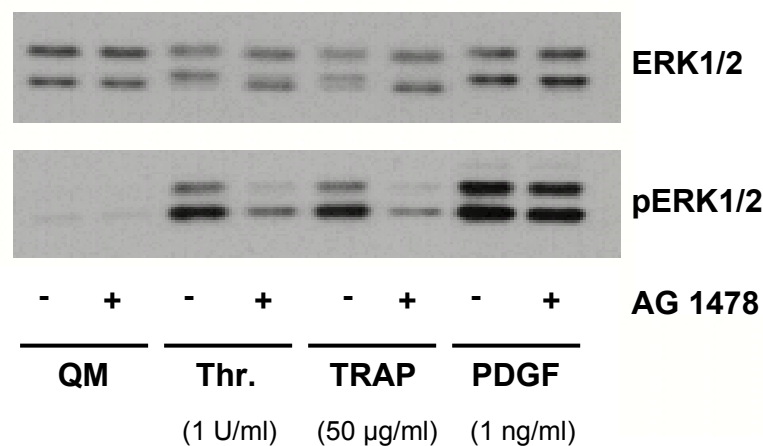


Abbildung 8. **Einfluß von AG 1478 auf die ERK1/2-Phosphorylierung in neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen.** Glatte Gefäßmuskelzellen wurden in 60 mm Platten subkultiviert und für 15 min mit 250 ng/ml AG 1478 inkubiert. Im Anschluß daran wurden die GMZ für 5 min mit 250 ng/ml AG 1478, 1 U/ml Thrombin, 50 µg/ml TRAP oder 1 ng/ml PDGF stimuliert. Danach erfolgte die Lyse der GMZ und deren Analyse mittels Immunoblots in denen der primäre Antikörper phosphoryliertes ERK1/2 detektiert. Zum Nachweis der exakten Proteinbeladung der Spuren wurden Immunoblots mit primären Antikörpern durchgeführt, die sowohl phosphoryliertes als auch unphosphoryliertes ERK1/2 detektieren. Die gezeigte Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei vergleichbare Experimente.

Mit AG 1478 vorbehandelte beziehungsweise nicht vorbehandelte und im Anschluß mit serumfreiem Medium (QM) stimulierte Zellen zeigen kein ERK1/2-Phosphorylierungssignal, während man bei den mit Thrombin stimulierten Zellen sehen kann, dass eine Vorbehandlung mit AG 1478 das ERK1/2-Phosphorylierungssignal signifikant reduzieren kann. Ebenso zeigt sich bei den mit

dem Thrombin-Rezeptor aktivierenden Peptid stimulierten glatten Gefäßmuskelzellen, dass eine Vorbehandlung mit EGF-Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren eine Phosphorylierung von ERK1/2 nahezu verhindern kann. Für die mit dem Thrombozyten-Wachstumsfaktor PDGF stimulierten Zellen zeigt sich kein Verlust des ERK1/2-Phosphorylierungssignals.