

4. Diskussion

4.1 Die phänotypische Modulation glatter Gefäßmuskelzellen

Differenzierte glatte Gefäßmuskelzellen (GMZ) sind hochspezialisierte Zellen, die ein zellspezifisches Repertoire an kontraktilen Proteinen, Ionenkanälen, Membranrezeptoren und Signaltransduktionsmolekülen exprimieren, die notwendig sind, um eine geordnete Kontraktion der Zelle zu ermöglichen. Glatte Gefäßmuskelzellen sind im Gegensatz zu Herzmuskel- oder Skelettmuskelzellen nicht terminal differenziert. Ihr Phänotyp kann sich unter dem Einfluß verschiedener Stimuli erheblich verändern. So ist die phänotypische Modulation vom „differenzierten“ hin zum „dedifferenzierten, synthetischen“ Phänotyp maßgeblich beteiligt an der Entstehung von Atherosklerose. Diese Modulationsprozesse sind gekennzeichnet durch eine Reduktion des Expressionsniveaus kontraktiler Proteine, wie der SM-MHC-Isoformen SM-1/SM-2, eine gesteigerte Proliferation sowie eine vermehrte Synthese extrazellulärer Matrixproteine (Owens, 1995; Schwartz et al., 1986).

Glatte Gefäßmuskelzellen innerhalb atherosklerotisch veränderter Plaques zeigen im Vergleich zu normalen glatten Gefäßmuskelzellen der Media Veränderungen in der Morphologie und im Proteinexpressionsmuster (Kocher und Gabbiani, 1986). Obwohl phänotypische Veränderungen glatter Gefäßmuskelzellen eine bedeutende Rolle während der Atherogenese spielen, ist nur wenig über die zugrundeliegenden Mechanismen und die daran beteiligten Faktoren bekannt. Durch welche Mechanismen wird die Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen gesteuert und wie sind diese bei vaskulären Erkrankungen verändert?

In dieser Arbeit sind Faktoren beschrieben, welche eine phänotypische Modulation glatter Gefäßmuskelzellen in Richtung „differenzierter“ Phänotyp induzieren. Der Serum-Bestandteil Thrombin induziert eine gegenüber Hungermedium (QM) 10-fach gesteigerte RNA-steady-state-Expression des

hochspezifischen Differenzierungsmarkern SM-1 und SM-2 (Reusch et al., 2001). Die gesteigerte Expression von SM-2 ist hierbei von besonderer Bedeutung, da dies ein sehr später Marker für die Entwicklung/Reifung glatter Gefäßmuskelzellen und gleichzeitig einer der ersten Marker ist, die verschwinden, wenn glatte Gefäßmuskelzellen ihren differenzierten Phänotyp *in vivo* wie auch *in vitro* verändern (Aikawa et al., 1993). Während zum einen gezeigt werden konnte, dass Thrombin kein signifikantes mitogenes Potential in unseren Zellen hat (Reusch, 2001), belegen die vorgelegten Daten sogar den Erhalt eines Differenzierungspotentials kultivierter glatter Gefäßmuskelzellen und identifizieren Thrombin als einen Faktor der *in vitro* eine Redifferenzierung glatter Gefäßmuskelzellen induzieren kann.

4.2 Einfluß von Thrombin auf die phänotypische Modulation glatter Gefäßmuskelzellen

In dieser Arbeit werden Rezeptor-gekoppelte Signalpfade charakterisiert, die zur Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen führen. Die Thrombin-induzierte Expression des Differenzierungsmarkers smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC) wird über die Ras/Raf/MEK/ERK-Signalkaskade vermittelt und führt zu einer biphasischen ERK1/2-Phosphorylierung. Dabei korreliert die Stärke der biphasischen ERK1/2-Phosphorylierung nach Thrombin-Stimulation mit der Steigerung der Aktivität des SM-MHC-Promotors (Reusch et al., 2001). Ausserdem konnte gezeigt werden, dass eine Koexpression von $G_{\beta\gamma}$ -Unterheiten die Aktivität des SM-MHC-Promotors steigern kann. Das läßt darauf schließen, dass eine Thrombin-induzierte Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen zum großen Teil über die $G_{\beta\gamma}$ -Unterheit des Rezeptors PAR1 vermittelt wird.

In wenigen Arbeiten wurde bisher eine phänotypische Modulation adulter glatter Gefäßmuskelzellen hin zum differenzierten, kontraktile Phänotyp beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass Vasokonstriktoren wie Angiotensin II oder Vasopressin die steady-state mRNA-Expression und die SM- α -Aktin-Protein-Expression steigern können (Geisterfer et al., 1988; Geisterfer et al., 1989; Turla et al., 1991; van Putten

et al., 1994). In beiden Fällen sind *cis*-Elemente, sogenannte CA_{RG}-Boxen, innerhalb des SM- α -Aktin-Promotors für die Liganden-induzierte Promotor-Regulation notwendig. Während der Großteil der oberhalb des SM-MHC-Promotors gelegenen Signalwege, die die Rezeptor-induzierte Expression kontraktiler Proteine in glatten Gefäßmuskelzellen regulieren noch unzureichend charakterisiert sind, konnte jedoch gezeigt werden, dass die gleichen Serum Response Faktor (SRF)-bindenden *cis*-Elemente die Promotoraktivität des SM-MHC-Promotors in glatten Gefäßmuskelzellen steigern (Madsen et al., 1997).

4.3 Dominant negatives N17-Ras und N17-Raf verhindern die Thrombin-induzierte SM-MHC-Promotor-Aktivierung.

Anhand der hier gezeigten Daten läßt sich demonstrieren, dass der Serumbestandteil Thrombin die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade in neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte aktiviert (siehe Abbildung 3). Dominant negatives N17-Ras und N17-Raf verhindern die Thrombin-induzierte SM-MHC-Promotor-Aktivierung. Das legt den Schluß nahe, dass eine intakte Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade für die Thrombin-induzierte SM-MHC-Promotor-Aktivierung und damit für die Differenzierung neonataler glatter Gefäßmuskelzellen benötigt wird.

Die Thrombin-induzierte Re-Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen korreliert mit der Aktivierung von ERK1/2 und kann durch eine heterologe Expression aktivierter Raf-Mutanten ausgelöst werden (Reusch, 2001). Die Kofransfektion mit dominant negativem N17-Ras oder N17-Raf wiederum vermindert die Thrombin-stimulierte CAT-Aktivität und damit die SM-MHC-Promotor-Aktivität konzentrationsabhängig. Das läßt vermuten, dass der Thrombin-induzierte Anstieg der SM-1/SM-2-Expression von einer intakten Ras/Raf/MEK/ERK-Signalkaskade abhängig ist.

4.4 Bedeutung von ERK1/2 in der Thrombin-induzierten Signalkaskade in neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen

Aktiviert extrazellulärsignal-regulierte Kinasen (ERK1/2) sind allein oder aber unter Mitaktivierung anderer MAP-Kinasen in der Lage die Expression kontraktile Proteine zu steigern. So 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, bisher unveröffentlicht). Die Aktivierung von ERK1/2 scheint daher sowohl ausreichend als auch notwendig für eine Rezeptor-vermittelte Differenzierung neonataler glatter Gefäßmuskelzellen zu sein.

Aktiviertes ERK1/2 ist an der Regulation der beiden zellulären Prozesse Proliferation und Differenzierung beteiligt. Diese Regulation ist abhängig von der Dauer der Aktivierung und dem zellulären Kontext (Marshall, 1995). Es konnte nachgewiesen werden, dass eine langanhaltende ERK-Aktivierung für die Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen notwendig ist (Reusch et al., 2001). Verschiedene Studien mit unterschiedlichen Zellsystemen, wie zum Beispiel Megakaryozyten, Thymozyten und PC-12-Zellen unterstützen die These, dass die Zeitdauer der ERK-Phosphorylierung festlegt, ob es zu einer Proliferation oder Differenzierung kommt (Racke et al., 1997; Crompton et al., 1996; Traverse, 1992).

Mehrere oberhalb der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade gelegene Signalwege führen nach der Aktivierung des Rezeptors zur ERK1/2-Phosphorylierung. Es wird vermutet, dass die biphasische Kinetik der ERK1/2-Aktivierung glatter Gefäßmuskelzellen nach Serum- oder Thrombin-Stimulation durch mindestens zwei voneinander unabhängige Signalpfade kontrolliert wird. Abbildung 9 zeigt ein Modell der möglichen nach Thrombin-Stimulation ablaufenden Signaltransduktionswege.

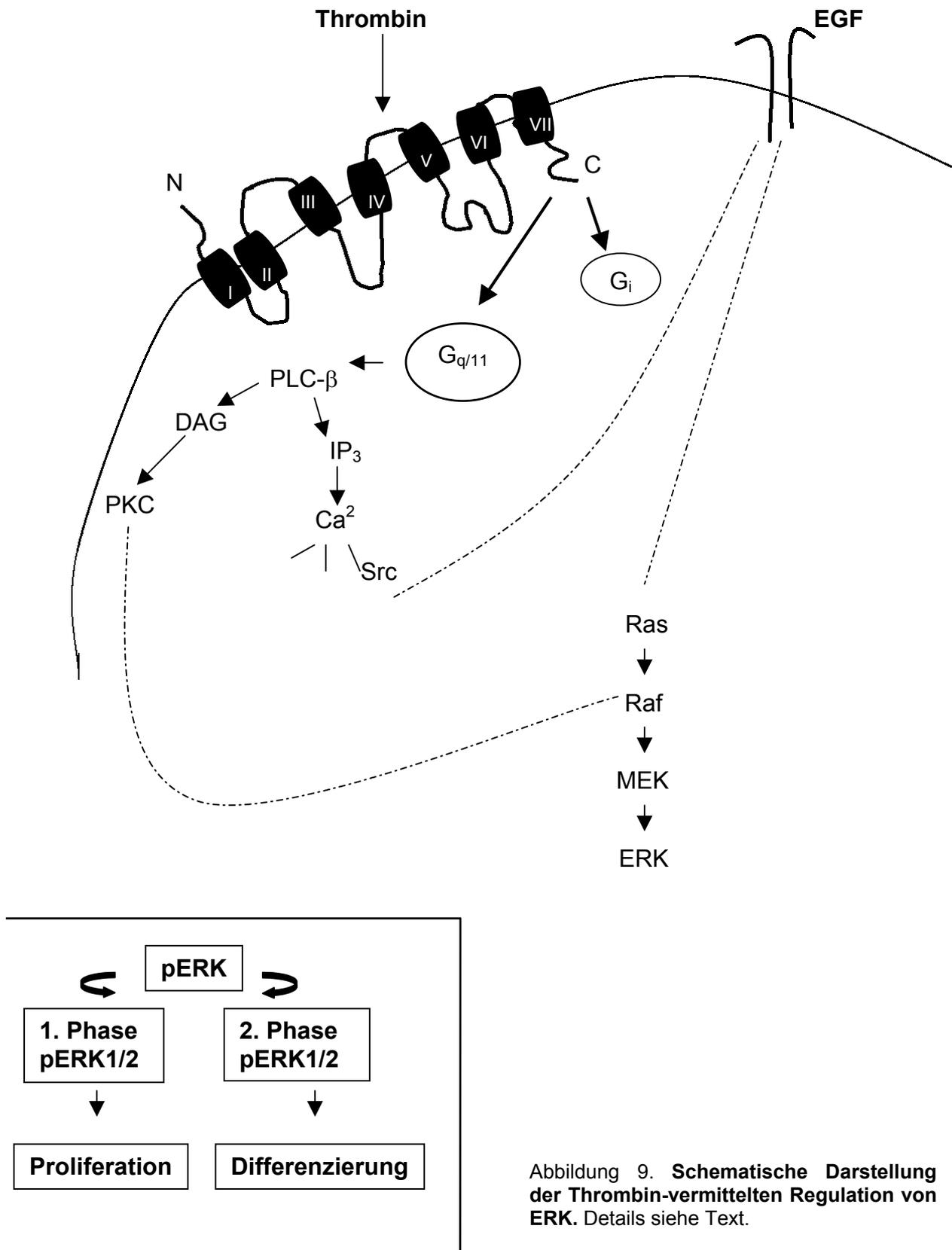


Abbildung 9. Schematische Darstellung der Thrombin-vermittelten Regulation von ERK. Details siehe Text.

Die frühe Phase der ERK1/2-Kinetik wird vermutlich durch starke Ca^{2+} -Signale hervorgerufen. Nach Thrombin-Stimulation glatter Gefäßmuskelzellen kommt es zu einer Aktivierung der Phospholipase $\text{C}\beta$. Diese aktiviert dann Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). Diese Substanzen führen zu einer Aktivierung der Proteinkinase C, gefolgt von einem starken Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Es wird vermutet, dass sich ein Ca^{2+} - und PKC-abhängiger Ras/Raf-Komplex formiert, der in der Lage ist, die ERK1/2-Phosphorylierung über die Ras/Raf/MEK-ERK-Kaskade zu initiieren (Kolch et al., 1993; Marais et al., 1998).

4.5 Beteiligung der Proteinkinase C an der Thrombin-induzierten ERK1/2-Aktivierung neonataler glatter Gefäßmuskelzellen

Als Proteinkinase C (PKC) bezeichnet man eine Gruppe von Kalzium- und Phospholipid-abhängigen Proteinkinase-Isoformen die an Signaltransduktionswegen beteiligt sind. Die PKC besteht aus einem Serin/Threonin-Proteinkinase-System mit einer großen Substratspezifität. Dieses Enzym wurde erstmals durch Nishizuka et al. (1979) beschrieben. PKC kommt ubiquitär vor und ist an der Regulation vieler biologischer Prozesse beteiligt (Haller et al., 1994).

Während die Beziehung zwischen PKC-Expression und Zelldifferenzierung in glatten Gefäßmuskelzellen noch wenig studiert wurde, konnte in einigen anderen Zellarten gezeigt werden, dass die Proteinkinase C eine bedeutende Rolle bei der Differenzierung spielt (Tamauchi et al., 1989). In HL 60-Zellen konnte eine Differenzierung durch Phorbolster, die die PKC aktivieren, induziert werden. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass HL 60-Zellen mit einem defekten PKC-Signalpfad durch Phorbolster nicht zur Differenzierung angeregt werden können (Slapak et al., 1993).

Um eine mögliche Beteiligung der Proteinkinase C an Thrombin-vermittelten Signalpfaden zu untersuchen die zur Differenzierung kultivierter neonataler GMZ der

Ratte führen, wurden Versuche mit einem Phorbolster durchgeführt. Phorbol-12-myristat-13-azetat (PMA) ist ein potenter Aktivator der PKC.

Wie vermutet, konnte eine Beteiligung der Proteinkinase C an der Thrombin-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung neonataler glatter Gefäßmuskelzellen nachgewiesen werden. Während nicht-stimulierte GMZ keine bedeutende ERK1/2-Phosphorylierung zeigten, konnte durch Thrombin-Stimulation die ERK1/2-Aktivierung signifikant gesteigert werden. Durch 24-stündige Vorbehandlung mit PMA konnte die ERK1/2-Phosphorylierung signifikant vermindert werden (siehe Abbildung 4a). Eine deutliche Abschwächung des Phosphorylierungssignals konnte in der zweiten, verspäteten Phase nach Thrombin-Stimulation detektiert werden. Da in der zweiten, verspäteten Phase der Thrombin-Kinetik in glatten Gefäßmuskelzellen hauptsächlich Signale übertragen werden, die die Differenzierung induzieren können, weist diese Tatsache möglicherweise auf die Notwendigkeit eines intakten PKC-Signalpfades bei der Differenzierung neonataler glatter Gefäßmuskelzellen hin. Um diese Daten zu bestätigen, wurden weitere Versuche zur Proteinkinase C durchgeführt. Dazu wurde Bisindolylmaleimid (BIM), ein pharmakologischer PKC-Inhibitor dem Phorbolster PMA gegenübergestellt (siehe Abbildung 4c). Für 5 min mit Thrombin stimulierte Zellen zeigten trotz Inhibition durch BIM und Inaktivierung durch PMA ERK1/2-Aktivierung. Dagegen zeigten für 120 min mit Thrombin behandelte Zellen eine deutliche Verminderung des ERK1/2-Phosphorylierungssignales nach Vorbehandlung mit Inhibitoren. Das läßt vermuten, dass nach 5 minütiger Thrombin-Stimulation eine ERK-Aktivierung unter Umgehung der Proteinkinase C möglich ist. Die späte Phase der ERK1/2-Kinetik nach Stimulation mit Thrombin korreliert mit der Steigerung der Transkription des SM-MHC-Promotors und weist auf eine Differenzierung neonataler glatter Gefäßmuskelzellen hin. Zusammengefaßt zeigen diese Daten, dass die Proteinkinase C wenigstens zum Teil an der Thrombin-vermittelten Signalkaskade beteiligt ist, die zur Differenzierung neonataler, glatter Gefäßmuskelzellen führt.

Diese Vermutung wird gestützt durch die von Haller et al. publizierten Ergebnisse, die zeigen, dass die Aktivität und Expression der Gesamt-PKC und der Isoform PKC- α in dedifferenzierten, proliferativen GMZ signifikant niedriger,

verglichen zu serumfreien, konfluenten GMZ ist. Jedoch wird die Rolle der Proteinkinase C in neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen weiterhin kontrovers diskutiert. So konnten Kanda et al. (2001) zeigen, dass eine Thrombin-induzierte p38MAPK-Aktivierung sowohl über PKC-abhängige als auch über PKC-unabhängige Signalpfade vermittelt wird. Dagegen zeigten frühere Studien, dass eine Angiotensin II-induzierte MAPK-Aktivierung in GMZ durch PKC-Inhibitoren unterdrückt werden konnte (Li et al., 1998), während eine Bradykinin-induzierte Aktivierung in COS-7 Zellen unabhängig von der Proteinkinase C erfolgt (Adomeit et al., 1999). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz sind die Beteiligung unterschiedlicher PKC-Isoformen und die Analyse verschiedener Zelltypen.

4.6 Die ERK1/2-Phosphorylierung neonataler glatter Gefäßmuskelzellen nach Thrombin-Stimulation ist abhängig von Src

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung verschiedener G-Protein-gekoppelter mitogener Signalwege in glatten Gefäßmuskelzellen abhängig ist von einer Tyrosin-Phosphorylierung verschiedener Signalproteine, wie Src, Ras, Raf und den MAP-Kinasen. Da G-Proteine keine intrinsische Tyrosin-Kinase-Aktivität besitzen, ist die Aktivierung dieser Signalwege abhängig von der Rekrutierung zytosolischer Tyrosinkinasen. Es wird daher angenommen, dass zytosolische Src-ähnliche Tyrosinkinasen existieren, die verantwortlich sind für die Übertragung früher Signale, nach Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren.

Einige Arbeiten belegen, dass die Tyrosin-Kinase pp60^{c-src} (Src) und die kleine GTPase p21^{ras} (Ras) entscheidend an der physiologischen Regulation von Proliferation und Differenzierung verschiedener Zellarten beteiligt sind (Indolfi et al., 1995; Ma et al., 1996; Schieffer et al., 1996). Schieffer et al. (1997) konnten zeigen, dass Src in aortalen glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte signifikant an einer GPCR-induzierten Proliferation nach Thrombin-Stimulation beteiligt ist. Dagegen ist über die Bedeutung von Src und Ras an der Differenzierung neonataler glatter Gefäßmuskelzellen nach Thrombin-Stimulation noch wenig bekannt.

Um die Bedeutung von Src an der Thrombin-induzierten Differenzierung neonataler glatter Gefäßmuskelzellen zu bestimmen, analysierten wir den Einfluß von PP2, einem selektiven Inhibitor von Tyrosinkinase der Src-Familie. Nach 30-minütiger Vorbehandlung mit PP2 wurden die Zellen für 5 Minuten mit Thrombin stimuliert. Ein möglicher Einfluß auf das Phosphorylierungssignal wurde wiederum mit Immunoblots gegen pERK1/2 nachgewiesen. Der für diese Experimente repräsentative Immunoblot (siehe Abbildung 5), zeigt ein vermindertes ERK1/2-Phosphorylierungssignal für die mit steigenden Konzentrationen an PP2 vorbehandelten GMZ. Dieses Experiment kann als Hinweis für eine Beteiligung von Src am Signaltransduktionssystem neonataler glatter Gefäßmuskelzellen nach Thrombin-Stimulation dienen.

Weitere Experimente mit dem Src-Inhibitor erfolgten, um sowohl den Einfluß der späten Phase nach Thrombin-Stimulation, als auch einer Stimulation mit EGF und PMA auf das Phosphorylierungssignal zu analysieren (siehe Abbildung 6). Für 120 Minuten mit Thrombin stimulierte Zellen zeigen, vergleichbar mit 5 minütiger Stimulation (siehe Abbildung 5) einen deutlichen Verlust des pERK-Signals nach PP2-Vorbehandlung.

Die gezeigten Daten bestätigen unsere Vermutung, dass die Tyrosin-Kinase Src an der Differenzierung neonataler glatter Gefäßmuskelzellen der Ratte nach Thrombin-Stimulation beteiligt ist. Es besteht jedoch noch wenig Erkenntnis über die genauen Mechanismen, die an der Übertragung des Signals von Src auf die MAPK-Kaskade beteiligt sind. Es wird vermutet, dass Src direkt Ras phosphorylieren und aktivieren kann (Schieffer et al., 1997). Aktiviertes Ras scheint daraufhin einen Membran-gebundenen Komplex mit Raf-1 zu formen, welcher dann den MAPK-Signalfaden aktiviert. Es wird vermutet, dass auf diesem Wege zumindest proliferative Signale von der Plasmamembran durch das Zytoplasma in den Zellkern transduziert werden.

In Abbildung 6 ist für die Stimulation der GMZ mit EGF gezeigt, dass trotz Vorbehandlung der Zellen mit PP2, ein deutliches pERK1/2-Signal detektierbar war. Das läßt vermuten, dass in unserem Zellsystem die EGF-Signaltransduktion auf die MAP-Kinase-Kaskade wenigstens zum Teil unter Umgehung von Src geschieht.

Das ist übereinstimmend mit den von Fager (1995) veröffentlichten Ergebnissen zu sehen, die zeigen, dass in glatten Gefäßmuskelzellen bei direkter Stimulation klassischer Wachstumsfaktor-Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität kein zytosolisches Src benötigt wird, um unterhalb von Src-gelegene proliferative Signale zu übermitteln. Unsere Ergebnisse liefern Hinweise, dass dies auch für Signale gilt, die an der Differenzierung neonataler glatter Gefäßmuskelzellen beteiligt sind. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Src in GPCR-Signalprozessen benötigt wird, die zur Aktivierung der p38 MAPK führen (Nagai et al., 1998). Weiterhin konnte eine Src-Aktivierung durch Thrombin in A10 Zellen bewiesen werden (Kanda et al., 2001).

4.7 Der EGF-Rezeptor ist an der Thrombin-vermittelten ERK1/2-Aktivierung neonataler glatter Gefäßmuskelzellen beteiligt

Da gezeigt werden konnte, dass die ERK-Aktivierung nach Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren Tyrosin-Kinase-Aktivität benötigt (Wan et al., 1996), konzentrierten wir uns auf die mögliche Beteiligung von Tyrosinkinasen an der PAR1-vermittelten ERK1/2-Aktivierung in glatten Gefäßmuskelzellen.

So konnte in COS-7 Zellen eine Transaktivierung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGF-Rezeptor) nach Aktivierung $G_{q/11}$ - und G_i -gekoppelter Rezeptoren mit nachfolgender Aktivierung des MAPK-Signalpfades nachgewiesen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der Src-Kinase durch zelluläre Expression dominant negativer Src-Mutanten die $G\beta\gamma$ -Untereinheit-vermittelte Phosphorylierung des EGF-Rezeptors und des Shc-Adapter-Proteins verhindern kann. Es wird daher vermutet, dass die Transaktivierung des EGF-Rezeptors auch eine Bedeutung bei der ERK1/2-Aktivierung über GPCR in neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen haben könnte.

Um die Beteiligung des EGF-Rezeptors an der Thrombin-vermittelten ERK1/2-Aktivierung nachzuweisen, wurden Experimente mit Tyrphostin AG 1478, einem EGF-Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitor durchgeführt. Mit steigenden

Konzentrationen von AG 1478 vorbehandelte neonatale glatte Gefäßmuskelzellen wurden im Anschluß mit Thrombin stimuliert. Dabei konnte eine konzentrationsabhängige Verminderung beziehungsweise völlige Aufhebung des ERK1/2-Phosphorylierungssignals nachgewiesen werden. Diese in Abbildung 7 dargestellten Daten legen den Schluß nahe, dass in neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen eine Stimulation des PAR1-Rezeptors durch Thrombin zu einer bisher noch nicht näher erklärten Transaktivierung des EGF-Rezeptors führt. Weiterhin lassen diese Daten vermuten, dass die Transaktivierung des EGF-Rezeptors entscheidend an der Signalübertragung auf den MAP-Kinase-Pfad beteiligt ist.

Noch unvollständig geklärt ist der Mechanismus der Transaktivierung. Eine Schlüsselrolle scheint dabei die Src-Kinase zu spielen. Luttrell et al. (1997) konnten zeigen, dass eine Inhibition der endogenen Src-Kinasen sowohl die GPCR-vermittelte EGF-Rezeptor-Phosphorylierung als auch die Bindung des EGF-Rezeptors an die Src-bindende SH2-Domäne verhindert. Diese Daten lassen ebenso vermuten, dass Src-Kinasen nach Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren direkt an den EGF-Rezeptor koppeln und diesen phosphorylieren.

Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit der über die $G\beta\gamma$ -Untereinheit vermittelten Ras-abhängigen MAPK-Aktivierung zu sehen, die Luttrell et al. (1997) veröffentlicht haben. Die $G\beta\gamma$ -Untereinheit-abhängige Src-Aktivierung wird darin als ein frühes Ereignis nach der Stimulation von G_i -gekoppelten Rezeptoren beschrieben. Nach Aktivierung vermitteln Src-Kinasen eine Phosphorylierung intrazellulärer Effektoren. Darin eingeschlossen sind unter anderem Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und Adapterproteine wie Shc. Diese phosphorylierten Proteine dienen dann als Andockstellen für SH2-Domänen der Shc- und Grb2-Adaptermoleküle. Daraufhin werden Ras-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren und andere potentielle Komponenten des mitogenen Signalkomplexes an der Plasmamembran bereitgestellt. Die Aktivierung von Ras wiederum, führt zur Bereitstellung der Raf-Kinase an der Membran und initiiert die Phosphorylierung der Signalkaskade die zur MAP-Kinase-Aktivierung führt. Abhängig vom Zelltyp konnte gezeigt werden, dass die G-Protein gekoppelten Rezeptoren für AT II, LPA und

Thrombin eine Liganden-unabhängige Phosphorylierung verschiedener Wachstumsfaktor-Rezeptoren, so auch des EGF-Rezeptors vermitteln können (Daub et al., 1996). Die Erkenntnis, dass verschiedene Rezeptor-Tyrosin-Kinasen eine GPCR-vermittelte Phosphorylierung durchlaufen, läßt die Existenz eines gemeinsamen Mechanismus vermuten. Dabei wird davon ausgegangen, dass dieser Mechanismus nicht Rezeptor-Tyrosin-Kinase-spezifisch geschieht. Vorstellbar wäre dies zum Beispiel durch die Aktivierung einer Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinase oder durch die Inhibierung einer Phosphotyrosin-Phosphatase.

Unsere gezeigten Daten stimmen überein mit den von Daub et al. veröffentlichten Ergebnissen (1996), in denen gezeigt werden konnte, dass in Rat1-Zellen durch Vorbehandlung mit EGF-Rezeptor-selektivem AG 1478 oder durch Expression eines mutierten dominant negativen EGF-Rezeptors eine EGF-Rezeptor-Phosphorylierung und MAPK-Aktivierung nach Endothelin-, LPA- oder Thrombin-Stimulation verhindert werden kann. Daub et al. vermuteten, dass eine Liganden-unabhängige Transaktivierung der EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase verantwortlich für die GPCR-vermittelte Tyrosin-Phosphorylierung sei.

Neuere Ergebnisse (Luttrell et al., 1997) lassen jedoch vermuten, dass eine Aktivierung der Src-Kinasen durch G_i -gekoppelte Rezeptoren für die Tyrosin-Phosphorylierung sowohl des EGF-Rezeptors als auch des Shc-Adapter-Proteins in COS-7 Zellen verantwortlich ist. Die Tatsache, dass eine Inhibition der endogenen Src-Kinase-Aktivität die durch G_i -gekoppelte Rezeptoren vermittelte Phosphorylierung des EGF-Rezeptors blockieren kann, läßt vermuten dass die Src-Kinase-Aktivierung der Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Aktivierung vorangeht, schließt jedoch nicht aus, dass die Aktivität der RTK durch die Src-vermittelte Phosphorylierung ausschließlich moduliert wird. Diese Aussage wird durch die Tatsache gestützt, dass in vielen Experimenten unter Verwendung monoklonaler Antikörper die eine c-Src-Vermittlung nachweisen können, bisher noch nicht nachgewiesen werden konnte, dass es nach einer Überexpression von $p60^{c-src}$ oder Stimulation G_i -gekoppelter Rezeptoren zu einer gesteigerten EGF-Rezeptor-Autophosphorylierung kommt (Luttrell et al., 1997).

Noch unbekannt ist der Mechanismus durch welchen Effektoren aktivierter G-Protein-gekoppelter Rezeptoren Src-Kinasen stimulieren. In einigen Zellreihen scheint eine Stimulation der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) eine Rolle in der Ras-abhängigen MAP-Kinase-Aktivierung zu spielen. Verschiedene Experimente führten zu der Annahme, dass der PI3K-abhängige Schritt im MAPK-Pfad oberhalb der Src-Kinase liegen muß. Denn trotz Applikation verschiedener PI3K-Inhibitoren in neutrophilen Leukozyten und Thrombozyten konnte eine Stimulation von transient exprimiertem p60^{c-src} ein Phosphorylierungssignal von Ras und der MAP-Kinase produzieren (Hawes et al., 1996). Der Nachweis, dass die c-Src SH2-Domäne mit hoher Affinität an Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphat, dem Produkt von PI3K, bindet, kann als eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen dienen (Luttrell et al., 1997).

Ebenfalls scheint an der Regulation der Src-Kinase-Aktivität, eine Interaktion zwischen Src-Kinasen und durch G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten regulierte Non-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen beteiligt zu sein. So konnte in neuronalen Zellen nachgewiesen werden, dass G_q-gekoppelte Rezeptoren die Ca²⁺ und PKC-abhängige Tyrosin-Kinase PYK2 stimulieren. PYK2 ist ein Mitglied der Familie der fokalen Adhäsionskinasen und kann nach Stimulation Komplexe mit aktiviertem Src bilden (Dikic et al., 1996).

Kanda et al. (2001) konnten zeigen, dass eine Thrombin-induzierte EGF-Rezeptor-Transaktivierung durch die G-Proteine G_q oder G₁₂ vermittelt wird, während weiterhin unklar ist, welche G-Proteine benötigt werden um den EGF-Rezeptor durch Thrombin-Stimulation direkt zu aktivieren. Weitere Studien konnten zeigen dass die Stimulation von G_q durch AT II eine EGF-Rezeptor-Transaktivierung in GMZ verursacht (Eguchi et al., 1998). Zusätzlich wurde bewiesen dass G₁₃, jedoch nicht G₁₂ verantwortlich ist für die Signalübertragung vom LPA-Rezeptor über den EGF-Rezeptor zu Rho (Gohla et al., 1998).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass sowohl die Familie der Src-Kinasen als auch die der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wie EGF in verschiedenen Zellsystemen, eine zentrale Rolle an der Verteilung der Signale Membran-assoziiierter Signalkomplexe als Antwort auf die Aktivierung G-Protein-gekoppelter

Rezeptoren darstellen. Ein Verständnis der Mechanismen die zur Phosphorylierung von Effektoren nach Stimulation G-Protein gekoppelter Rezeptoren führen und das Verständnis möglicher Cross-Talks zwischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Signalwegen könnten Möglichkeiten aufbieten, zelluläre Differenzierung zu aktivieren und Dedifferenzierung und unerwünschte Proliferation zu inhibieren.