

## 1. Einleitung

Atherosklerose und ihre Komplikationen, zu denen im besonderen Myokard- und Zerebralinfarkte gehören, zählen zu den häufigsten Todesursachen in den westlichen Ländern. Eine bedeutende Rolle in der Entwicklung der Atherosklerose spielen gesteigerte Wachstumsraten und Veränderungen im Differenzierungsgrad glatter Gefäßmuskelzellen (GMZ), welche zum Beispiel auf ständige mechanische Belastung, bedingt durch einen Bluthochdruck zurückzuführen sind. Atherosklerotisch veränderte GMZ wandern dabei aus der Media der Gefäßwand in die Innenschicht (Intima), beginnen dort zu proliferieren und können durch ihre Größenausdehnung das Lumen des Gefäßes verengen (Ross und Glomset, 1976; Schwartz und Ross, 1984).

Derart veränderte Zellen befinden sich im dedifferenzierten Zustand. In glatten Gefäßmuskelzellen unterscheidet man einen dedifferenzierten, „proliferativen“ oder auch „sekretorischen“ Phänotyp von einem differenzierten, „kontraktilen“ Phänotyp. Diese Plastizität der Veränderung des Phänotyps glatter Gefäßmuskelzellen in Abhängigkeit von Umgebungsbedingungen und mechanischer Belastung nennt man phänotypische Modulation. Diese ist Gegenstand der Forschung, um die verschiedenen Einflüsse auf die zellulären und molekularen Mechanismen zu verstehen, die die Differenzierung und Dedifferenzierung glatter Gefäßmuskelzellen bedingen.

Die Hauptfunktion glatter Gefäßmuskelzellen ist Kontraktion. Voraussetzung für Kontraktion ist der differenzierte Zustand glatter Gefäßmuskelzellen. Differenzierte glatte Gefäßmuskelzellen in der Media adulter Gefäße wachsen nur in extrem geringem Umfang und produzieren nur geringe Mengen extrazellulärer Matrixproteine. Diese Prozesse werden massiv beschleunigt nach Gefäßverletzungen oder während der Atherogenese (Owens, 1995). Differenzierte glatte Gefäßmuskelzellen sind charakterisiert durch eine starke Expression kontraktiler Proteine, wie zum Beispiel die für glatte Gefäßmuskelzellen spezifischen schweren Ketten des Myosins (smooth muscle myosin heavy chain, SM-MHC).

Es werden zwei Isoformen von SM-MHC, SM-1 (204 kD) und SM-2 (200 kD) unterschieden. Beide Protein-Isoformen sind Produkte eines alternativen mRNA-„splicing“-Prozesses am 3'-Terminus des primären Transkriptes, welches von einem einzelnen Gen codiert wird und beim Menschen auf Chromosom 16q12 lokalisiert ist (Babij und Periasamy, 1989). Die Expression der SM-MHC-Isoformen SM-1 und SM-2 ist auf glatte Gefäßmuskelzellen begrenzt und in proliferierenden Zellen reduziert (Miano et al., 1994). Hohe Expressionsgrade von SM-1/2 charakterisieren daher den differenzierten Phänotyp glatter Gefäßmuskelzellen (Owens, 1995).

In primärer Zellkultur durchlaufen neonatale glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte eine phänotypische Modulation vom differenzierten, „kontraktilen“ Phänotyp hin zum dedifferenzierten, „proliferativen“ Status und sind durch ein reduziertes Expressionsniveau von SM-MHC gekennzeichnet. Dieser Vorgang ist vergleichbar mit den phänotypischen Modulationsprozessen in neointimalen Zellen, die während der atherosklerotischen Entwicklung zu beobachten sind (Thyberg et al., 1990). Die typischen Veränderungen im Expressionsniveau der Myosin-Isoformen kultivierter GMZ hängen von der Zelldichte, der Serum- oder anderer Mitogenkonzentration im Kulturmedium und der Komposition der extrazellulären Matrix ab (Thyberg et al., 1990; Frid et al., 1993). Applikation von Agonisten und geeignete Zellkulturbedingungen führen zu einer gesteigerten Expression kontraktiler Proteine, wie  $\alpha$ -Aktin oder SM-MHC (Bachhuber et al., 1995). Diese Ergebnisse zeigen, dass kultivierte neonatale glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte ihre Fähigkeit zur Differenzierung behalten, wenn die dazu nötigen Kulturbedingungen geschaffen werden. Sie können somit als *in vitro*-Modell dienen, um die phänotypischen Modulationsprozesse zu studieren, die während Gefäßkrankheiten ablaufen.

Um neonatale glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte in Zellkultur zu kultivieren, ist das Vorhandensein von Serum im Medium eine wesentliche Voraussetzung. Zusätzlich zu seinen wachstumssteigernden Eigenschaften kann fötales Kälberserum die Expression kontraktiler Proteine in neonatalen GMZ der Ratte induzieren. Reusch et al. (2001) konnten zeigen, dass die Expression der SM-MHC-Isoformen SM-1/2 durch 2-3-tägige Serumstimulation gesteigert und durch Serumentzug innerhalb von 48 Stunden wieder auf 20% des vorherigen Expressionsgrades reduziert werden

kann. Das weist darauf hin, dass im Serum Substanzen enthalten sein müssen, die *in vitro* eine Redifferenzierung neonataler GMZ der Ratte induzieren können.

Im Serum sind eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, vasoaktiven Peptiden und anderen Agonisten enthalten, die ihre Wirkung über die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege entfalten. Um die Differenzierung neonataler glatter Gefäßmuskelzellen der Ratte charakterisieren zu können, ist es nötig herauszufinden, welche Einzelkomponenten des Serums, und welche Rezeptor-gekoppelten Signaltransduktionswege an der gesteigerten Expression der SM-MHC beteiligt sind.

Dazu wurden in RNase-Protection-Assays verschiedene Komponenten des fötalen Kälberserums untersucht. So konnte nachgewiesen werden, dass weder Angiotensin II noch rekombinanter Thrombozyten-Wachstumsfaktor (platelet-derived growth factor, PDGF-BB) die SM1/2-Expression signifikant veränderten. Dagegen führte Stimulation neonataler glatter Gefäßmuskelzellen mit 1 U/ml Thrombin zu einer Hochregulation der Transkription der SM-MHC Isoformen SM-1/2 (Reusch et al., 2001). Die Serin-Protease Thrombin ist der bedeutendste physiologische Aktivator der Thrombozytenaggregation und ein wichtiger Agonist für eine Vielzahl von biologischen Reaktionen wie Entzündungen oder reparative Prozesse nach Gefäßverletzungen (Shuman, 1986).

## **1.1 Signalübertragungen in der Zelle**

Die Kommunikation zwischen individuellen Zellen ist eine wichtige Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der Homöostase eines Organismus. Informationen in Form chemischer oder physikalischer Signale können von Zellen über spezifische Rezeptoren detektiert und in zelluläre Antworten umgesetzt werden.

Bei einem Großteil der bekannten Rezeptoren handelt es sich um transmembranäre Proteine, die durch Bindung des Liganden an die extrazelluläre Seite des Rezeptors aktiviert werden. Die Mehrzahl membrandurchspannender Rezeptoren koppelt an heterotrimere Guaninnukleotid-bindende Proteine

(G-Proteine), welche die Aktivität verschiedener Effektoren wie Enzyme und Ionenkanäle beeinflussen können. Die Regulation der Aktivität dieser Effektormoleküle führt zu schnellen Veränderungen von „second messenger“-Konzentrationen wie z.B. cAMP, Inositolphosphaten, Diazylglyzerol (DAG) oder zytosolischen Ionenkonzentrationen, wodurch eine zelluläre Antwort ausgelöst wird.

Die über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren regulierten zellulären Funktionen reichen von kurzfristigen Effekten wie der Regulation metabolischer Prozesse bis hin zu langfristigen Effekten wie Proliferation und Differenzierung.

## **1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren**

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) stellen die größte Gruppe der Zelloberflächen-Rezeptoren dar. Mehrere hundert Typen, Subtypen und Isoformen von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind während der letzten zehn Jahre identifiziert worden (Watson und Arkinstall, 1994). Thrombin stimuliert ebenfalls einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, den sogenannten Protease-aktivierten Rezeptor (PAR). Bisher sind vier verschiedene Protease-aktivierte Rezeptoren PAR1 bis PAR4 identifiziert worden, wobei Thrombin hauptsächlich PAR1 aktiviert. Wie alle Mitglieder dieser Rezeptorenklasse überträgt der Rezeptor PAR1 seine intrazellulären Signale über Guaninnukleotid-Regulator-Proteine (GNRP).

Es gibt Hinweise, dass einige GPCR nur mit einer einzigen G-Protein-Spezies interagieren können. Die meisten Rezeptoren, so auch der Thrombin-Rezeptor PAR1, koppeln aber an mehr als einen G-Protein-Subtyp und führen somit zur parallelen Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege. Thrombin-Rezeptoren in glatten Gefäßmuskelzellen können G-Proteine der  $G_i$ -, der  $G_q$ - und der  $G_{12/13}$ -Subfamilie aktivieren (Offermanns et al., 1994).

### 1.2.1 Der Thrombinrezeptor

Beim Vergleich der Primärstruktur von bekannten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) fällt ein prinzipiell gleiches Bauprinzip dieser Proteine auf, nämlich sieben hydrophobe, 20-25 Aminosäuren lange Abschnitte, die eine  $\alpha$ -helicale Struktur haben und die Membran durchspannen. Die transmembranären Helices (TM 1-7) sind durch alternierende extra-(e1-e3) und intrazelluläre (i1-i3) Peptidschleifen miteinander verbunden. An der ersten transmembranären Helix befindet sich der extrazellulär gelegene Amino-Terminus. Der intrazelluläre Carboxy-Terminus befindet sich an der siebten Helix. Die Aktivierung des Protease-aktivierten-Rezeptors (PAR-1) geschieht durch eine Rezeptor-Ligand-Interaktion, bei der die aktive Stelle von Thrombin mit dem extrazellulären Amino-Terminus des Rezeptors interagiert (Abb. 1). Thrombin schneidet die Peptidbindung zwischen den Rezeptorresiduen Arg-41 und Ser-42, spaltet dabei den Rezeptor und präsentiert einen neuen Amino-Terminus mit der Aminosäuresequenz SFLLRN. Der neue Amino-Terminus wird als Thrombin-Rezeptor-aktivierendes-Peptid (TRAP) bezeichnet und wirkt als angeketteter Ligand. Dabei bindet er an intramolekulare Domänen des Rezeptors und bewirkt dadurch die transmembranäre Signalweiterleitung (Coughlin, 1999).

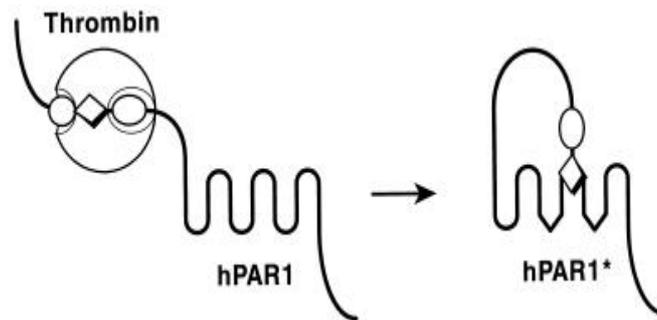


Abb. 1 **Mechanismus der PAR1-Aktivierung.** Thrombin (großer Kreis) erkennt die Amino-terminale Exodomäne des G-Protein-gekoppelten Rezeptors PAR1. An dieser Interaktion sind sowohl die Amino-terminale (kleiner Kreis) als auch die Carboxy-terminale (kleines Oval) Domäne der Thrombin-Schnittstelle beteiligt. Thrombin zerschneidet die Peptidbindung zwischen den Rezeptorresiduen Arg-41 und Ser-42. Dabei spaltet Thrombin den Rezeptor und präsentiert einen neuen Amino-Terminus mit der Aminosäuresequenz SFLLRN. Dieser Amino-Terminus wird als Thrombin-Rezeptor-aktivierendes-Peptid (TRAP) bezeichnet und wirkt als angeketteter Ligand. Dabei bindet er an intramolekulare Domänen des Rezeptors und bewirkt dadurch die transmembranäre Signalweiterleitung (aus Shaun R. Coughlin: How the protease thrombin talks to cells. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11023-11027).

### 1.3 Struktur und Funktion von heterotrimeren G-Proteinen

Heterotrimere G-Proteine bestehen aus einer  $\alpha$ -Untereinheit, die GTP bindet und hydrolysiert, sowie je einer  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit (Hepler und Gilman, 1992; Neer, 1995; Gudermann et al., 1996).

Die  $\alpha$ -Untereinheit weist strukturelle und funktionelle Homologien zu anderen Mitgliedern der Superfamilie Guaninnukleotid-bindender Proteine auf. Die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine werden als funktionelle Einheit angesehen, da sie einen unter *in vivo*-Bedingungen undissoziierbaren Komplex bilden.

Im inaktiven Zustand ist der  $\beta\gamma$ -Komplex mit der GDP-gebundenen  $\alpha$ -Untereinheit assoziiert. In dieser Form kann das G-Protein von einem geeigneten aktivierten Rezeptor erkannt werden, der an das Heterotrimer bindet und die GDP-Dissoziation von der  $\alpha$ -Untereinheit des heterotrimeren Proteins bewirkt. Dabei wird GDP durch GTP ersetzt. Die Bindung von GTP induziert eine Konformationsänderung der  $\alpha$ -Untereinheit. Dies führt dazu, dass die  $\alpha$ -Untereinheit einerseits vom Rezeptor und andererseits vom  $\beta\gamma$ -Komplex dissoziiert. Die GTP-gebundene  $\alpha$ -Untereinheit sowie der  $\beta\gamma$ -Komplex sind nun in der Lage, mit Effektorproteinen zu interagieren. Eine der G-Protein- $\alpha$ -Untereinheit eigene GTPase-Aktivität führt zur Beendigung der G-Protein-Aktivierung. Das aus der Hydrolyse von GTP entstehende GDP bleibt an der  $\alpha$ -Untereinheit gebunden, die nun mit dem  $\beta\gamma$ -Komplex reassoziert. Diese durch die GTP-Hydrolyse ausgelöste Reassoziations zum Heterotrimer stellt den entscheidenden Inaktivierungsmechanismus dar.

#### 1.4 G-Protein-regulierte Effektoren

Prinzipiell scheint die Interaktion von G-Proteinen und Effektoren spezifischer als die Interaktion von Rezeptoren mit G-Proteinen zu verlaufen. Die molekulare Klonierung einer Vielzahl G-Protein-regulierter Effektoren hat gezeigt, dass oft verschiedene Isoformen bestimmter Effektoren existieren, die eine spezifische Gewebeexpression aufweisen und differentiell durch G-Protein- $\alpha$ -Untereinheiten und/oder G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten reguliert werden können (Gohla et al., 1998).

Bisher konnten mindestens fünf Familien von Enzymen, die Phospholipase C-Aktivität besitzen, identifiziert werden. Diese wurden initial nach Vorkommen, Größe und Wirkung beschrieben und mit  $\alpha$  bis  $\varepsilon$  bezeichnet.

Die Phospholipase C- $\beta$ -Familie war die erste, bei der eine Regulation durch G-Proteine nachgewiesen werden konnte (Sternweis und Smrcka, 1992). Die verschiedenen Isoformen der Phospholipase C- $\beta$  besitzen charakteristische Muster hinsichtlich ihrer Regulation durch G-Proteine. So können alle bekannten Isoformen

der Phospholipase C- $\beta$  durch Mitglieder der Pertussis-Toxin-insensitiven  $G_{\alpha q}$ -Familie der G-Proteine stimuliert werden (Taylor et al., 1991; Lee et al., 1992; Smrcka und Sternweis, 1993; Jiang et al., 1994). Dagegen erfolgt die Pertussis-Toxin-sensitive Regulation der Phospholipase C- $\beta$  über  $\beta\gamma$ -Untereinheiten aus Mitgliedern der  $G_{i/o}$ -Familie (Camps et al., 1992; Katz et al., 1992). Nach Aktivierung des G-Proteingekoppelten Rezeptors katalysiert die Phospholipase C- $\beta$  die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) und generiert damit die „second messenger“ Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) (Berridge, 1993). Das durch Hydrolyse von  $PIP_2$  entstehende  $IP_3$  verläßt die Plasmamembran und diffundiert ins Zytosol. Dort bindet es an  $IP_3$ -abhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) und löst die Ausschüttung von  $Ca^{2+}$  ins Zytosol aus.

Diacylglycerol kann zwei mögliche Signalfunktionen ausüben. Zum einen kann es weiter aufgespalten werden, wobei Arachidonsäure entsteht. Diese kann entweder selbst als Botenstoff fungieren oder als Ausgangsstoff der Eicosanoidsynthese dienen. Zum anderen aktiviert Diacylglycerol die Serin/Threonin-Proteinkinase Proteinkinase C (PKC), die Proteine in der Zielzelle phosphoryliert.

Der von  $IP_3$  ausgelöste Anstieg der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration führt zu einer Verlagerung der PKC vom Zytosol an die Innenseite der Plasmamembran, wo sie unter dem gemeinsamen Einfluß von  $Ca^{2+}$ , DAG und dem negativ geladenen Membran-Phospholipid Phosphatidylserin aktiviert wird.

Die Aktivierung der Proteinkinase C ist ein essentieller Bestandteil der G-Protein-induzierten Signaltransduktion. Durch Bindung an membrangebundene Kalziumkanäle beeinflußt PKC direkt den Kalziumeinstrom in die Zelle und erhöht die intrazelluläre Kalziumkonzentration, welches dann an einer Vielzahl von Zellfunktionen beteiligt ist. So konnte für HL60-Zellen ein Zusammenhang zwischen der PKC-Expression und Zelldifferenzierung nachgewiesen werden, während für glatte Gefäßmuskelzellen noch kein sicherer Zusammenhang hergestellt werden konnte (Haller et al., 1994).

## 1.5 Rezeptor-Tyrosin-Kinasen

Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) zählen wie die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zu den membrandurchspannenden Rezeptoren. Nach Ligandenbindung dimerisieren Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und phosphorylieren gegenseitig ihre zytoplasmatischen Domänen.

Eine der am besten charakterisierten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen ist der Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF). EGF, ein aus 53 Aminosäuren aufgebautes Protein, bewirkt vor allem Proliferation epidermaler Zellen. Der dazugehörige Rezeptor durchspannt einmal die Membran und hat einen großen extrazellulären Teil, der glykosyliert ist und EGF bindet. In jedem Fall führt die Autophosphorylierung des Rezeptors nach Ligandenbindung zur Dimerisierung und Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden. So konnte nachgewiesen werden, dass die entstehenden Phosphotyrosinreste als hochaffine Bindungsstellen für Komponenten des MAPK-Signaltransduktionsweges dienen (van Biesen et al., 1996).

## 1.6 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

Die **mitogen-aktivierte Protein-Kinase** (MAPK)-Familie ist eine Superfamilie regulierter Serin-Threonin-Proteinkinasen, die an einer Vielzahl von physiologischen Reaktionen beteiligt sind (Cano und Mahadevan, 1995).

MAPK-Kaskaden sind wichtige Systeme der Signaltransduktion von der Zelloberfläche zum Zellkern. Dabei sind MAP-Kinasen an einer Vielzahl zellulärer Reaktionen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt.

Bisher sind drei Untergruppen der MAPK-Familie beschrieben. Zu diesen gehören die **extrazellulär-signalregulierte Kinase** (ERK), die **c-jun-Amino-Terminus-Kinasen** (JNK) und die p38-Kinasen.

Die ERK-Familie besteht aus den Isoformen ERK-1 und ERK-2, die auch unter der Abkürzung p44/p42-MAP-Kinase bekannt sind. Diese Multi-Kinasen-Kaskade kann sowohl durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren als auch durch Rezeptor-

Tyrosinkinase aktiviert werden kann (Nishida et al., 1993; Schlessinger, 1993; Blenis, 1993; Marshall, 1994).

Die beiden anderen Unterfamilien der MAP-Kinasen können sowohl durch Stress als durch pro-inflammatorische Zytokine aktiviert werden (Kyriakis und Avruch, 1996). Die p38-MAPK kann ebenfalls durch Agonisten G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, wie Angiotensin II oder Carbachol, aktiviert werden. Die Mechanismen von der Stimulation des GPCR zur Aktivierung der p38-MAPK sind jedoch noch zum größten Teil unbekannt.

Extrazellulär regulierte Kinasen können sowohl im Zytoplasma als auch im Kern lokalisiert sein. Durch Phosphorylierung von nukleären Transkriptionsfaktoren, können sie so direkt Signale übermitteln, die die Transkription von Genen regulieren.

Der MAPK-Signalweg repräsentiert einen Hauptpunkt, an welchem komplexe und mitunter konkurrierende Signale integriert werden, die Proliferation und Differenzierung regulieren.

## 1.7 Die MAP-Kinase-Kaskade

Ausgangspunkt des Signalpfades ist die kleine GTPase Ras, welche entweder durch Stimulation von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen oder G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aktiviert wird. Die Ras-Aktivierung führt durch direkte Interaktion zur Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Raf. Aktiviertes Raf phosphoryliert die multifunktionale Threonin/Tyrosin- MAP-Kinase-Kinase MEK (auch **MAP-** oder **ERK-Kinase** genannt). Diese phosphoryliert die MAP-Kinase ERK 1/2 (van Corven et al., 1993; Vouret-Craviari, 1993).