

5. Zusammenfassung

Glatte Gefäßmuskelzellen (GMZ) sind aufgrund ihrer Kontraktionsfähigkeit wesentlich an der Regulation des Blutdrucks und der Blutzirkulation beteiligt. Im Gegensatz zu Skelett- und Herzmuskelzellen sind sie jedoch nicht terminal differenziert und können durch verschiedene Stimuli zur phänotypischen Modulation angeregt werden. Diese Veränderung des Phänotyps ist eine Voraussetzung zur Entwicklung von Atherosklerose oder Restenose. Im Rahmen dieser Prozesse kommt es zu einer Erhöhung der Proliferationsrate glatter Gefäßmuskelzellen und einer Steigerung der extrazellulären Matrixproduktion. Parallel reduziert die Zelle die Expression der kontraktilen Proteine Aktin und Myosin, den klassischen Markern einer differenzierten, kontraktilen Gefäßmuskelzelle. Die Mechanismen, die an der Initiierung und Progression dieser komplexen Vorgänge beteiligt sind, sind bisher nur unzureichend geklärt. Insbesondere sind die hieran beteiligten Signaltransduktionswege weitgehend unbekannt.

Aus therapeutischer Sicht ist das Verständnis der Mechanismen, die zum Verlust des differenzierten Phänotyps glatter Gefäßmuskelzellen führen, Grundvoraussetzung zur Entwicklung von Behandlungsstrategien, die diese Prozesse inhibieren. Von besonderer Bedeutung wären Kenntnisse über die Mechanismen und Signaltransduktionswege, die die Umwandlung dedifferenzierter, proliferativer GMZ zu differenzierten, kontraktilen Gefäßmuskelzellen induzieren.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Signaltransduktionsmechanismen zu identifizieren und zu charakterisieren, die *in vitro* an der phänotypischen Modulation neonataler glatter Gefäßmuskelzellen beteiligt sind. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde die Thrombin-abhängige Steigerung der smooth muscle-myosin heavy chain (SM-MHC) -Promotor-Aktivität in neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte untersucht.

(1) Die Serinprotease Thrombin ist als ein bedeutender Bestandteil des Serums identifiziert worden, der eine G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPCR)-abhängige Steigerung der Expression des SM-MHC-Promotors als Zeichen der Differenzierung

glatter Gefäßmuskelzellen induzieren kann. Um die SM-MHC-Promotoraktivität näher zu charakterisieren, wurden die CAT-Aktivitäten eines –1352bp zählenden 5'-Deletionskonstruktes unter Serum- oder Thrombin-Stimulation studiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Applikation von Thrombin eine 30-fache Steigerung des Expressionsniveaus des Differenzierungsmarkers SM-MHC in neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen induziert.

(2) Serum-Stimulation glatter Gefäßmuskelzellen führt zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 (ERK1/2). Um die Beteiligung von Mitgliedern der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade an der Thrombin-induzierten Aktivierung des SM-MHC-Promotors nachzuweisen, wurden Versuche mit dominant negativem N17-Ras und N17-Raf durchgeführt. Die Thrombin-induzierte CAT-Aktivität kann durch Koexpression von dominant-negativem N17-Ras und N17-Raf konzentrationsabhängig reduziert werden und beweist die Notwendigkeit intakter Ras-/Raf-Signalproteine bei der Thrombin-induzierten Steigerung der SM-MHC-Promotoraktivität.

(3) Zur Charakterisierung weiterer Bestandteile des Signaltransduktionsweges wurde eine Beteiligung der Proteinkinase C durch den Einsatz verschiedener Proteinkinase C-Inhibitoren (PMA, BIM) studiert. Es konnte gezeigt werden, dass die PKC an beiden Phasen der biphasischen ERK1/2-Kinetik nach Thrombin-Stimulation beteiligt ist.

(4) Durch pharmakologische Inhibition endogener Src-Kinasen mittels PP2 oder Genistein wurde eine Beteiligung der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Src an der GPCR-vermittelten ERK1/2-Phosphorylierung nach Thrombin-Stimulation nachgewiesen.

(5) Um die Mechanismen der ERK1/2-Phosphorylierung nach Thrombin-Stimulation näher zu charakterisieren, wurde eine Beteiligung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen untersucht. Die GPCR-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung nach Thrombin-Stimulation wurde durch Inhibition der EGF-Rezeptor-Funktion blockiert. Hierzu wurde ein spezifischer Inhibitor der EGF-Rezeptor-Autophosphorylierung eingesetzt.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass eine Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Thrombin-Rezeptors PAR1 unter Beteiligung

der dargestellten Signaltransduktionsabschnitte eine Differenzierung neonataler glatter Gefäßmuskelzellen induziert.