

Berichte aus der Veterinärmedizin

Ute Schavier-Schmitz

**Einfluß von extrazellulärem ATP auf
die Phosphorylierung der Myosinleichtketten
in Endothelzellen**

D 26 (Diss. Universität Giessen)

**Shaker Verlag
Aachen 2002**

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Schavier-Schmitz, Ute:

Einfluß von extrazellulärem ATP auf die Phosphorylierung der Myosinleichtketten
in Endothelzellen / Ute Schavier-Schmitz.

Aachen : Shaker, 2002

(Berichte aus der Veterinärmedizin)

Zugl.: Giessen, Univ., Diss., 2001

ISBN 3-8322-0390-7

Copyright Shaker Verlag 2002

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen
oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungs-
anlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8322-0390-7

ISSN 0945-103X

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde am Modell von kultivierten Aortenendothelzellen vom Schwein die Wirkung von extrazellulärem ATP auf den Phosphorylierungszustand endothelialer Myosinleichtketten (MLK) untersucht.

Endothelzellen besitzen einen kontraktilem Apparat ähnlich dem von glatten Muskelzellen. Die Myosinleichtketten liegen in Endothelzellen unter Basalbedingungen zu knapp 40% in phosphorylierter Form vor. Die Aufrechterhaltung dieses basalen MLK-Phosphorylierungsniveaus ist Ca^{2+} -abhängig: Eine intrazelluläre Ca^{2+} -Verarmung durch Chelatbildung führt zu einer MLK-Dephosphorylierung. ATP in einer Konzentration von 10 μM bewirkt eine konzentrationsabhängige Reduzierung der MLK-Phosphorylierung, gleichzeitig aber auch eine Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Verhindert man diesen ATP-induzierten Ca^{2+} -Anstieg durch Einsatz von Xestospongion C, einem Hemmstoff der Inositol-3-phosphat-gesteuerten Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum, so beeinflusst das nicht die durch ATP verursachte MLK-Dephosphorylierung. ATP führt also durch einen Ca^{2+} -unabhängigen Mechanismus zur Dephosphorylierung endothelialer MLK.

Eine Hemmung der Proteinphosphatasen 1 und 2A durch Calyculin A führt zur Steigerung der MLK-Phosphorylierung. Werden Endothelzellen vor ATP-Zugabe mit Calyculin A vorinkubiert, so führt dies zu einer stärkeren Zunahme der MLK-Phosphorylierung als durch ATP allein. Bei intrazellulärer Ca^{2+} -Verarmung kann ATP in Calyculin A-vorbehandelten Zellen die MLK-Phosphorylierung nicht über das durch Calyculin A allein verursachte Maß hinaus steigern. ATP aktiviert in Endothelzellen also auch eine Ca^{2+} -abhängige Myosinkinase.

Zusammengefaßt hat ATP antagonistische Wirkungen auf die Steuerung des Phosphorylierungsstatus endothelialer Myosinleichtketten: Es führt sowohl zu einer Ca^{2+} -unabhängigen MLK-Dephosphorylierung als auch zu einer Ca^{2+} -abhängigen Phosphorylierung. Netto überwiegt die Dephosphorylierung. ATP ist der erste bisher gefundene physiologische Mediator, der in Endothelzellen Myosinleichtketten über einen Ca^{2+} -unabhängigen Mechanismus dephosphoryliert.

Summary

In cultured porcine aortic endothelial monolayers the effect of ATP on myosin light chain (MLC) phosphorylation, which controls the endothelial contractile machinery, was studied. ATP (10 μ M) reduced MLC phosphorylation while increasing cytosolic Ca^{2+} -concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Inhibition of the ATP-evoked $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise by xestospongin C (10 μ M), an inhibitor of the inositol-3-phosphate-dependent Ca^{2+} -release from endoplasmic reticulum, did not affect the ATP-induced dephosphorylation of MLC. MLC dephosphorylation was prevented in presence of calyculin A (10 nM), an inhibitor of protein phosphatases PP1 and PP2A. Thus, ATP activates Ca^{2+} -independently myosin light chain dephosphorylation. In presence of calyculin A MLC phosphorylation was incremented after addition of ATP, an effect abolished when cells had been loaded with the Ca^{2+} -chelator BAPTA (10 μ M). Thus, ATP also activates a Ca^{2+} -dependent kinase acting on MLC. In summary, ATP stimulates simultaneously a functional antagonism towards both phosphorylation and dephosphorylation of MLC in which the dephosphorylation prevails. In endothelial cells, ATP is the first physiological mediator identified to activate myosin phosphatases in a Ca^{2+} -independent manner.