



**ROLLE DES MEK/MAPK-SIGNALWEGES
BEI DER ATP-VERMITTELTEN MODULATION DER
MYOSINLEICHTKETTENPHOSPHORYLIERUNG
IN PORCINEN ENDOTHELZELLEN**

DIANA KLINGENBERG

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: PD Dr. T. Noll

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
im Fachbereich vertreten durch Prof. Dr. R. Gerstberger

Rolle des MEK/MAPK-Signalweges bei der ATP-vermittelten Modulation der Myosinleichtketten- phosphorylierung in porcinen Endothelzellen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Diana Klingenberg

Tierärztin aus Gevelsberg

Gießen 2006

Angefertigt im Rahmen des Graduiertenkollegs 534
Gefördert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatter: PD Dr. T. Noll

2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Gerstberger

Tag der mündlichen Prüfung: 6.4.2006

Meinen Eltern

Teile dieser Arbeit sind bereits in folgende Veröffentlichung eingegangen:

Klingenberg D., Gündüz D., Härtel F., Bindewald K., Schäfer M., Piper H.M., Noll, T.
MEK/MAPK as a signaling element in ATP control of endothelial myosin light chain.
Am J Physiol Cell Physiol 2004; 286: C807-C812

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	1
1 Einleitung	5
1.1 Das Endothel als Grenzschicht zwischen Blut und Gewebe	5
1.1.1 Aufgaben des Endothels	5
1.1.2 Die endotheliale Schrankenfunktion	6
1.1.3 Bedeutung des Zytoskeletts in Endothelzellen	7
1.2 Der kontraktile Apparat von Endothelzellen	9
1.2.1 Aufbau und Regulation des kontraktilen Apparates	9
1.2.2 Phosphorylierung der MLK	10
1.3 Wirkung von extrazellulärem ATP auf die endotheliale Schranke	13
1.4 MAPK in der Signalübermittlung von Endothelzellen	15
1.4.1 Aufgaben und Funktionen der Familie der MAPK	15
1.4.2 Signalkaskade der p42/p44 MAPK	16
1.4.3 Aktivierung der p42/p44 MAPK über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	21
1.5 Ziel und Fragestellungen der Arbeit	22
2 Material	24
2.1 Chemikalien	24
2.1.1 Häufig verwendete Chemikalien	24
2.1.2 Agonisten und Inhibitoren	25
2.1.3 Molekulargewichtsmarker	26
2.1.4 Antikörper	26
2.2 Geräte und Laborbedarf	27
2.2.1 Zellkultur	27
2.2.2 Gelelektrophorese	27
2.2.3 Sonstige Geräte	27
2.2.4 Verbrauchsmaterialien	28
2.2.5 Auswertung	28

3	Methoden	30
3.1	Isolation und Kultivierung von aortalen Endothelzellen	30
3.2	Allgemeine Inkubationsbedingungen	32
3.3	Bestimmung der p42/p44 MAPK-Phosphorylierung	32
3.3.1	Aufbereitung der Proben für SDS-PAGE	32
3.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
3.3.3	Western-Blot	35
3.3.4	Immunologischer Nachweis der p42/p44 MAPK- Phosphorylierung	36
3.3.5	Auswertung	39
3.4	Bestimmung der MLK-Phosphorylierung	40
3.4.1	Aufbereitung der Proben für Harnstoff-Gelelektrophorese	40
3.4.2	Glycerol-Harnstoff-Gelelektrophorese	41
3.4.3	Western-Blot	42
3.4.4	Immunologischer Nachweis der MLK-Phosphorylierung	42
3.4.5	Auswertung	43
3.5	Statistik	44
4	Ergebnisse	45
4.1	Steigerung der p42/p44 MAPK-Phosphorylierung in Gegenwart von ATP	45
4.2	p42 MAPK-Phosphorylierung in Gegenwart von PD 98059, U0 126 und U0 124	48
4.3	p42 MAPK-Phosphorylierung in Gegenwart von 8-Phenyltheophyllin und NECA	51
4.4	ATP-Wirkung unter Blockade des zytosolischen Ca ²⁺ -Anstieges	53
4.5	Rolle des MEK/MAPK-Signalweges bei der MLK-Phosphorylierung unter Hemmung der MLK-Phosphatase	55
4.6	Beteiligung des MEK/MAPK-Signalweges an der MLK-Phosphory- lierung unter Hemmung der MLK-Kinase	57

5	Diskussion	59
5.1	Einfluss von ATP auf die Phosphorylierung der p42/p44 MAPK	59
5.2	Modell der phosphorylierbaren MLK	62
5.3	Rolle des MEK/MAPK-Signalweges bei der ATP-vermittelten MLK-Phosphorylierung über MLK-Kinase	62
5.4	Rolle des MEK/MAPK-Signalweges bei der ATP-vermittelten MLK-Dephosphorylierung über MLK-Phosphatase	64
5.5	Schlussfolgerungen und Ausblick	66
6	Zusammenfassung	70
7	Summary	71
8	Literatur	72
9	Danksagung	85

Verzeichnis der Abkürzungen

% (vol/vol)	Volumenprozent (volume per volume)
% (wt/vol)	Gewichtsprozent (weight per volume)
8-PT	8-Phenyltheophyllin
AA	Acrylamid
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Arp 2/3	actin-related protein 2/3
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser (aqua bidestillata)
BAPTA/AM	1,2-bis(o-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraacetat Tetra(acetoxymethyl)ester
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BisAA	Bisacrylamid
BSA	Bovines Serumalbumin
CaM	Calmodulin
CaM-Kinase II	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase
cAMP	cyclo-Adenosin-3', 5'-monophosphat
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	extrazelluläre Matrix
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
EZ	Endothelzelle
FGF	fibroblast growth factor
x g	x-fache Erdbeschleunigung
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	horseradish peroxidase
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat

Verzeichnis der Abkürzungen

JNK/SAPK	c-Jun N-terminale Kinase/Stress-aktivierte Proteinkinase
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPK~P	phosphorylierte MAPK
MAPKAPK	MAPK-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAPK-Kinase
MAPKKK	MAPKK-Kinase
MEK	MAPK-Kinase/ERK-Kinase
ML-7	(5-Iodonaphthalen-1-sulfonyl)homopiperazin
MLK	Myosinleichtketten
MLK~P	monophosphorylierte MLK
MLK~PP	diphosphorylierte MLK
MLK-Kinase	Myosinleichtketten-Kinase
MLK-Phosphatase	Myosinleichtketten-Phosphatase
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NCS	Neonatales Kälberserum (neonatal calf serum)
NECA	5'-(N-ethylcarboxamido)adenosin
NO	Stickstoffmonoxid
n.s.	nicht signifikant
P1-/P2-Rezeptor	Purin-Rezeptor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PD 98059	2'-Amino-3'-methoxyflavon
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ - Konzentration
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
Pyk2	proline rich tyrosine kinase 2
Raf	rapid accelerating fibrosarcoma (Serin/Threonin- kinase)

Verzeichnis der Abkürzungen

Ras	rapid accelerating sarcoma (kleines G-Protein)
RTK	Rezeptor Tyrosinkinase
SD	Standardabweichung
SDS	Natrium (Sodium)-Dodecylsulfat
Sos	son of sevenless
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
Src	rous sarcoma virus oncogene (zytoplasmatische Tyrosinkinase)
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (tris buffered saline)
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF β	transforming growth factor β
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U0 124	1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(methylthio)-butadien
U0 126	1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)-butadien
U/ml	Units/ml
Upm	Umdrehungen pro Minute
VE-Cadherin	vascular endothelial cadherin
VEGF	vascular endothelial growth factor
vs.	versus
Xe	Xestospongin C

1 Einleitung

1.1 Das Endothel als Grenzschicht zwischen Blut und Gewebe

1.1.1 Aufgaben des Endothels

Das Endothel kleidet als einlagige Epithelzellschicht alle Blutgefäße des Körpers aus. Mit einer beim Menschen geschätzten Gesamtfläche von ca. 6000-8000 m² und einem Gewicht von bis zu 1,5 kg kann es als eigenständiges Organ angesehen werden (Bassenge, 1996; Nawroth und Lasch, 1999). Lange Zeit wurde angenommen, dass es sich bei der Endothelschicht um nicht viel mehr als ein passives Sieb handelt. Heute jedoch weiß man, dass dem Endothel als Grenzschicht zwischen dem zirkulierenden Blut und der Gefäßwand mit dem angrenzenden Gewebe eine besondere Bedeutung zukommt. Endothelzellen sind äußerst aktiv und üben eine Vielzahl von Funktionen aus (Hecker, 1999).

Das Endothel wirkt antithrombotisch und antikoagulatorisch (Sumpio et al., 2002) und spielt eine maßgebliche Rolle bei der Regulation des arteriellen Gefäßtonus (Furchgott und Zawadzki, 1980). Es ist entscheidend an akuten und chronischen Entzündungsprozessen beteiligt (Cotran, 1987; Hecker, 1999) und spielt eine wesentliche Rolle bei der Wundheilung und der Entstehung neuer Gefäße (Folkman und Klagsbrun, 1987; Sumpio et al., 2002). Eine der wichtigsten Funktionen, vor allem des Kapillarendothels, liegt in der Regulation des Stoffaustausches zwischen Intra- und Extravasalraum, wobei man heute davon ausgeht, dass Endothelzellen aktiv die Schrankenfunktion beeinflussen (van Hinsbergh et al., 1997).

Die Ausübung dieser vielfältigen Funktionen nimmt das Endothel prinzipiell durch drei Mechanismen wahr. Zum einen enthalten Endothelzellen in ihrer Membran eine Reihe von Enzymen, die Einfluss auf die Konzentration im Blut zirkulierender vasoaktiver Substanzen, wie z.B. Angiotensin I, nehmen (Catravas und Orfanos, 1997; Hecker, 1999). Zum anderen besitzen Endothelzellen auch selbst die Fähigkeit, hochwirksame vasoaktive Substanzen, wie Stickstoffmonoxid (NO), Prostazyklin und Endothelin, zu synthetisieren und diese bei Bedarf in das Gefäßlumen freizusetzen (Pearson et al., 1983; Vane und Botting, 1995; Toborek

und Kaiser, 1999). Auch von Willebrand-Faktor und Wachstumsfaktoren, wie FGF, werden vom Endothel synthetisiert und sezerniert (Vane und Botting, 1995; Sumpio et al., 2002). Nicht zuletzt exprimieren Endothelzellen aber auch zahlreiche Rezeptoren: für inflammatorische Mediatoren, wie z.B. Thrombin und Histamin, für Wachstumsfaktoren und für andere Agonisten und Mediatoren, wie Adrenalin, Adenosin, Adeninnukleotide und Peptide (Vanhoutte und Mombouli, 1996). Über diese Rezeptoren und über physikalisch-chemische Reize, wie Wandschubspannung (shear stress) und Hypoxie, werden Signale an die Endothelzelle weitergegeben, worauf diese z.B. mit der Synthese und Freisetzung neuer Substanzen und/oder mit Veränderungen im Zytoskelett reagiert.

Vor diesem Hintergrund wird verständlich, dass gestörte Endothelfunktionen oft die Grundlage sind für die Entstehung chronischer kardiovaskulärer Erkrankungen, wie Bluthochdruck, Arteriosklerose, Herzinfarkt und Schlaganfall, die heute in der Medizin ein großes Problem darstellen.

1.1.2 Die endotheliale Schrankenfunktion

Zur Hauptaufgabe des Gefäßendothels gehört die Bildung einer selektiven Barriere, die den kontrollierten Austausch von Flüssigkeiten, Makromolekülen und Blutzellen zwischen Gefäßlumen und Interstitium ermöglicht (Drenckhahn und Ness, 1997). Dieser Austausch kann transzellulär oder parazellulär erfolgen (Stevens et al., 2000). Abgesehen von Blutkapillaren bestimmter Organe besitzt die Mehrzahl aller Gefäße eine geschlossene und kontinuierliche Lage aus Endothelzellen (Liebich, 1993; Gaehtgens, 1994). Durch eine solche Endothelzellschicht können Wasser, Gase und kleinere Moleküle auf transzellulärem Weg in das Interstitium gelangen. Hydrostatische und kolloidosmotische Druckdifferenzen sowie selektive Membrantransportproteine sind hierfür verantwortlich. Darüber hinaus wird für bestimmte Proteine und Substanzen auch ein transendothelialer Weg über zytoplasmatische Vesikel und sogenannte Vesiculo-Vacuolar Organells (VVOs) diskutiert (Michel, 1996; Dvorak und Feng, 2001). Von parazellulärer Permeabilität spricht man, wenn Moleküle aus dem Gefäßlumen durch Interzellularspalten zwischen den normalerweise eng aneinander liegenden Endothelzellen in das Gewebe gelangen. Dieser Weg eignet sich für größere, vor allem hydrophile Moleküle, sämtliche

Blutzellen und größere Flüssigkeitsmengen und spielt besonders im Rahmen einer entstehenden Entzündung eine große Rolle. Die Bedeutung der Endothelzellen bei der Regulation der Interzellularspalten konnte unter anderem mittels Elektronen- und Phasenkontrastmikroskopie und Permeabilitätsversuchen in konfluenten Endothelzellmonolayern und kleinen Blutgefäßen gezeigt werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass Entzündungsmediatoren, wie Histamin, Thrombin und Serotonin, die Endothelzellen dazu veranlassen, interzelluläre Spalten von 0,1–1 µm zu bilden, was mit einem Zusammenbruch der endothelialen Permeabilitätsbarriere einhergeht (Majno und Palade, 1961; Laposata et al., 1983; Garcia et al., 1986; Wu und Baldwin, 1992).

Viele Befunde deuten darauf hin, dass für die Vergrößerung der Interzellularspalten zum einen die Aktivierung des endothelialen kontraktiven Apparates (Majno et al., 1969; Schnittler et al., 1990; Garcia et al., 1995) und zum anderen das partielle Loslösen endothelialer Adhäsionsstrukturen (Gardner et al., 1996; Rabiet et al., 1996; Stevens et al., 2000; Srinivas et al., 2004) verantwortlich sind.

1.1.3 Bedeutung des Zytoskeletts in Endothelzellen

Das Zytoskelett der Endothelzelle besteht, wie das anderer Zellen auch, aus einem Gerüst von Fasern, die das gesamte Zytosol der Zelle durchziehen und bis zur Plasmamembran reichen. Man unterscheidet dabei folgende drei Fasersysteme: Mikrofilamente (Aktinfilamente), Mikrotubuli und Intermediärfilamente (Gottlieb et al., 1991; Lodish et al., 2001). Diese verleihen der Zelle ihre Form und Stabilität, leiten die zellulären Organellen bei intrazellulären Transportvorgängen und sind verantwortlich für zelluläre Kraftentwicklungen, wobei vor allem die mit Myosin II-assoziierten Aktinfilamente die Grundlage für den kontraktiven Apparat der Zelle darstellen (Alberts et al., 1997).

Die Aktinfilamente werden jeweils von quervernetzenden Proteinen zusammengehalten und sind mit Hilfe von integralen Membranproteinen an der Plasmamembran befestigt (Drenckhahn und Ness, 1997; Lodish et al., 2001). Diese Kontaktstellen ermöglichen nicht nur eine Befestigung des Aktinzytoskeletts an der Plasmamembran, sondern auch gleichzeitig eine indirekte Verbindung mit dem Zytoskelett benachbarter Zellen oder mit der extrazellulären Matrix. Man spricht dann

entweder von Zell-Zell-Verbindungen (Adhärenskontakten) oder von Zell-Matrix-Kontakten (Fokalkontakten) (Lum und Malik, 1994; Alberts et al., 1997). Gerade für Endothelzellen sind diese Kontakte sehr wichtig, da sie verschiedenen physikalischen Kräften von Seiten des zirkulierenden Blutstroms ausgesetzt sind. Um einen stabilen, funktionellen Zellverband zu bilden, müssen sie untereinander und auf ihrer Unterlage, der Basalmembran, gut haften. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen zu diesem Zweck lange Aktin-Myosin-Bündel, sogenannte Stressfasern, auf ihrer basalen Seite ausbilden (Wong et al., 1983). Diese myofibrillenartigen Fasern aus Aktin und Myosin gehen von den Fokalkontakten aus und dienen vor allem der Anheftung an die unterliegende Basalmembran bzw. extrazelluläre Matrix (Drenckhahn und Wagner, 1986; Gottlieb et al., 1991). Untereinander sind die Aktinzytoskelette benachbarter Endothelzellen mechanisch über Adhärenskontakte und Tight Junctions verbunden (Lum und Malik, 1994; Toborek und Kaiser, 1999). Obwohl die Struktur der Adhärenskontakte und der Fokalkontakte sehr komplex ist, sind alle Anheftungsstellen grundsätzlich aus drei Teilen aufgebaut: aus integralen Membranproteinen (Integrine an den Zell-Matrix-Kontakten und vornehmlich VE-Cadherine an den endothelialen Zell-Zell-Kontakten) (Albelda et al., 1989; Lampugnani et al., 1992, 1995; Dejana et al., 1995), kontraktile Aktin-Myosin-Bündeln und intrazellulären Adapterproteinen, die die integralen Membranproteine mit den Aktin-Myosin-Komplexen in der Zelle verbinden (Luna und Hitt, 1992; Lodish et al., 2001). Die Occludine der Tight Junctions sind vermutlich ebenfalls mit dem Aktinzytoskelett verbunden (Madara, 1987; Drenckhahn und Dermietzel, 1988).

Im Zusammenhang mit diesem Zytoskelett und den Adhäsionsstrukturen wird davon ausgegangen, dass die aktivierte Endothelzelle grundsätzlich über zwei Mechanismen eine interendotheliale Spaltbildung induzieren kann: über einen Zerfall von Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Kontakten und/oder über eine Aktivierung des kontraktile endothelialen Zytoskeletts (Lum und Malik, 1994; Garcia und Schaphorst, 1995; van Hinsbergh, 1997; Baldwin und Thurston, 2001; Moy et al., 2002; Bogatcheva et al., 2002; Borbiev et al., 2003; Yuan, 2002). Wie diese Mechanismen im Einzelnen kontrolliert werden, ist nur in Teilen verstanden. Es wird angenommen, dass durch eine Kontraktion des Zytoskeletts die Zugkräfte, die die Endothelzellen aufeinander ausüben, zunehmen und dadurch die Zellgrenzen benachbarter Zellen partiell auseinander weichen (Wysolmerski und Lagunoff, 1991;

Kolodney und Wysolmerski, 1992). Im Hinblick auf die Bedeutung des kontraktiven Zytoskeletts für die Kraftentwicklung und die Spaltbildung zwischen Endothelzellen, steht die Aktivierung des endothelialen Kontraktionsapparates im Zentrum der vorliegenden Arbeit.

1.2 Der kontraktile Apparat von Endothelzellen

1.2.1 Aufbau und Regulation des kontraktiven Apparates

Obwohl es sich bei Endothelzellen nicht um Muskelzellen handelt, besitzen sie deren Hauptkomponenten des kontraktiven Apparates: Aktin, Myosin II, Tropomyosin und α -Aktinin (Gabbiani et al., 1983; Wong et al., 1983; Drenckhahn und Wagner, 1986; Schnittler et al., 1990; Drenckhahn und Ness, 1997). Der Gehalt dieser Proteine in Endothelzellen ist dabei überraschend hoch. In frisch isolierten Endothelzellen von Pulmonalarterien vom Schwein machen Aktin und Myosin 16 % vom Gesamtproteingehalt aus, was höher ist, als in den meisten anderen Nicht-Muskelzellen (Schnittler et al., 1990; Drenckhahn und Ness, 1997).

Das Myosin ist die kraftgenerierende Komponente in dem Aktin-Myosin-Filamentsystem (Sheldon et al., 1993; Vale, 1994; Drenckhahn und Ness, 1997; Lodish et al., 2001). Mit Methoden der Immunzytochemie, Elektronenmikroskopie und mit Permeabilitätsmessungen konnten Schnittler et al. (1990) zeigen, dass der größte Anteil an Aktin und Myosin in der Nähe der Interzellularspalten lokalisiert ist und Ca^{2+} -abhängig eine zentrale Rolle bei der Weitenregulation der Interzellularspalten spielt. Direkte Hinweise auf die Entwicklung einer kontraktiven Kraft in Endothelzellen ergaben Versuche, in denen vaskuläre Endothelzellen, die auf einem flexiblen Substrat, z.B. Silikon, kultiviert wurden, nach Stimulation mit verschiedenen Entzündungsmediatoren eine Verformung des Substrates bewirkten (de Clerck et al., 1981; Morel et al., 1989, 1990; Boswell et al., 1992). Auch Wysolmerski und Lagunoff (1988, 1990) konnten in zwei Arbeiten zeigen, dass sich Endothelzellen Ca^{2+} - und ATP-abhängig kontrahieren können.

Aufgrund dieser Befunde geht man heute davon aus, dass die Endothelzelle über ähnliche Kontraktionsmechanismen verfügt wie die Glattmuskelzelle (van Hinsbergh, 1997). Dabei liegen in der Glattmuskel- und Endothelzelle die Aktin- und

Myosinfilamente nicht so hochgradig angeordnet vor wie in der Skelettmuskelzelle. Das Sarkoplasmatische Retikulum (SR) ist schwächer ausgeprägt und Troponin fehlt (Lodish et al., 2001). Neben einer neuralen Stimulation können hier Rezeptorvermittelt auch eine Reihe von Hormonen und Mediatoren eine Kontraktion oder Relaxation auslösen. Auch in der Glattmuskel- und der Endothelzelle ist der intrazelluläre Ca^{2+} -Anstieg der Auslöser für eine Kontraktion. Die Regulation verläuft jedoch langsamer und komplexer als in der Skelettmuskelzelle. Kommt es über Ca^{2+} -Kanäle aus dem Extrazellularraum oder durch Freisetzung aus dem SR zu einem intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg, bindet Ca^{2+} an Calmodulin und aktiviert direkt oder indirekt die Myosinleichtketten-Kinase (MLK-Kinase). Dies führt zur Phosphorylierung der Myosinleichtketten (MLK) und zur Zellkontraktion (Goeckeler und Wysolmerski, 1995; Garcia und Schaphorst, 1995; van Hinsbergh et al., 1997; Lodish et al., 2001). Auch Caldesmon, welches an Aktinfilamente bindet und die Wechselwirkung zu Myosin hemmt, kann vermutlich über den Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex oder über eine Phosphorylierung reguliert werden und eine Kontraktion der Zelle ermöglichen (Sobue und Sellers, 1991; Zhang et al., 1994). Im Folgenden soll auf die Phosphorylierung der MLK eingegangen werden.

1.2.2 Phosphorylierung der MLK

Heute sind 13 Myosintypen bekannt. In Glattmuskel- und Endothelzellen wird Myosin II exprimiert und dieses ist an der Bildung der kontraktiven Aktin-Myosin-Bündel beteiligt (Lodish et al., 2001). Myosin II besteht aus zwei assoziierten Myosinköpfen, zwei Hals- und zwei Schwanzdomänen, wobei letztere stabförmig umeinander gewunden sind. An jedem Myosinkopf befindet sich eine Aktinbindungsstelle und eine ATPase und an jedem Myosinhals befinden sich jeweils eine essentielle bzw. strukturelle und eine regulatorische MLK, die die Aktivität der Kopfregeion regulieren (Abb.1.1) (van Hinsbergh et al., 1997; Lodish et al., 2001). Direkter Auslöser der Kontraktion ist die Phosphorylierung der regulatorischen MLK, die eine Konformationsänderung des Myosinkopfes bewirkt und eine Aktin-Myosin-Wechselwirkung ermöglicht (Alberts et al., 1997; Lodish et al., 2001). Dabei löst sich die Schwanzdomäne vom Kopf und andere Myosinmoleküle lagern sich an, sodass ein bipolares Myosinfilament entsteht (Alberts et al., 1997). Die regulatorischen MLK

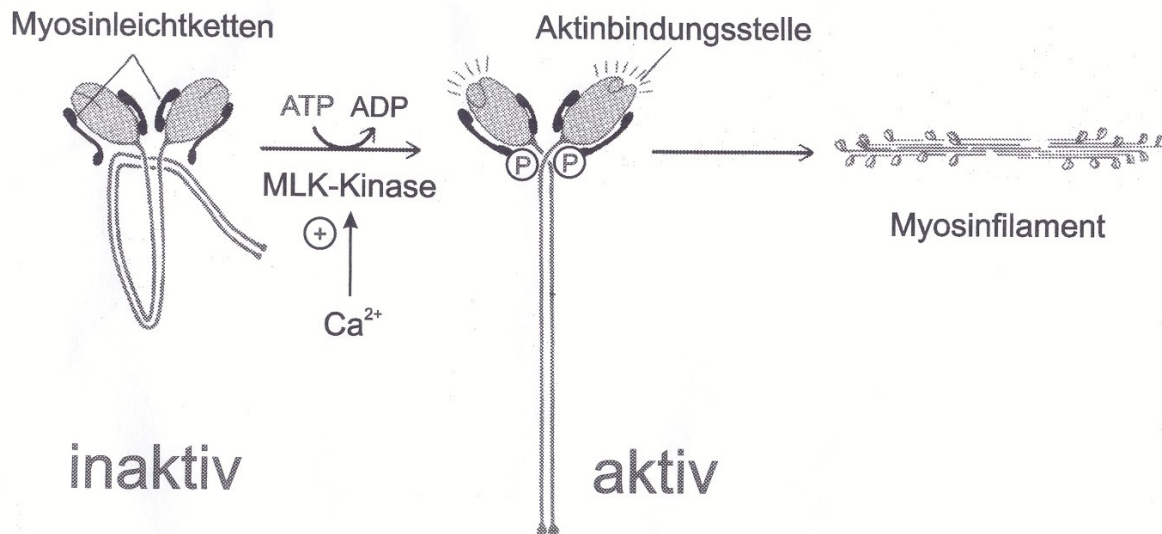


Abb. 1.1: Phosphorylierung der MLK in Nicht-Muskelzellen (modifiziert nach Alberts et al., 1997).

In Nicht-Muskelzellen ist Myosin II an der Bildung der kontraktiven Aktin-Myosin-Bündel beteiligt. Myosin II besteht aus zwei assoziierten Myosinköpfen, zwei Hals- und zwei Schwanzdomänen. An jedem Myosinhals befinden sich jeweils eine strukturelle und eine regulatorische MLK. Werden die regulatorischen MLK unter ATP-Verbrauch durch die Ca^{2+} -abhängige MLK-Kinase phosphoryliert, bewirkt dies eine Konformationsänderung des Myosin II. Dies führt zum einen dazu, dass die Aktinbindungsstelle am Myosinkopf frei wird und zum anderen, dass sich die Myosinmoleküle zu einem bipolaren Myosinfilament zusammenlagern können. Beide Prozesse bilden die Voraussetzung für eine Aktin-Myosin-Wechselwirkung.

werden dabei an ihren Serin- und Threoninresten phosphoryliert. So konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass die Aktivierung von Endothelzellen mit Histamin oder Thrombin zur Bildung von mono- und diphosphorylierten MLK-Formen führt (Moy et al., 1993; Garcia et al., 1995; Goeckeler und Wysolmerski, 1995; van Hinsbergh, 1997). Die Aktivierung der MLK wird dabei durch die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige MLK-Kinase katalysiert, die nach ihrer eigenen Aktivierung zur Phosphorylierung der MLK an Serin-19 und bei starker Aktivierung auch an Threonin-18 führt (Goeckeler und Wysolmerski, 1995; Yuan, 2002). Neben der MLK-Kinase ist aber auch eine MLK-Phosphatase an der Regulation des Phosphorylierungsstatus beteiligt. So gibt es viele Hinweise dafür, dass sowohl in Glattmuskel-

als auch in Endothelzellen eine Hemmung der Phosphatase ebenfalls zu einer Steigerung der MLK-Phosphorylierung und zur Zellkontraktion führt (van Hinsbergh et al., 1997; Noll et al., 2000; Lodish et al., 2001). Die MLK liegen zu einem gewissen Prozentsatz phosphoryliert vor und es besteht ein Gleichgewicht zwischen den Phosphorylierungsprozessen der MLK-Kinase und den Dephosphorylierungsprozessen der MLK-Phosphatase (Kamm und Stull, 2001) (Abb. 1.2).

Dass die Aktivität der MLK-Kinase außer über Ca^{2+} /Calmodulin auch über Phosphorylierungen durch verschiedene Proteinkinasen beeinflusst werden kann, konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen in Glattmuskelzellen gezeigt werden. Dort wird die MLK-Kinase z.B. als Substrat für PKA (Conti und Adelstein, 1981), CaM-Kinase II (Hashimoto und Soderling, 1990), PKC (Nishikawa et al., 1985) und MAPK (Morrison et al., 1996) beschrieben. Dabei sollen PKA, CaM-Kinase II und PKC die Aktivität der MLK-Kinase durch eine Phosphorylierung verringern, während z.B. in Glattmuskelzellen und COS-7 Zellen eine Phosphorylierung über die MAPK zu einer gesteigerten Aktivität der MLK-Kinase führen soll (Stull et al., 1993; Morrison et al., 1996; Klemke et al., 1997; Arner und Pfitzer, 1999; Kamm und Stull, 2001). Wie genau diese oder weitere Kinasen in Endothelzellen über eine Beeinflussung der MLK-Kinase-Aktivität auf den Phosphorylierungszustand der MLK Einfluss nehmen oder die Kinasen die MLK eventuell unabhängig von MLK-Kinase phosphorylieren, ist noch unvollständig verstanden. Dabei muss berücksichtigt werden, dass auch Substanzen, die auf die Aktivität der MLK-Phosphatase wirken, Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus der MLK, die kontraktile Kräfte und die Permeabilität von Endothelzellschichten nehmen können (Lodish et al., 2001; Yuan, 2002) (Abb. 1.2).

Es wird somit deutlich, dass die Regulation der MLK nicht nur über die zelluläre Ca^{2+} -Konzentration gesteuert wird, sondern auch über verschiedene Proteine und Enzyme, die auf die Balance zwischen den Phosphorylierungsprozessen durch die MLK-Kinase und den Dephosphorylierungsprozessen durch die MLK-Phosphatase Einfluss nehmen. Während die meisten Erkenntnisse dabei aus Untersuchungen von Glattmuskelzellen stammen, ist im Gegensatz dazu aus Endothelzellen wenig bekannt. Gegenstand dieser Arbeit ist es, aufzuklären, welche Signalkaskaden in Endothelzellen auf die MLK-Phosphorylierung wirken und ob ein „cross-talk“ zwischen verschiedenen Signaltransduktionswegen besteht.

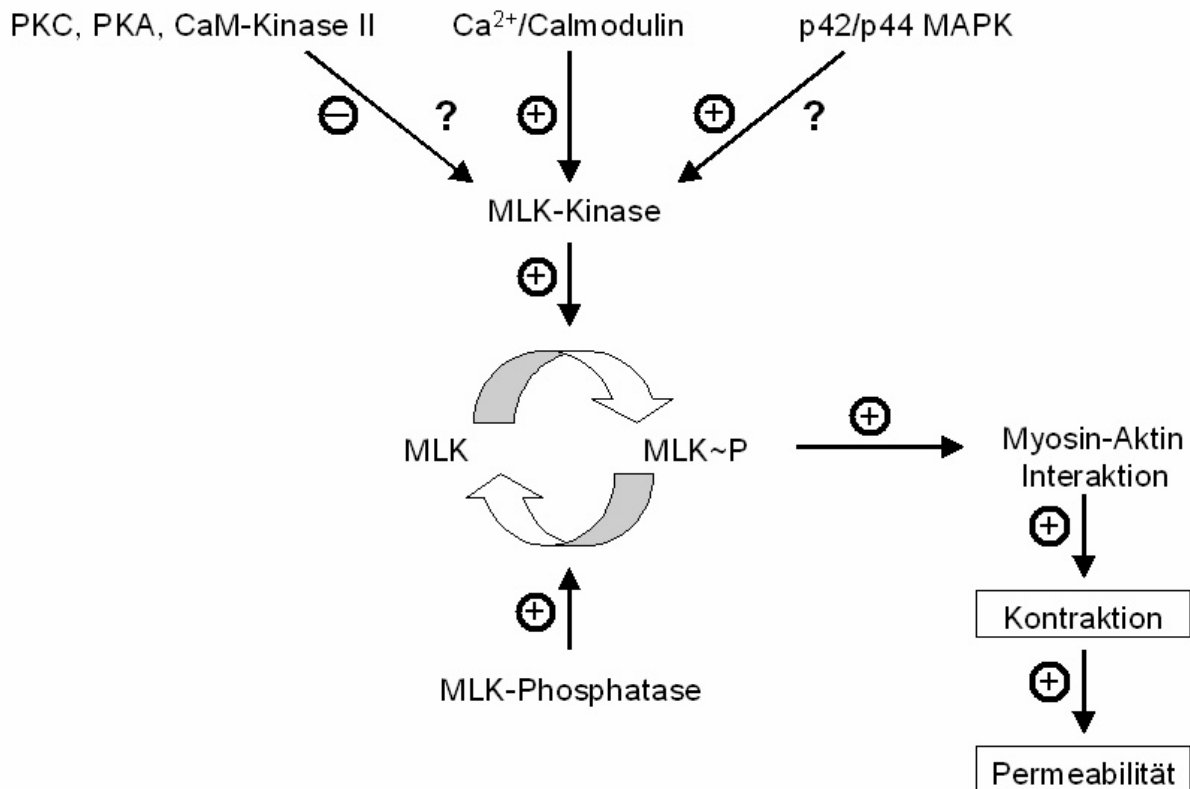


Abb. 1.2: Kontrolle des Aktivierungszustandes des kontraktiven Apparates in Endothelzellen.

Signalwege, die die Aktivität der Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen MLK-Kinase oder die der MLK-Phosphatase beeinflussen, können auch Einfluss auf die MLK-Phosphorylierung (MLK~P), die Myosin-Aktin-Interaktion und die endotheliale Schrankenfunktion nehmen. Es wird vermutet, dass die Proteinkinasen PKC, PKA und CaM-Kinase II die Aktivität der MLK-Kinase herabsetzen, während die p42/p44 MAPK die Aktivität der MLK-Kinase steigert und somit zu einer erhöhten MLK-Phosphorylierung führt.

1.3 Wirkung von extrazellulärem ATP auf die endotheliale Schranke

Wie bereits erläutert, sind Endothelzellen ständig der Wirkung zahlreicher Mediatoren ausgesetzt, wovon einige in der Lage sind, die endotheliale Schrankenfunktion zu beeinflussen. Typische Entzündungsmediatoren, wie Histamin, Bradykinin und Thrombin, sind dafür bekannt, dass sie über einen Rezeptor-vermittelten Anstieg des zytosolischen Ca²⁺ eine Hyperpermeabilität verursachen (Haraldsson et al., 1986; Morgan-Boyd et al., 1987; Lum et al., 1992). Dabei bindet das Ca²⁺ an Calmodulin und aktiviert die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige MLK-Kinase,

was zu einer gesteigerten MLK-Phosphorylierung und zur Kontraktion in Endothelzellen führt. Über diesen Mechanismus wird die endotheliale Permeabilität erhöht (van Hinsbergh et al., 1997).

Mit extrazellulärem ATP konnten Noll et al. (1999) zum ersten Mal einen Mediator beschreiben, der zwar einen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg initiiert, aber gleichzeitig zur Absenkung der Gefäßpermeabilität in makrovaskulären Endothelzellen führt und somit als Stabilisator der endothelialen Schranke angesehen werden kann. Der zugrundeliegende Mechanismus besteht sehr wahrscheinlich darin, dass ATP zu einer Dephosphorylierung der MLK führt, und zwar über eine Ca^{2+} -unabhängige Aktivierung der MLK-Phosphatase. Allerdings kann ATP ebenfalls über einen Ca^{2+} -abhängigen Mechanismus die MLK-Kinase aktivieren (Noll et al., 2000).

ATP kann aus aktivierten Thrombozyten, Nervenendigungen und praktisch allen Zellen des vaskulären Systems freigesetzt werden und dort lokal in mikromolaren Konzentrationen akkumulieren (Gordon, 1986; Dubyak und El-Moatassim, 1993; Zimmermann, 1994; Communi et al., 2000; Burnstock, 2002). ATP wirkt dabei über Ionenkanal-gekoppelte P2X-Rezeptoren und über G-Protein-gekoppelte P2Y-Rezeptoren (Albert et al., 1997; Erlinge, 1998; Burnstock, 2002). Der größte Teil der ATP-Wirkung auf Endothelzellen wird über P2Y-Rezeptoren vermittelt. ATP-induzierte Signaltransduktionskaskaden umfassen z.B. die Phospholipase C- IP_3 - Ca^{2+} -Kaskade, PKC und die Aktivierung von Adenylatcyclase (Dubyak und El-Moatassim, 1993; Motte et al., 1995; Communi, 2000). Extrazelluläres ATP wird normalerweise durch Ectonukleotidasen zu Adenosin abgebaut und kann daher auch indirekt über Adenosin-Rezeptoren auf Endothelzellen wirken (Gordon, 1986; Olsson und Pearson, 1990; Dubyak und El-Moatassim, 1993).

ATP steigert in der Endothelzelle die Synthese und Freisetzung von Prostazyklin und NO (Pearson et al., 1983; Gordon, 1986; Communi et al., 1995) und es wirkt proliferativ (Burnstock, 2002). Bereits in früheren Arbeiten wurde berichtet, dass extrazelluläres ATP in bovinen Aortenendothelzellen und einer humanen Endothelzelllinie (EAhy 926) den MAPK-Signalweg aktiviert und einen mitogenen Effekt hat (Graham et al., 1996; Patel et al., 1996). Obwohl der genaue Signalweg der ATP- und G-Protein-vermittelten MAPK-Aktivierung noch unklar ist, wird vermutet, dass er über P2Y-Rezeptoren, PLC und PKC, teils Ca^{2+} -abhängig, teils Ca^{2+} -unabhängig verläuft (Graham et al., 1996; Communi et al., 2000; Short et al., 2000; Burnstock, 2002; Yang et al., 2004). Da der MAPK-Signalweg nicht nur bei

Proliferationsprozessen, sondern auch bei kontraktile Prozessen, wie der Migration in COS-7 und MCF-7 Zellen (Klemke et al., 1997; Nguyen et al., 1999) und der endothelialen Schrankenfunktion, eine Rolle zu spielen scheint (Kevil et al., 1998; Verin et al., 2000), wäre die p42/p44 MAPK ein potentielles Signalelement, über welches ATP seinen Einfluss auf die MLK-Phosphorylierung vermittelt.

1.4 MAPK in der Signalübermittlung von Endothelzellen

1.4.1 Aufgaben und Funktionen der Familie der MAPK

Die Signalübermittlungswege der MAPK gehören zu den verbreitetsten und am besten untersuchten Mechanismen der eukaryotischen Zellregulation. Alle eukaryotischen Zellen besitzen mehrere MAPK-Signalwege, welche jeweils von ganz bestimmten extrazellulären Stimuli in Gang gesetzt werden können und der Zelle so erlauben, auf viele unterschiedliche Signale zu reagieren (Kyriakis und Avruch, 2001). Eine Besonderheit dieser Serin/Threonin-spezifischen Proteinkinasen besteht darin, dass sie nach Aktivierung in der Lage sind, in den Zellkern zu wandern und somit die Signalvermittlung von der Plasmamembran zum Nukleus zu vermitteln (Davis, 1993). MAPK-Signalwege können in der Säugetierzelle von einer großen Anzahl verschiedener Stimuli aktiviert werden: von Hormonen und Wachstumsfaktoren über Rezeptor Tyrosinkinasen (RTK) oder Zytokin-Rezeptoren; von vasoaktiven Peptiden über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR); von TGF β -verwandten Polypeptiden über Serin/Threoninkinase-Rezeptoren; von inflammatorischen Zytokinen der TNF-Familie sowie durch Stress, osmotischen Schock, ionisierende Strahlung und Ischämie (Kyriakis und Avruch, 2001).

Es sind in der Säugetierzelle mindestens drei Unterfamilien der MAPK beschrieben: ERK, JNK/SAPK und p38 MAPK (Sugden und Clerk, 1997; Kyriakis und Avruch, 2001; Liebmann, 2001; Schramek, 2002). Als ERK werden die extrazellulär regulierten Kinasen ERK2 und ERK1 bezeichnet, die im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen und entsprechend ihres Molekulargewichts auch p42 und p44 MAPK genannt werden (Liebmann, 2001). Die Signalwege der ERK, die im Weiteren als p42 MAPK und p44 MAPK bezeichnet werden, sind am besten untersucht. Diese sind die eigentlichen MAPK, da vor allem sie durch mitogene, d.h. wachstums-

fördernde Stimuli aktiviert werden. Bei der JNK/SAPK und p38 MAPK handelt es sich dagegen um Stress-aktivierte Proteinkinasen, die selbst aus mehreren Untereinheiten bzw. Isoformen bestehen (English et al., 1999; Kyriakis und Avruch, 2001) und vor allem durch Umgebungsstress und Zytokine aktiviert werden. Die Bedeutung der in der Literatur außerdem beschriebenen MAPK ERK3, ERK5 und ERK7 ist noch unklar (English et al., 1999).

Eine weitere Besonderheit aller MAPK-Signalwege ist, dass sie immer aus einer Serie von drei linear hintereinander geschalteten Proteinkinasen bestehen, die sich nacheinander aktivieren: eine MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK) aktiviert eine dualspezifische MAPK-Kinase (MAPKK/MEK) und diese phosphoryliert und aktiviert schließlich die jeweilige MAPK (Robinson und Cobb, 1997; English et al., 1999; Liebmann, 2001; Schramek, 2002). Aufgrund der großen Anzahl von MAPK gibt es eine noch größere Anzahl an darübergeschalteten Kinasen und ihre Nomenklatur und Regulation ist überaus komplex (Kyriakis und Avruch, 2001). MAPK sind, indem sie verschiedene Substrate binden und diese durch Phosphorylierung aktivieren oder auch deaktivieren können, an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt. Zu den am besten untersuchten Prozessen gehören die Regulation von Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose (Kyriakis und Avruch, 2001; Schramek, 2002). Es finden sich aber auch einige Hinweise, dass MAPK an Umbauprozessen des Zytoskeletts, bei der Zellmigration (Schramek, 2002) und der Ausbildung von Stressfasern eine wichtige Rolle spielen. Damit sind MAPK an zentralen Mechanismen der Wundheilung und der Angiogenese beteiligt, die, wenn sie außer Kontrolle geraten, zu pathologischen Prozessen, wie Tumorbildung und Atherosklerose, führen können. Zur Aufklärung dieser letzt genannten MAPK-Funktionen beizutragen, ist Teil dieser Arbeit.

1.4.2 Signalkaskade der p42/p44 MAPK

Die klassische Aktivierungskaskade der p42/p44 MAPK verläuft über RTK. Liganden, wie z.B. Wachstumsfaktoren, binden an RTK und führen zur Autophosphorylierung und Aktivierung des Rezeptors. Über Grb2, Sos und Ras wird die MAPKKK Raf phosphoryliert und aktiviert. Raf phosphoryliert und aktiviert daraufhin die MAPKK MEK 1/2, die schließlich die p42/p44 MAPK phosphoryliert und

dadurch aktiviert (Cobb und Goldsmith, 1995; Sugden und Clerk, 1997; English et al., 1999). Die p42/p44 MAPK wird dabei MEK 1/2-spezifisch an ihren Threonin- und Tyrosinresten phosphoryliert. Von p42 MAPK ist bekannt, dass sie an Threonin-183 und Tyrosin-185 phosphoryliert wird. Dies führt zu ihrer Konformationsänderung und zur vollen enzymatischen Aktivität. Auch ermöglicht es die Dimerbildung dieser Kinase, die für eine Wanderung in den Zellkern nötig ist (Cobb und Goldsmith, 1995; Canagarajah et al., 1997; Khokhlatchev et al., 1998). Bei der p42 MAPK und p44 MAPK handelt es sich um zwei Isoformen, die in der Regel koreguliert werden. Bekannte p42/p44 MAPK-Substrate sind unter anderem MAPK-aktivierte Proteinkinasen (MAPKAPK) und verschiedene Transkriptionsfaktoren (Kyriakis und Avruch, 2001).

Die p42/p44 MAPK ist an einer Vielzahl von Funktionen beteiligt (Abb. 1.3). Dem ausgeprägten mitogenen Effekt liegen dabei mehrere Mechanismen zugrunde, wie z.B. die Stimulation der Nukleotidsynthese, die Rekrutierung von Ribosomen durch Phosphorylierung von Translationsfaktoren, die Phosphorylierung und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die Phosphorylierung von Chromatin und eine Steigerung der Cyclin D1-Expression (Kyriakis und Avruch, 2001; Schramek, 2002). In Endothelzellen bewirkt die p42/p44 MAPK eine erhöhte Expression von VEGF, welches wiederum für Angiogenese, Migration und ebenfalls für eine MAPK-Aktivierung und Zellproliferation verantwortlich ist (Kroll und Waltenberger, 1997, 2000; Berra et al., 2000; Pages et al., 2000). Auch eine anti-apoptotische Wirkung der p42/p44 MAPK ist bekannt, die im Rahmen von Proliferation und Migration sinnvoll erscheint, da normalerweise Zellen, die sich aus dem Zellverband und von der extrazellulären Matrix lösen, einen programmierten Zelltod erleiden (Berra et al., 2000; Cho und Klemke, 2000).

Trotz der bedeutsamen Funktionen im Zellkern findet man in aktivierten Zellen die Hälfte der p42/p44 MAPK im Zytoplasma, gebunden an das Zytoskelett (Schramek, 2002). Reszka et al. (1995) konnten mit Immunofluoreszenz nachweisen, dass ein Drittel der MAPK mit dem Mikrotubuli-Zytoskelett assoziiert ist. So wurde als eine ihrer ersten Funktionen beschrieben, dass die MAPK Mikrotubuli-assoziierte Proteine phosphoryliert (Davis, 1993; Sugden und Clerk, 1997). Dadurch nimmt sie vermutlich Einfluss auf die Stabilität und Dynamik der Mikrotubuli, die z.B. während Mitose und Zellteilung entscheidend verändert sind (Reszka et al., 1995; Lodish et al., 2001).

Aber auch die Bildung von Fokalkontakten und den Kontraktionsapparat scheint sie zu beeinflussen (Fincham et al., 2000). Integrine, von denen bekannt ist, dass sie Zellteilung, Differenzierung, Apoptose und Zellmigration vermitteln, können MAPK aktivieren (Howe et al., 1998; Lee und Gotlieb, 2003). Komponenten der Integrin-gebundenen Fokalkontakte oder das assoziierte Aktinzytoskelett, einschließlich der MLK-Kinase, sind dabei potentielle p42/p44 MAPK-Substrate (Fincham et al., 2000). Es liegt daher die Vermutung nahe, dass die Integrin-vermittelte Aktivierung von p42/p44 MAPK eine wichtige Rolle bei der lokalen Regulation von Adhäsion, Kontraktion und Zellbewegung einnimmt (Howe et al., 1998).

Dass die p42/p44 MAPK entscheidend an der Zellmigration beteiligt ist, konnte z.B. in COS-7 Zellen und Aorten-Glattmuskelzellen von Ratten gezeigt werden (Cheresh et al., 1999; Cho und Klemke, 2000; Goetze et al., 2001). Dabei zeigten Klemke et al. (1997) und Nguyen et al. (1999) in COS-7 und MCF-7 Zellen, dass die p42/p44 MAPK die MLK-Kinase phosphoryliert und aktiviert, was zu einer gesteigerten MLK-Phosphorylierung und Migration der Zellen führte. Auch in Glattmuskelzellen wird vermutet, dass die p42/p44 MAPK oberhalb der MLK-Kinase liegt und dadurch kontraktile Prozesse in der Zelle beeinflusst (Morrison et al., 1996; Arner und Pfitzer, 1999; Yousufzai et al., 2000; Goetze et al., 2001). Dabei aktiviert die p42/p44 MAPK die MLK-Kinase entweder selbst und steigert damit die MLK-Phosphorylierung oder sie aktiviert andere Proteinkinasen, z.B. MAPKAPK-1b oder MAPKAPK-2, die anschließend die MLK phosphorylieren (Morrison et al., 1996; Klemke et al., 1997; Suizu et al., 2000; Kamm und Stull, 2001; D'Angelo und Adam, 2002).

Aber auch die p42/p44 MAPK-bedingte Phosphorylierung von Caldesmon ist eine mögliche Ursache für ihre Wirkung auf den Kontraktionsapparat in der glatten Muskulatur und in Endothelzellen (Adam und Hathaway, 1993; Katoch und Moreland, 1995; Dessy et al., 1998; Liu et al., 2001). Dabei konnten D'Angelo und Adam (2002) an Segmenten von Carotisarterien vom Schwein zeigen, dass die Beteiligung der p42/p44 MAPK an der isometrischen Kraftentwicklung vielmehr über eine MLK-Phosphorylierung läuft, als über eine Phosphorylierung von Caldesmon.

Ein anderes mögliches Substrat von p42/p44 MAPK ist das Aktin-bindende Protein Cortactin, das z.B. die Arp 2/3-vermittelte Aktinpolymerisation in verschiedenen Zelltypen stimuliert und stabilisiert (Campbell et al., 1999; Weed und Parsons, 2001). Li et al. (2000) berichten, dass H₂O₂ in Endothelzellen Src-abhängig

zu einer Cortactinphosphorylierung und zu Zytoskelettveränderungen führt, was beides durch eine Hemmung des MEK/MAPK-Signalweges deutlich gesteigert werden konnte. Dudek et al. (2002, 2004) zeigen darüber hinaus in Endothelzellen eine Interaktion zwischen Cortactin und MLK-Kinase.

Verschiedene Arbeitsgruppen berichten, dass die p42/p44 MAPK an der Kontrolle der endothelialen Permeabilität beteiligt ist (Kevil et al., 2000; Verin et al., 2000; Varma et al., 2002; Borbiev et al., 2003). Auch auf die VEGF-induzierte Hyperpermeabilität soll sie Einfluss nehmen (Kevil et al., 1998; Lal et al., 2001; Breslin et al., 2003; Wu et al., 2005). Dabei zeigen Kevil et al. (1998), dass VEGF über p42/p44 MAPK zu einer Desorganisation und Instabilität von Occludinen und VE-Cadherinen an den Zell-Zell-Verbindungen führt und so eine interendotheliale Spaltenbildung herbeiführt. Auch andere Arbeitsgruppen vermuten, z.B. in Glattmuskel-, Epithel- und Endothelzellen, einen Effekt der p42/p44 MAPK auf verschiedene Komponenten der Adhäsionsstrukturen und darüber einen Einfluss auf die Stabilität von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen (Kinugasa et al., 2000; Ma et al., 2003; Wu und Sheibani, 2003; Huang et al., 2004; Wang et al., 2004).

Es wird somit deutlich, dass die p42/p44 MAPK sehr viele und sehr unterschiedliche Funktionen katalysiert. Während ihre Wirkung auf Proliferation und Differenzierung schon seit langem bekannt ist, häufen sich in den letzten Jahren durch Untersuchungen an verschiedenen Zellarten die Hinweise auf ihre Beteiligung an der Regulation des Zytoskeletts und der Adhäsionsstrukturen. Wie genau eine solche Beeinflussung von Kontraktion, Migration und Permeabilität in Endothelzellen durch p42/p44 MAPK vermittelt, evtl. sogar koordiniert wird, ist weitgehend ungeklärt.

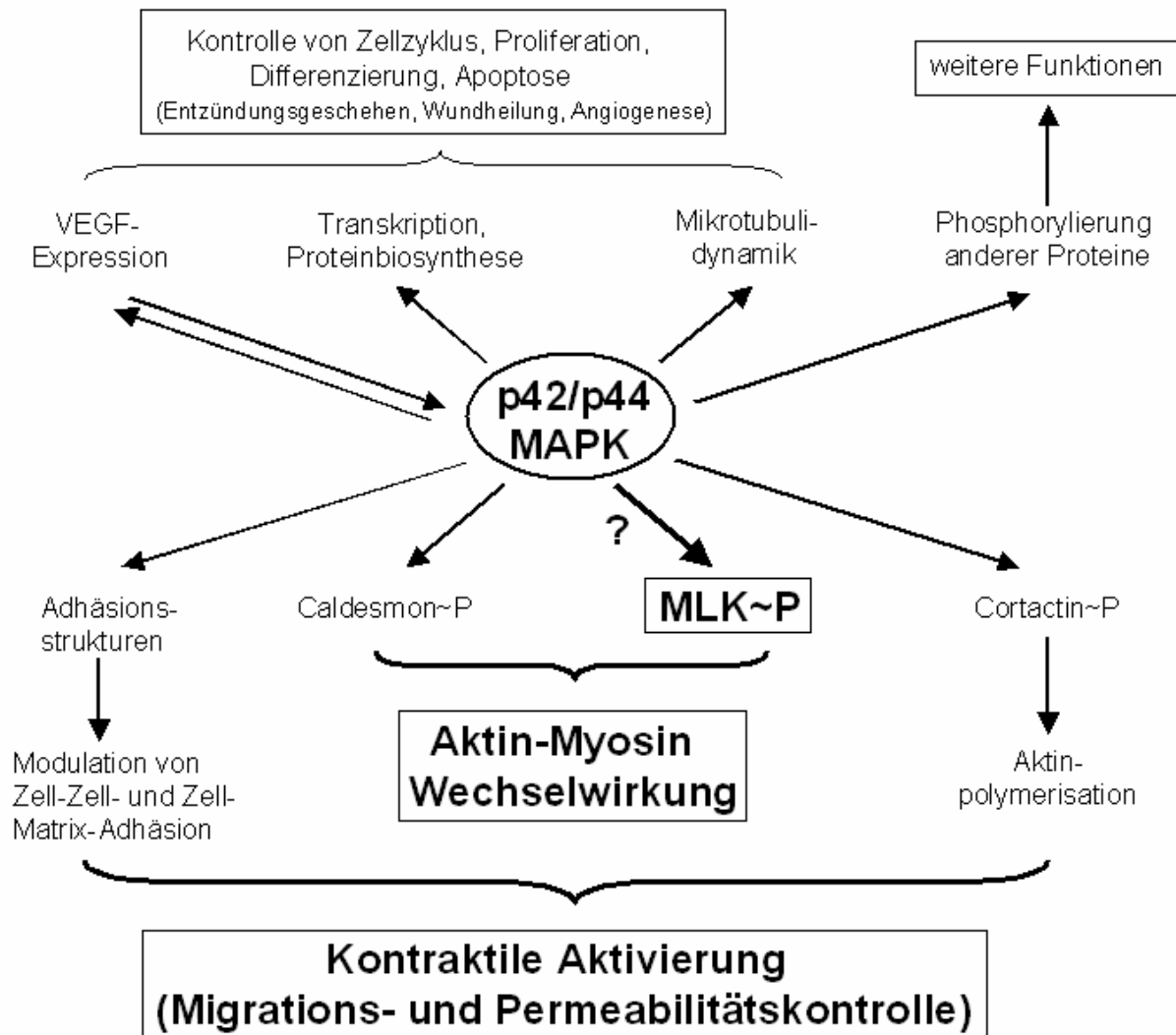


Abb. 1.3: Schematische Darstellung möglicher p42/p44 MAPK-Funktionen.

Die p42/p44 MAPK ist vor allem für ihre mitogenen Effekte bekannt. Sie nimmt über die Regulation von Transkription, Proteinbiosynthese, Mikrotubulidynamik und VEGF-Expression entscheidenden Einfluss auf den Zellzyklus, die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose. Darüber hinaus ist sie in der Lage, zahlreiche andere Proteine zu phosphorylieren, wobei zunehmend ihre Bedeutung für die Regulation des kontraktiven Apparates, der Zellmigration und der Permeabilität deutlich wird. Durch die Modulation von Adhäsionsstrukturen nimmt sie Einfluss auf die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion und es ist anzunehmen, dass sie über die Phosphorylierung von Cortactin (Cortactin~P) an der Aktinpolymerisation beteiligt ist. Zu einer direkten Beeinflussung der Aktin-Myosin-Wechselwirkung kommt es vermutlich über die Steigerung der MLK-Phosphorylierung (MLK~P) oder über die Phosphorylierung von Caldesmon (Caldesmon~P).

1.4.3 Aktivierung der p42/p44 MAPK über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die p42/p44 MAPK, außer über den bekannten RTK-Weg, Zytokin-Rezeptoren und Integrine, auch über verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden kann (Sugden und Clerk, 1997; Luttrell et al., 1997; Soltoff, 1998; Short et al., 2000; Liebmann, 2001). Es werden dabei mindestens vier prinzipielle Wege diskutiert, die in verschiedenen Zellen beschrieben wurden und wahrscheinlich auch in der Endothelzelle ablaufen können:

1. Transaktivierung: RTK wird nicht von einem eigenen Liganden, sondern über einen aktivierten GPCR phosphoryliert. Dabei sind verschiedene Signalwege vom GPCR möglich, die z.B. über die PI3-Kinase, Pyk2 und Src-Familien laufen und schließlich zur Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung der RTK führen. Daran schließt sich die klassische MAPK-Kaskade über Ras und Raf an.

2. PKC-abhängiger Signalweg: Dieser Signalweg verläuft unabhängig von RTK und Ras und läuft mit der MAPK-Kaskade auf der Ebene von Raf zusammen.

3. PKA-abhängiger Signalweg: Manche GPCR können p42/p44 MAPK über den cAMP/PKA-Signalweg aktivieren oder inhibieren. In vielen Zelltypen hemmt PKA den Ras-Signalweg durch Hemmung von Raf. In anderen Zellen wiederum kann PKA die MAPK z.B. über eine andere Raf-Isoform aktivieren (Sugden und Clerk, 1997; Bornfeldt und Krebs, 1999; English et al., 1999; Short et al., 2000; Liebmann, 2001).

4. Scaffoldproteine: Da es eine große Anzahl von Stimuli, MAPK-Signalwegen und MAPK-Funktionen sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma gibt, liegt die Frage nahe, wie ein effizienter, spezifischer Reaktionsablauf gewährleistet sein kann. In diesem Zusammenhang wurden, zunächst in der Hefe und in jüngster Zeit auch in der Säugetierzelle, Gerüstproteine, sogenannte Scaffoldproteine, beschrieben, die individuell einzelne oder alle drei MAPKKK-MAPKK-MAPK-Signalkomponenten binden können und somit zu einem einzigen Signalkomplex (Modul) zusammenfassen. Diese Scaffoldproteine haben dabei entweder alleinige Gerüstfunktion oder sie sind selbst Teil der Signalkaskade (Pawson und Scott, 1997; Whitmarsh und Davis, 1998; Kyriakis und Avruch, 2001; Pierce et al., 2001). Scaffoldproteine können sowohl von RTK als auch von GPCR aktiviert werden. Sie wandern dann zum Rezeptor und bringen den jeweiligen Signalkomplex mit. Pouyssegur (2000) beschreibt am Beispiel von β -Arrestin 2, dass das Scaffoldprotein

nicht nur dazu führt, dass die MAPK-Kaskade abläuft, sondern es führt auch zur G-Protein-Auskopplung und somit zur Abschwächung des ersten Rezeptorsignals. Scaffoldproteine sind möglicherweise auch dafür verantwortlich, ob die aktivierte p42/p44 MAPK in den Zellkern wandert oder im Zytosol wirkt (Pouysségur, 2000; Tohgo et al., 2002).

Über GPCR vermittelte MAPK-Aktivierung bedeutet also, dass nicht nur Hormone und Wachstumsfaktoren die p42/p44 MAPK aktivieren können, sondern auch Peptide, Neurotransmitter, Adeninnukleotide, Proteasen, wie Thrombin, und biogene Amine, wie Histamin und Serotonin (Short et al., 2000; Liebmann, 2001). Aufgrund dieser Tatsache sind diese Mediatoren im Rahmen des Entzündungsgeschehens und der Wundheilung wahrscheinlich auch in der Lage, in Endothel- und Nicht-Endothelzellen, über die MAPK-Kaskade Einfluss auf Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Migration und Angiogenese zu nehmen. Die Untersuchungen hierzu stehen erst an ihrem Anfang.

1.5 Ziel und Fragestellungen der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse möglicher Signalwege von extrazellulärem ATP auf den kontraktilem Apparat von Endothelzellen. Verschiedene Stimuli, die entweder die MLK-Kinase aktivieren oder die MLK-Phosphatase inhibieren, sind bereits untersucht worden. Mit extrazellulärem ATP konnte zum ersten Mal ein Rezeptor-vermittelter Stimulus identifiziert werden, welcher die MLK-Phosphatase aktiviert und dadurch die endotheliale Schranke stabilisiert. Das zentrale Ziel ist es, diese ATP-Wirkung zu steigern. Die bisherige Analyse von intrazellulären Signalwegen in Endothelzellen zeigte, dass ATP über eine Ca^{2+} -unabhängige Aktivierung der MLK-Phosphatase eine Dephosphorylierung der MLK bewirkt. ATP aktiviert aber ebenso, über einen Ca^{2+} -abhängigen Mechanismus, die MLK-Kinase. In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob in Endothelzellen der MLK-Kinase-vermittelte Teil des ATP-Signalweges über die Signalkaskade der p42/p44 MAPK vermittelt wird und ob durch dessen Hemmung die ATP-Wirkung auf den Kontraktionsapparat gesteigert werden kann.

Die Untersuchungen wurden an kultivierten Endothelzellen aus der Aorta des Schweines durchgeführt. Die Analyse konzentrierte sich auf die p42 MAPK, da p42

und p44 MAPK gewöhnlich in Endothelzellen koreguliert werden. Der Aktivierungszustand der p42 MAPK wurde über die Bestimmung des Phosphorylierungsgrades dieser Proteinkinase bestimmt. Der Aktivierungszustand des endothelialen kontraktile Apparates wurde über den Phosphorylierungszustand der MLK gemessen.

Dabei wurde insbesondere folgenden Fragen nachgegangen:

1. Führt extrazelluläres ATP zu einer Phosphorylierung der p42/p44 MAPK in porcinen aortalen Endothelzellen?
2. Wird diese Phosphorylierung über MEK 1/2 vermittelt?
3. Ist die Phosphorylierung der p42 MAPK ein direkter ATP-Effekt oder wird er durch seine Abbauprodukte über Adenosin-Rezeptoren vermittelt?
4. Ist die Phosphorylierung der p42 MAPK von dem ATP-induzierten intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg abhängig?
5. Nehmen Inhibitoren des MEK/MAPK-Signalweges Einfluss auf die ATP-vermittelte Aktivierung der MLK-Kinase?
6. Lässt sich die ATP-induzierte Aktivierung der MLK-Phosphatase durch MEK-Inhibitoren hemmen?

Die Hypothese war, dass ATP über eine Aktivierung der p42/p44 MAPK die MLK-Kinase aktiviert. Der Nachweis eines solchen Signalweges würde es ermöglichen, diesen Teil der ATP-Wirkung zu unterdrücken und die ATP-induzierte Wirkung der MLK-Phosphatase auf die MLK-Phosphorylierung zu verstärken. So könnte die relaxierende und gefäßabdichtende Wirkung von extrazellulärem ATP auf Endothelzellen gesteigert werden.

Desweiteren würde ein Nachweis der Beteiligung der p42/p44 MAPK an der MLK-Phosphorylierung dazu beitragen, die Funktionen der p42/p44 MAPK und ihre zentrale Rolle bei Migration, Permeabilität und Angiogenese besser zu verstehen.

2 Material

2.1 Chemikalien

2.1.1 Häufig verwendete Chemikalien

Acrylamid	Eurobio, Les Ulis Cedex B, Frankreich
Acrylamidlösung ,plusone [®] (40 %)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
APS	Serva, Heidelberg
Benzonase [®]	Merck, Darmstadt
BCIP	Applichem, Darmstadt
Bisacrylamid	Eurobio, Les Ulis Cedex B, Frankreich
Bisacrylamidlösung ,plusone [®] (2 %)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
BSA	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Cantharidin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Carbogen [®]	Messer Griesheim, Krefeld
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
DTT	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
ECL-Lösung (=SuperSignal [®] West Pico Chemiluminescent Substrate)	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
EDTA-Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ethanol	Riedel de Haën, Seelze
Glycerol (87 %) ,plusone [®]	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Glycerol (99,5 %)	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff ,plusone [®]	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
HEPES	Roche Diagnostics, Mannheim
Imidazol	Merck, Darmstadt
Medium 199/Earl's Salts	Biochrom AG, Berlin
Mercaptopropandiol	Merck, Darmstadt
Methanol	Riedel de Haën, Seelze

Material

Natriumchlorid (99,5 %)	Roth, Karlsruhe
Natriummonovanadat	Merck, Darmstadt
NBT	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
NCS	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Ponceau S solution	Serva, Heidelberg Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Saccharose	Merck, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg
TCA	Merck, Darmstadt
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Thioglykolat (Natriumsalz)	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Tris/HCl	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin-EDTA-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.2 Agonisten und Inhibitoren

8-Phenyltheophyllin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
ATP	Roche Diagnostics, Mannheim
BAPTA/AM	Calbiochem, Schwalbach
Calyculin A	Calbiochem, Schwalbach
ML-7, Hydrochlorid	Calbiochem, Schwalbach
NECA	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
PD 98059	Calbiochem, Schwalbach
PMA	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
U0 124	Calbiochem, Schwalbach
U0 126	Calbiochem, Schwalbach
Xestospongin C	Calbiochem, Schwalbach

2.1.3 Molekulargewichtsmarker

Laktat-Dehydrogenase-Marker (Kaninchenmuskel, farbmarkiert)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Molekulargewichts-Marker (MW-SDS-70L)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

2.1.4 Antikörper

Anti-Kaninchen-IgG (AP-gekoppelt)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Anti-Kaninchen-IgG (HRP-gekoppelt)	Amersham Biosciences, Freiburg
Anti-Maus-IgG (HRP-gekoppelt)	Amersham Biosciences, Freiburg
Anti-Maus-IgM (μ -Ketten-spezifisch, AP-gekoppelt)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Anti-MLK (Maus, monoklonal, IgM, Klon MY-21)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Anti-p42 MAPK (=Anti-ERK2 (C-14), Kaninchen, polyklonal, IgG)	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
Anti-p42/p44 MAPK (=Anti-MAPK, ERK1/ERK2, Kaninchen, polyklonal, IgG)	Calbiochem, Schwalbach
Anti-phospho p42/p44 MAPK (Maus, monoklonal, IgG)	Calbiochem, Schwalbach

Alle übrigen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen) und Merck (Darmstadt) bezogen und waren von höchster erhältlicher Qualität. Die Substanzen wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

2.2 Geräte und Laborbedarf

2.2.1 Zellkultur

Präparationsbesteck	Aeskulap, Heidelberg
Sterilbank	Typ: Lamin Air HBB 2472, Heraeus, Hanau
Brutschrank	Typ: Cytoperm, Heraeus, Hanau
Mikroskop	Typ: TMS-F, Nikon, Düsseldorf
Neubauer-Zählkammer	Superior, Marienfeld

2.2.2 Gelelektrophorese

Netzgeräte	Typ: High Voltage Power Pack P30, Biometra, Göttingen Typ: EPS 3501 XL, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Elektrophoresekammern für SDS-Gele	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Elektrophoresekammern für Glycerol-Harnstoffgele	Typ: Minigelsystem, SE250/SE260 Hoefer + Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Elektroblotkammern	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Hamiltonspritze (50 µl)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz

2.2.3 Sonstige Geräte

Digitalkamera	ChemiDoc EQ System, Bio-rad, München
Glasgeräte	Schott, Mainz
Heizer	Techne, Burkhardtsdorf
Magnet-Heizrührer	IKA-Werke, Staufen
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Material

Schüttler	Typ: WT 12, Biometra, Göttingen
Vortexer	IKA-Werke, Staufen
Wasserbad	Julabo Labortechnik, Seelbach
Wasserdemineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn
Zentrifuge	Typ: Biofuge 15R, Heraeus, Hanau

2.2.4 Verbrauchsmaterialien

Parafilm®	PECHINEY Plastic Packaging, Menasha, WI, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Primaria-Zellkulturschalen	Typ: Falcon 353803, Becton Dickinson, Heidelberg
PVDF-Blotmembran	Typ: Immobilon-P Transfer Membranes, Millipore, Eschborn
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (0,5/2 ml)	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Röhrchen, 10 ml	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
Röhrchen, 50 ml	Typ: Falcon: 352070, Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter (0,2 µm Porenweite)	Sartorius, Göttingen
Trockenpapier	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Zellkulturschalen	Typ: Falcon 353001, Becton Dickinson, Heidelberg
Zellschaber	Typ: Falcon 353087, Becton Dickinson, Heidelberg

2.2.5 Auswertung

Flachbettscanner	Typ: Scan jet 4c Hewlett Packard, Eschborn
------------------	---

Material

Software

Image Quant[®], Molecular Dynamics, Krefeld
Quantity One 4.4.1 (ChemiDoc EQ System),
Bio-rad, München
Microsoft Excel 97
Corel Draw 11

3 Methoden

3.1 Isolation und Kultivierung von aortalen Endothelzellen

Aortenendothelzellen wurden aus Aorten von frisch geschlachteten, ca. 6 Monate alten Schlachtschweinen vom nächstgelegenen Schlachthof isoliert (Spahr und Piper, 1990). Unmittelbar nach der Schlachtung wurden von zwanzig Tieren ca. 20 cm lange Aortenstücke entnommen. Diese wurden in 0,9 %iger NaCl-Lösung zum Institut transportiert. Eine Stunde später wurden die Aortensegmente von Bindegewebe freipräpariert, in Längsrichtung aufgeschnitten und auf einer Styropor-Unterlage aufgespannt. Nach zweimaligem Spülen mit frischer physiologischer NaCl-Lösung wurde die Endothelzellschicht mit einem Skalpell unter leichtem Druck abgeschabt und in 37 °C warmes Zellkultumedium mit erhöhtem 5 %igem Antibiotikumgehalt (Penicillin-Streptomycin) überführt. Die gewonnenen Zellen wurden für 10 Minuten bei 150 x g (1000 Upm) zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 40 ml Zellkultumedium mit gleichem Antibiotikumgehalt durch Auf- und Absaugen mit einer 10 ml Glaspipette gründlich resuspendiert. In fünf 10 cm große Primaria-Zellkulturschalen wurden 20 ml desselben Zellkultumediums vorgegeben und in jede Schale wurden danach 8 ml der Zellsuspension mäanderförmig aufgetragen. Die Endothelzellen wurden bei 37 °C und in Gegenwart von 5 % (vol/vol) CO₂ inkubiert. Nach 3 Stunden wurde das Medium gewechselt, um nicht anhaftende Zellen zu entfernen.

Am zweiten Tag wurde das Zellkultumedium durch ein basales Zellkultumedium ausgetauscht, welches 2 % an Antibiotika enthielt. Am vierten Tag waren die Zellen zu einer konfluenten Schicht ausgewachsen und konnten subkultiviert werden. Nach Absaugen des Kultumediums wurden die Endothelzellen zweimal durch leichtes Schwenken in HEPES/EDTA-Puffer gewaschen und danach für 5 Minuten in 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Anschließend wurde die tryptische Verdauung durch Zugabe von Zellkultumedium gestoppt. Die Zellen wurden sowohl zur Bestimmung der MAPK-Phosphorylierung als auch zur Bestimmung der MLK-Phosphorylierung in einer Dichte von 7×10^4 Zellen/cm² auf 3,5 cm Inkubations-Kulturschalen ausgesät. Nach 4 Tagen erreichten sie Konfluenz (Abb. 3.1 (B)) und wurden im Experiment eingesetzt.

Methoden

M199/CO₂-Medium: (pH 7,4; sterilfiltriert)

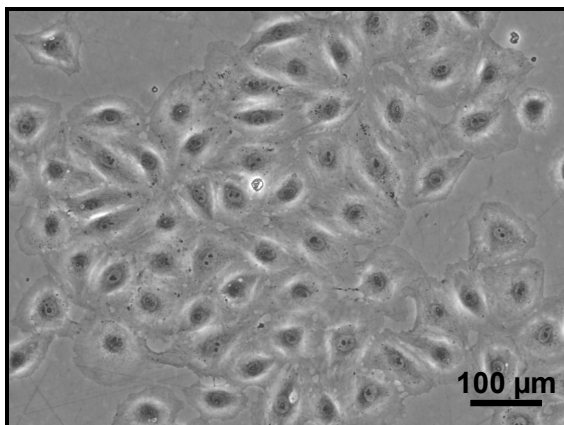
Medium 199/Earl's Salts	9,62 g/l
HEPES	15 mM
NaHCO ₃	24 mM
Carbogen [®]	für mindestens 1 Stunde begasen

Zellkulturmedium:

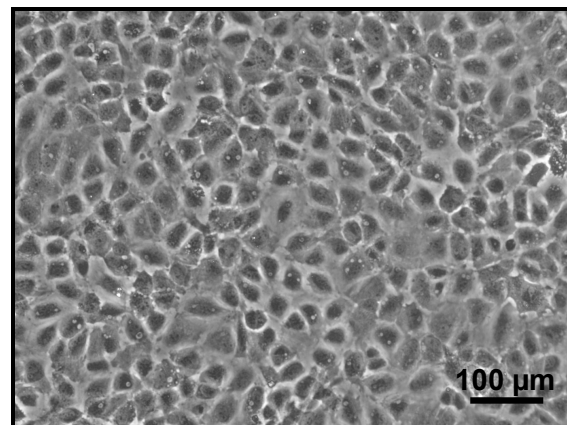
M199/CO ₂ -Medium	x ml
NCS	20 % (vol/vol)
Penicillin-Streptomycin	2 % (vol/vol)

HEPES/EDTA-Puffer: (pH 7,4; sterilfiltriert)

NaCl	125 mM
KCl	2,6 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
MgSO ₄	1,2 mM
HEPES	10 mM
EDTA-Na ⁺	0,5 mM



A



B

Abb. 3.1: Kultivierte Aortenendothelzellen vom Schwein (aus Peters et al., 2005).

Gezeigt werden repräsentative Ausschnitte einer Phasenkontrastaufnahme von (A) noch nicht konfluenten Endothelzellen und (B) Zellen einer konfluenten Zellschicht, die für Experimente eingesetzt wurden.

3.2 Allgemeine Inkubationsbedingungen

Für die Analyse der MAPK- und der MLK-Phosphorylierung wurden konfluente Aortenendothelzellen in 3,5 cm Kulturschalen eingesetzt (3.1). Vor Inkubationsbeginn wurde das Medium abgesaugt und durch Ca^{2+} -haltiges HEPES-Inkubationsmedium ersetzt.

HEPES-Inkubationsmedium mit Ca^{2+} : (pH 7,4; sterilfiltriert)

NaCl	125 mM
KCl	2,6 mM
KH_2PO_4	1,2 mM
MgSO_4	1,2 mM
HEPES	30 mM
CaCl_2	1,0 mM

Die Inkubation wurde gestartet, indem das zu untersuchende Agens in die Kulturschale hineinpipettiert und durch leichtes Schwenken verteilt wurde. Die Schalen wurden im CO_2 -freien Brutschrank bei 37° C inkubiert. Wie unter 3.3 beschrieben wurde die Reaktion gestoppt und die Zellen geerntet.

Von PD 98059, U0 126, U0 124, NECA, BAPTA/AM, Xestospongine C, Calyculin A and ML-7 wurden DMSO-Stocklösungen verwendet. Die endgültig gelösten DMSO-Konzentrationen waren < 0,1 % (vol/vol). Die gleichen Endkonzentrationen von DMSO enthielten auch alle jeweiligen Kontrollen.

3.3 Bestimmung der p42/p44 MAPK-Phosphorylierung

3.3.1 Aufbereitung der Proben für SDS-PAGE

Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden durch Zugabe von 300 μl Lysispuffer lysiert. Anschließend wurden den Zellkulturschalen Benzonase[®] (5 U/ml) und 30 μl einer Bromphenolblau-Glycerol-Lösung (0,01 %/10 %) zugegeben und die Schalen wurden für ca. 30 Minuten auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Zellen mit einem Einwegschaaber

abgeschabt, in je ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 65 °C für 7 Minuten erhitzt. Die Proben wurden entweder sofort weiterverarbeitet (3.3.2) oder bei –20 °C gelagert.

Lysispuffer (SDS-PAGE): (pH 6,7)

Tris/HCl	50 mM
SDS	2 % (wt/vol)
Mercaptopropandiol	2 % (vol/vol)
Natriummonovanadat	1 % (vol/vol)

3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Gesamtzellextrakte erfolgte anhand einer modifizierten diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970). Protokoll 1 ermöglichte die Auftrennung der nicht-phosphorylierten von den phosphorylierten Formen der MAPK, da letztere eine geringfügig größere Molekülgröße und verminderte Gelmobilität besitzen. Aufgrund der Spezifität des Antikörpers wurden jedoch nur p42 MAPK und p42 MAPK~P erkannt. Protokoll 2 ermöglichte die Auftrennung von p42 und p44 MAPK anhand eines Standard-SDS-PAGE-Verfahrens.

Die für den Aufbau der Gelkassette benötigten Materialien wurden vorher gründlich gereinigt und mit 70 %igem Alkohol entfettet. Die Glasplatten, zwischen die das Gel gegossen werden sollte, wurden seitlich mit zwei 1 mm dicken Spacern begrenzt und nach unten durch einen 1 mm starken Silikonschlauch abgedichtet. In dieser Form wurden die Glasplatten mit Klammern an der vertikalen Elektrophoresekammer befestigt. Die Trenngellösung wurde nun nach kurzem gründlichen Mischen luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen und vorsichtig mit Aqua bidest. überschichtet. Nach zweistündiger Polymerisation wurde das Wasser dekantiert, die Sammelgellösung auf das Trenngel gegossen und der Profilvermer für die Taschen eingesetzt. Nach 20 Minuten wurden der Silikonschlauch und der Profilvermer entfernt. Die Elektrophoresekammer wurde in ein mit Laufpuffer gefülltes Gefäß gestellt und die obere Aussparung der Kammer wurde ebenfalls mit

Methoden

Laufpuffer versehen.

Für die Untersuchungen der MAPK nach Protokoll 1 wurde ein 12,5 %iges Trenngel (Acrylamid/Bisacrylamid 100:1) verwendet und für die Untersuchungen nach Protokoll 2 ein 10 %iges Trenngel (Acrylamid/Bisacrylamid 30:1). Das Sammelgel war jeweils 6 %ig. Von jeder Probe wurden jeweils 30 µl Lysat mit einer Hamiltonspritze in eine Geltasche gegeben. Zur Bestimmung des Molekulargewichts und zur Laufkontrolle wurde stets auch ein Molekulargewichtsmarker (LDH-Marker) pro Gel aufgetragen.

Für Protokoll 1 wurde die SDS-Gelelektrophorese bei Raumtemperatur über Nacht bei 55 Volt und für weitere 2-3 Stunden bei 200 Volt durchgeführt. Der Gellauf wurde 1,5 cm vor Auslaufen des LDH-Markers gestoppt. Für Protokoll 2 wurde die SDS-Gelelektrophorese bei Raumtemperatur über Nacht bei 40 Volt durchgeführt. Der Gellauf wurde kurz nach Auslaufen der Lauffront gestoppt.

Trenngel 12,5 %:

AA/BisAA (100:1); 30 %ig	17,5 ml
Trenngelpuffer	10,5 ml
Aqua bidest.	14 ml
SDS 10 % (wt/vol)	450 µl
TEMED	20 µl
APS 10 % (wt/vol)	200 µl

Trenngel 10 %:

AA/Bis AA (30:1); 30 %ig	13,6 ml
Trenngelpuffer	9,5 ml
Aqua bidest.	13,8 ml
SDS 10 % (wt/vol)	400 µl
TEMED	30 µl
APS 10 % (wt/vol)	400 µl

Methoden

Sammelgel 6 %:

AA/Bis AA (30:1); 30 %ig	4 ml
Sammelgelpuffer	5 ml
Aqua bidest.	10,4 ml
SDS 10 % (wt/vol)	200 µl
TEMED	25 µl
APS 10 % (wt/vol)	250 µl

Die Mengenangaben für das Trenngel bzw. Sammelgel beziehen sich auf die Menge, die für eine Gelkassette mit zwei Gelen benötigt wurde.

4 x Trenngelpuffer: (pH 8,8)

Tris/HCl	1,5 M
SDS	0,4 % (wt/vol)

Sammelgelpuffer: (pH 6,8)

Tris/HCl	0,5 M
SDS	0,4 % (wt/vol)

Laufpuffer:

Glycin	192 mM
Tris/HCl	24,8 mM
SDS	3,5 mM

3.3.3 Western-Blot

Die in den Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch im ‚Semi-Dry-Blotting-Verfahren‘ auf PVDF-Membranen transferiert (Kyhse-Andersen, 1984).

Eine PVDF-Membran und sechs Trockenpapiere wurden in Gelgröße ausgeschnitten. Die PVDF-Membran wurde 30 Sekunden mit Methanol benetzt, dann für 2 Minuten in Aqua bidest. äquilibriert und anschließend für 10 Minuten in Blotpuffer geschwenkt. Drei in Blotpuffer getränkte Trockenpapiere wurden

luftblasenfrei auf die angefeuchtete Anode der Blotkammer aufgebracht. Ebenso luftblasenfrei wurden dann die PVDF-Membran und anschließend das Polyacrylamidgel aufgelegt. Zum Schluss folgten die anderen drei in Blotpuffer getränkten Trockenpapiere und die Kathodenseite der Kammer wurde aufgesetzt. Der Proteintransfer auf die PVDF-Membran erfolgte mit konstanter Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur. Nach dem Blotten wurde das Polyacrylamidgel verworfen und die Membran nach zweiminütigem Schwenken in Aqua bidest. kurz mit Methanol entwässert, luftgetrocknet und bis zur Entwicklung bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

Sollte eine Membran vor der Entwicklung geteilt werden, um sie mit unterschiedlichen Antikörpern entwickeln zu können, wurden die Proteine mittels Ponceaurot-Färbung auf der Membran dargestellt. Eine Entfärbung der Membran vor der weiteren Entwicklung war nicht notwendig.

Blotpuffer: (pH 8,3)

Tris/HCl	25 mM
Glycin	150 mM
Methanol	10 % (vol/vol)

3.3.4 Immunologischer Nachweis der p42/p44 MAPK-Phosphorylierung

Nach erfolgtem Proteintransfer (3.3.3) wurde die p42 MAPK sowie die p44 MAPK mit ihrer nicht-phosphorylierten und ihrer phosphorylierten Form mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Hierfür wurde die PVDF-Membran kurz mit Methanol benetzt und 2 Minuten in Aqua bidest. äquilibriert. Unspezifische Proteinbindungsstellen wurden durch einstündige Membraninkubation in einer 3 %igen BSA/TBS-Lösung bei Raumtemperatur geblockt.

TBS-Puffer: (pH 7,4)

Tris/HCl	10 mM
NaCl	150 mM

Methoden

Danach wurde die PVDF-Membran entweder mit Anti-p42 MAPK, mit Anti-p42/p44 MAPK oder mit dem phosphorylierungsspezifischen Anti-phospho p42/p44 MAPK für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Erst-Antikörper-Lösungen: (pH 7,4)

Anti-p42 MAPK	45 µl	(1:1000)
Anti-p42/p44 MAPK	45 µl	(1:1000)
Anti-phospho p42/p44 MAPK	90 µl	(1:500)
jeweils in		
TBS-Puffer	45 ml	
BSA	3 % (wt/vol)	
Triton X-100	0,1 % (vol/vol)	

Die Erst-Antikörper-Lösungen konnten mehrmals wiederverwendet werden und wurden zwischenzeitlich bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Nach der Inkubation wurde die PVDF-Membran dreimal für 5 Minuten in TBS-Puffer, versetzt mit 0,1 % (vol/vol) Triton X-100, gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Es folgte eine einstündige Inkubation der Membran in der Zweit-Antikörper-Lösung.

Zweit-Antikörper-Lösungen: (pH 7,4)

Anti-Kaninchen-IgG (AP-gekoppelt)	22,5 µl	(1:2000)
Anti-Kaninchen-IgG (HRP-gekoppelt)	22,5 µl	(1:2000)
Anti-Maus-IgG (HRP-gekoppelt)	22,5 µl	(1:2000)
jeweils in		
TBS-Puffer	45 ml	
BSA	3 % (wt/vol)	
Triton X-100	0,1 % (vol/vol)	

Die Membran wurde dreimal für 5 Minuten in TBS-Puffer, diesmal versetzt mit 0,5 % (vol/vol) Triton X-100, und daraufhin noch einmal für 10 Minuten in einer 10 mM Tris/HCl-Lösung gewaschen.

Methoden

(1) Sollte die Membran mit Alkalischer Phosphatase entwickelt werden (AP-gekoppelter Zweit-Antikörper), wurde die Membran in die AP-Lösung gegeben und unter Sichtkontrolle für 1-10 Minuten im Dunkeln entwickelt.

AP-Puffer: (pH 9,55)

Tris/HCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM
NaCl	10 mM

AP-Lösung: (lichtempfindlich)

AP-Puffer	30 ml
NBT	15 mg
BCIP	7,5 mg

Die AP-Lösung wurde vor jeder Verwendung frisch angesetzt. Die Mengenangaben gelten für die Entwicklung von bis zu vier Membranen.

Der Nachweis der nicht-phosphorylierten und phosphorylierten Form der MAPK erfolgte durch eine AP-katalysierte Farbreaktion mit BCIP und NBT als Substrat. Die Reaktion wurde mit Aqua bidest. gestoppt. Anschließend wurde die Membran luftgetrocknet.

(2) Sollte die Membran mit dem Verfahren der ECL entwickelt werden (HRP-gekoppelter Zweit-Antikörper), wurde die Membran unter Lichtausschluss für 1-2 Minuten in 5 ml der ECL-Lösung geschwenkt und dann feucht auf eine Glasplatte gelegt und mit einer Frischhaltefolie überspannt. Während der Membranentwicklung wurde innerhalb eines Zeitraumes von 15 Minuten jede Minute von einer Digitalkamera ein Digitalbild aufgenommen und mit der Software Quantity One 4.4.1 die linear ansteigende Bandenintensität verfolgt. Für die Quantifizierung wurden nur die Intensitäten der Banden eines Bildes, aufgenommen während des linearen Anstieges, herangezogen.

Die lichtempfindliche ECL-Lösung wurde nach Herstellerangaben gemischt und vor jeder Entwicklung frisch angesetzt.

Der Nachweis der MAPK-Banden erfolgte durch eine Reaktion von HRP mit der ECL-Lösung. Diese Reaktion führte zum chemilumineszenten Leuchten der MAPK-Banden, welches mit der Digitalkamera festgehalten werden konnte.

Nach Anfertigung der Digitalbilder wurde die PVDF-Membran für 30 Minuten wieder in TBS-Puffer gewaschen, luftgetrocknet und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Sie konnte zur weiteren ECL-Entwicklung mit anderen HRP-gekoppelten Antikörpern verwendet werden.

3.3.5 Auswertung

Die mit AP entwickelten MAPK-Banden der PVDF-Membranen wurden mit einem Flachbettscanner digitalisiert und densitometrisch ausgewertet, wobei der jeweilige prozentuale Anteil der phosphorylierten und der nicht-phosphorylierten MAPK einer Probe mit der Auswertungssoftware Image Quant[®] berechnet wurde. Dieses Verfahren hatte den Vorteil, dass die MAPK-Phosphorylierung unabhängig vom Proteingehalt der aufgetragenen Proben bestimmt werden konnte. Die digitalen Bilder der mit ECL entwickelten MAPK-Blots wurden mit dem Auswertungsprogramm Quantity One 4.4.1 nach dem gleichen Prinzip ausgewertet. Die Diagramme wurden mit Microsoft Excel 97 und Corel Draw 11 erstellt.

Da nur die phosphorylierte p42 MAPK aktiv ist (Cobb und Goldsmith, 1995; Canagarajah et al., 1997), wurde der Grad der Phosphorylierung als Maß für die Aktivität der Kinase angesehen.

3.4 Bestimmung der MLK-Phosphorylierung

3.4.1 Aufbereitung der Proben für Harnstoff-Gelelektrophorese

Im Anschluss an die Inkubation wurde das Medium abgesaugt und jeweils 1 ml 10 %ige, eiskalte TCA auf die Kulturschalen gegeben. Die Schalen wurden für mindestens 30 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurden die ausgefällten Proteine mit einem Einwegschaaber abgeschabt und jeweils in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 38000 x g und 4 °C für 10 Minuten. Nachdem der Überstand vorsichtig abgesaugt worden war, wurden die Sedimente mit je 200 µl Äther versetzt, um die TCA und die Lipide zu entfernen. Wiederholt wurden die Proben für 5 Minuten bei 38000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und die Reaktionsgefäße mit den Sedimenten wurden zum Verdunsten des restlichen Äthers für 20 Minuten geöffnet unter den Abzug gestellt. Danach wurden die Proben über Nacht bei 0 °C gelagert.

Am folgenden Tag wurden die Proben in je 30 µl 37 °C warmem Lysispuffer und 3 µl einer Saccharose-Bromphenolblau-Lösung vollständig gelöst und zur elektrophoretischen Trennung auf Glycerol-Harnstoffgele aufgetragen (3.4.2).

Harnstoffgel-Puffer: (pH 8,8)

Tris/HCl	240 mM
Glycin	276 mM

Lysispuffer: (pH 8,8)

Harnstoff	8,8 M
DTT	10 mM
Thioglykolat	5 mM
Cantharidin	0,01 mM
Imidazol	60 mM
Harnstoffgel-Puffer	9,75 % (vol/vol)

Der Lysispuffer wurde unmittelbar vor jedem Versuch frisch angesetzt.

Saccharose-Bromphenolblau-Lösung:

gesättigte Saccharose-Lösung mit 0,01 % Bromphenolblau

3.4.2 Glycerol-Harnstoff-Gelelektrophorese

Die Glycerol-Harnstoff-Gelelektrophorese erfolgte nach Persechini et al. (1986) in einem Acrylamidgel (10 %) und ermöglichte eine Auftrennung in nicht-phosphorylierte, mono- und diphosphorylierte MLK aufgrund der Tatsache, dass die phosphorylierten MLK eine höhere negative Ladung besitzen und daher im Glycerol-Harnstoffgel schneller zur Anode wandern, als die unphosphorylierten MLK.

Die für den Aufbau benötigten Materialien wurden vor Gebrauch gründlich gereinigt und mit 70 %igem Alkohol entfettet. Die Gelkammer bestand aus einer Glas- und einer Aluminiumplatte und wurde auf drei Seiten durch Spacer geschlossen. Die Glycerol-Harnstoffgel-Lösung wurde 5 Minuten lang unter Rühren und Unterdruck entgast.

Glycerol-Harnstoffgel-Lösung:

Glycerol	20,7 ml
Acrylamidlösung (40 %)	11,25 ml
Bisacrylamidlösung (2 %)	9,5 ml
Harnstoffgel-Puffer	3,8 ml

Anschließend wurden 7,1 μ l TEMED und 200 μ l 10 %iges APS hinzugegeben, um die Polymerisation einzuleiten. Das Gel wurde zwischen die Glas- und Aluminiumplatte gegossen und ein Profilvermer wurde eingesetzt. Diese Gele enthielten 10 % Acrylamid und 0,4 % Bisacrylamid.

Nach 60-minütiger Polymerisation wurde der untere Spacer entfernt und die Platten mit dem Gel in die vertikale Elektrophoresekammer eingesetzt. Kathoden- und Anodenlaufpuffer wurden hinzugefügt und ein Elektrophoresevorlauf bei 400 Volt wurde für eine Stunde durchgeführt.

Methoden

Anodenlaufpuffer:

Harnstoffgel-Puffer	8,3 % (vol/vol)
Aqua bidest.	91,7 % (vol/vol)

Kathodenlaufpuffer:

Anodenlaufpuffer	x ml
DTT	2,4 mM
Thioglykolat	2,3 mM

Der Kathodenlaufpuffer wurde vor jedem Versuch frisch angesetzt. Für 3 Gelkammern mit insgesamt 6 Gelen wurde 1 l Anodenpuffer angesetzt, von dem 450 ml für den Kathodenpuffer benutzt wurden.

Je Geltasche wurde ein Probevolumen von 8 µl (20-40 µg Protein) aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 400 Volt für 75 Minuten. Währenddessen wurden die Gelkammern über eine Wasserkühlung auf 18 °C temperiert.

3.4.3 Western-Blot

Nach Beendigung der Glycerol-Harnstoff-Gelelektrophorese wurden die im Gel aufgetrennten Proteine im ‚Semi-Dry-Blotting-Verfahren‘ für eineinhalb Stunden bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Blotaufbau und die Membranbehandlung erfolgten wie unter 3.3.3 beschrieben.

3.4.4 Immunologischer Nachweis der MLK-Phosphorylierung

Nach erfolgtem Proteintransfer (3.3.3) wurden die nicht-, mono- und diphosphorylierten Formen der Myosinleichtketten mit einem MLK-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Dazu wurde die Membran zunächst für 30 Minuten in 3 %iger BSA/TBS-Lösung geblockt und anschließend bei Raumtemperatur für 3 Stunden mit dem Erst-Antikörper und danach für 1,5 Stunden mit dem Zweit-Antikörper inkubiert.

Methoden

Erst-Antikörper-Lösung:

Anti-MLK	45 µl	(1:1000)
TBS-Puffer	45 ml	
BSA	3 % (wt/vol)	
Triton X-100	0,1 % (vol/vol)	

Zweit-Antikörper-Lösung:

Anti-Mouse-IgM (AP-gekoppelt)	22,5 µl	(1:2000)
TBS-Puffer	45 ml	
BSA	3 % (wt/vol)	
Triton X-100	0,1 % (vol/vol)	

Die verschiedenen Entwicklungsschritte erfolgten wie unter 3.3.4 (1) beschrieben.

3.4.5 Auswertung

Die MLK-Banden wurden mit einem Flachbettscanner digitalisiert und densitometrisch ausgewertet. Der prozentuale Anteil der drei Phosphorylierungsstufen wurde mit der Auswertungssoftware Image Quant[®] berechnet. Der Prozentanteil phosphorylierter MLK (% MLK-Phosphorylierung) bezogen auf Gesamt-MLK wurde wie folgt berechnet:

$$\% \text{ MLK-Phosphorylierung} = \frac{2 \times \text{MLK}\sim\text{PP} + \text{MLK}\sim\text{P}}{\text{MLK} + \text{MLK}\sim\text{P} + \text{MLK}\sim\text{PP}} \times 100$$

Da die MLK zwei Phosphorylierungsstellen besitzt, kann die MLK-Phosphorylierung einen maximalen Wert von 200 % erreichen.

Die Methode ist unabhängig vom Proteingehalt der Einzelprobe, da der Phosphorylierungsgrad der MLK aus den relativen Intensitäten der Proteinbanden einer Auftragung ermittelt wird.

3.5 Statistik

Die quantitativen Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm der Standardabweichung (SD) aus n Experimenten mit unterschiedlicher Zellpräparation angegeben. Der Vergleich der Mittelwerte zwischen Gruppen wurde mit ‚One-Way Analysis of Variance‘ (ANOVA) durchgeführt, gefolgt von einem Student-Newman-Keul post hoc Test. Statistische Differenzen innerhalb der gleichen Gruppe wurden durch multiple ANOVA Analyse ermittelt. P-Werte von $< 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Steigerung der p42/p44 MAPK-Phosphorylierung in Gegenwart von ATP

Um die MAPK-Aktivierung zu ermitteln, wurde der Phosphorylierungsstatus dieses Proteins mit zwei unterschiedlichen SDS-PAGE Protokollen bestimmt, an die sich jeweils ein Western-Blot anschloss. Protokoll 1 erlaubte die gelelektrophoretische Auftrennung der nicht-phosphorylierten von der phosphorylierten (aktivierten) Form der MAPK, aufgrund der verminderten Gelmobilität der phosphorylierten Form. Dieses Verfahren hatte den Vorteil, dass der Grad der p42 MAPK-Phosphorylierung unabhängig vom Gesamtproteingehalt, der pro Geltasche aufgetragen wurde, bestimmt werden konnte. Der Nachweis der p42 MAPK-Phosphorylierung wurde mit einem Anti-p42 MAPK-Antikörper durchgeführt, der sowohl die nicht-phosphorylierte als auch die phosphorylierte Form der p42 MAPK erkennt (Abb. 4.1 A).

Die nach Protokoll 1 durchgeführten Experimente zeigten, dass die p42 MAPK-Phosphorylierung unter basalen experimentellen Bedingungen konstant bei 17 ± 3 % lag (Abb. 4.1 C). Die Zugabe von extrazellulärem ATP (10 μ M) führte zu einem raschen, aber vorübergehenden Anstieg der p42 MAPK-Phosphorylierung mit einem Maximum bei 53 ± 4 % nach 5 Minuten. Nach 30 Minuten erreichte der Anteil der phosphorylierten MAPK wieder annähernd das Ausgangsniveau. Die basale p42 MAPK-Phosphorylierung änderte sich im Verlauf des Beobachtungszeitraumes nicht (Abb. 4.1 C).

Protokoll 2 beruhte auf einer Auftrennung von Zellproteinen mittels 10 %iger SDS-PAGE, bei der die p42 MAPK von der p44 MAPK getrennt wurde. Der Nachweis der Gesamt-p42/p44 MAPK sowie deren Phosphorylierung erfolgte mittels Western-Blots unter Verwendung von Anti-p42/p44 MAPK- bzw. anti-phospho p42/p44 MAPK-Antikörpern (Abb. 4.1 B). Wie in Abb. 4.1 B gezeigt, steigerte extrazelluläres ATP gleichzeitig die Phosphorylierung der p42 und p44 MAPK. Diese Befunde belegen, dass beide MAPK-Isoformen durch ATP koreguliert werden. Die folgenden Untersuchungen konzentrierten sich deshalb auf die Phosphorylierung der p42 MAPK.

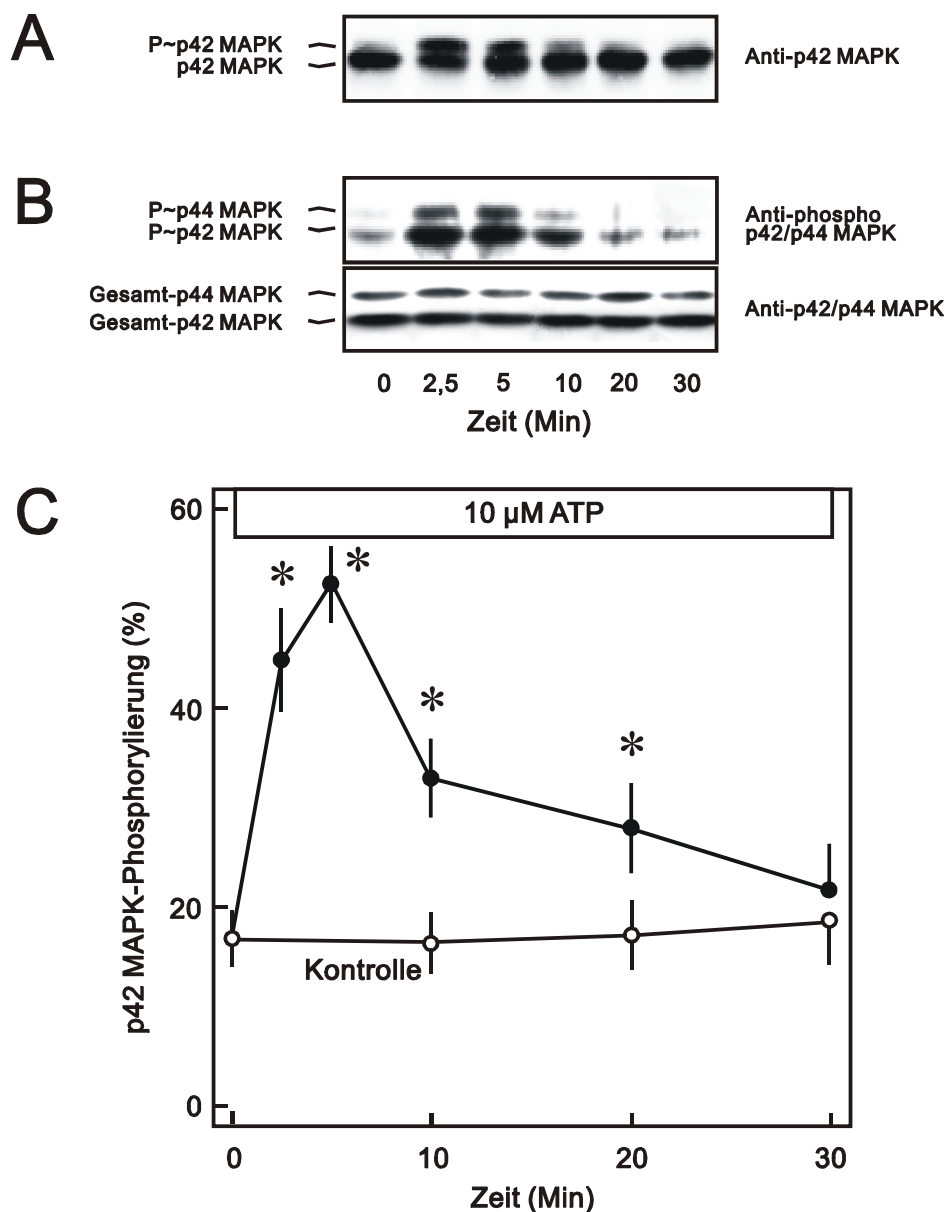


Abb. 4.1: Wirkung von ATP auf die p42/p44 MAPK-Phosphorylierung in porcinen aortalen Endothelzellen.

Repräsentative Western-Blots zeigen (A) die Auftrennung der phosphorylierten p42 MAPK (P~p42 MAPK) von der nicht-phosphorylierten p42 MAPK (p42 MAPK) (Protokoll 1) sowie (B) die Koregulierung der p42 und p44 MAPK-Phosphorylierung in Gegenwart von 10 μM ATP (Protokoll 2). (C) Zeitverlauf der ATP-stimulierten p42 MAPK-Phosphorylierung (Densitometrische Auswertung von (A)).

(○) Kontrollzellen, (●) mit 10 μM ATP stimulierte Endothelzellen. Angegeben sind Mittelwerte ± SD aus n = 5 Experimenten unabhängiger Zellpräparationen. *P < 0,05 vs. Kontrolle.

Im Folgenden wurden die Endothelzellen für 5 Minuten mit ATP in den Konzentrationen 1 μM , 10 μM und 100 μM oder für 5 Minuten mit 200 nM Phorbol ester (PMA), einem Aktivator der PKC, stimuliert (Abb. 4.2). Nach Zugabe von 10 μM und 100 μM ATP bzw. 200 nM PMA war die MAPK-Phosphorylierung signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Wirkung von 10 μM und 100 μM ATP auf die p42 MAPK-Phosphorylierung war dabei in ihrer Stärke mit der Phorbol ester-induzierten Aktivierung vergleichbar. Diese Daten zeigen, dass ATP die p42 MAPK-Phosphorylierung konzentrationsabhängig steigert. Da die Phosphorylierung der MAPK in Gegenwart von 10 μM ATP ihren maximalen Wert nach 5 Minuten zeigte, wurden die Zellen in den den folgenden Experimenten auch jeweils für einen Zeitraum von 5 Minuten mit ATP inkubiert.

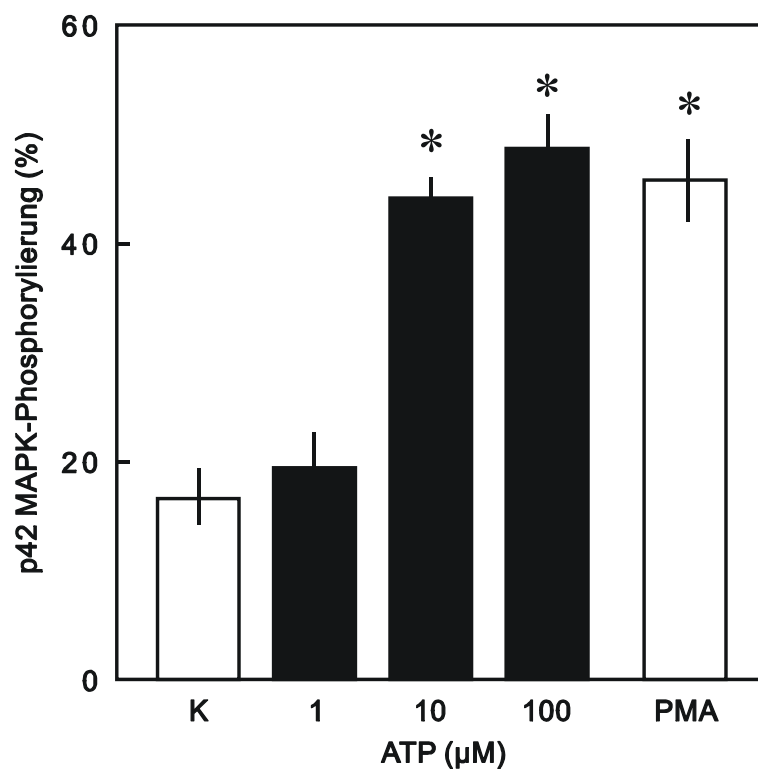


Abb. 4.2: Konzentrationsabhängige Wirkung von ATP und Wirkung von Phorbol ester (PMA) auf die p42 MAPK-Phosphorylierung.

Angegeben sind Mittelwerte \pm SD von $n = 5$ Experimenten unabhängiger Zellpräparationen, gemessen nach 5 Minuten in der Gegenwart von ATP oder PMA. Nach Zugabe von 10 μM , 100 μM ATP und 200 nM PMA ist die MAPK-Phosphorylierung signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle (K) (* $P < 0,05$).

4.2 p42 MAPK-Phosphorylierung in Gegenwart von PD 98059, U0 126 und U0 124

Um zu untersuchen, ob der ATP-Effekt auf die MAPK-Phosphorylierung über die MAPK-Kinase MEK 1/2 vermittelt wird, wurden zwei chemisch unterschiedliche Hemmstoffe von MEK 1/2 benutzt, um den MEK/MAPK-Signalweg zu inhibieren: PD 98059 und U0 126. Dazu wurden zunächst in Konzentrations-Findungs-Experimenten die minimalen PD- (20 μ M) und U0 126- (10 μ M) Konzentrationen bestimmt, die die basale MAPK-Phosphorylierung hemmen. In Abb 4.3 A ist eine solche Konzentrationsreihe beispielhaft für U0 126 wiedergegeben. Es zeigte sich, dass U0 126 die basale p42 MAPK-Phosphorylierung konzentrationsabhängig vermindert (Abb. 4.3 A). Die Inkubation der Endothelzellen mit 10 μ M U0 126 für 30 Minuten hemmte die p42 MAPK-Phosphorylierung fast vollständig. Bei anschließenden Stimulationsexperimenten mit ATP wurden die Endothelzellen daher zunächst für 30 Minuten in Gegenwart von U0 126 (10 μ M) inkubiert und dann für 5 Minuten mit ATP (10 μ M) stimuliert. Die ATP-induzierte MAPK-Phosphorylierung wurde vollständig durch U0 126 inhibiert (Abb. 4.3 B). Zur Überprüfung dieser Ergebnisse wurden Zellen für 30 Minuten auch mit dem unwirksamen Hemmstoff-Analogon U0 124 (10 μ M) inkubiert und anschließend für 5 Minuten mit ATP stimuliert. U0 124 zeigte weder eine hemmende Wirkung auf die basale, noch auf die ATP-induzierte MAPK-Phosphorylierung (Abb. 4.3 B).

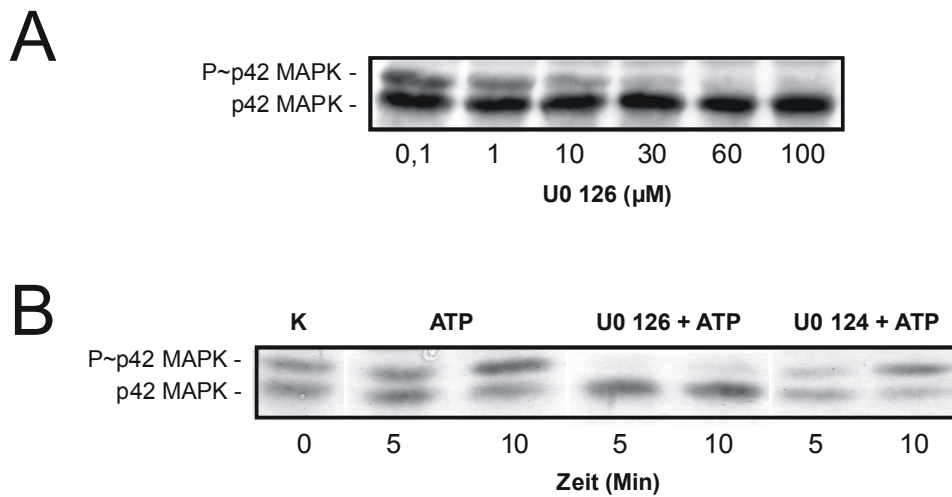


Abb. 4.3: Wirkung des MEK-Inhibitors U0 126 auf die basale und die ATP-stimulierte p42 MAPK-Phosphorylierung.

(A) Repräsentativer Western-Blot, der die Auftrennung der phosphorylierten (P~p42 MAPK) von der nicht-phosphorylierten p42 MAPK (p42 MAPK) in Gegenwart von 0,1, 1, 10, 30, 60 und 100 μM U0 126 nach 30 Minuten zeigt. (B) Repräsentativer Western-Blot, der die p42 MAPK-Phosphorylierung in Gegenwart von U0 126 und in Gegenwart des unwirksamen Analogons U0 124 zeigt. Die Zellen wurden entweder nicht vorbehandelt oder für 30 Minuten mit U0 126 (10 μM) oder U0 124 (10 μM) inkubiert und anschließend für 5 und 10 Minuten mit 10 μM ATP stimuliert. (A+B) Western-Blot-Nachweis jeweils mit Anti-p42 MAPK-Antikörper.

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sowohl PD 98059 als auch U0 126 in den jeweils ermittelten Hemmstoffkonzentrationen sowohl die basale als auch die ATP-stimulierte p42 MAPK-Phosphorylierung signifikant gegenüber der Kontrolle erniedrigen (Abb. 4.4). Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass ATP die p42 MAPK-Phosphorylierung in endothelialen Zellen über MEK 1/2 stimulieren kann.

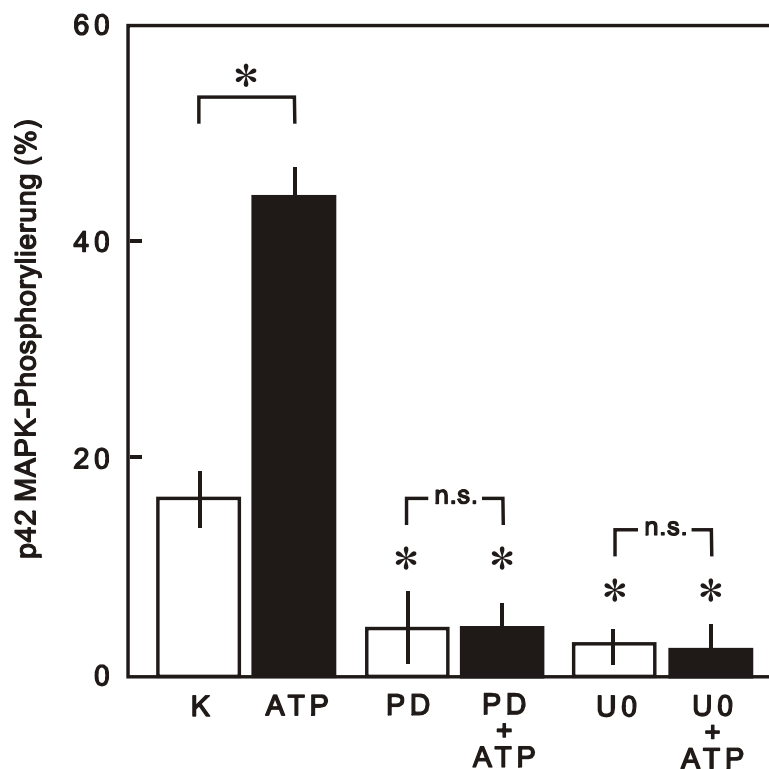


Abb. 4.4: Wirkung von ATP auf die p42 MAPK-Phosphorylierung nach 30 Minuten in Gegenwart der MEK-Inhibitoren PD 98059 (PD; 20 μ M) oder U0 126 (U0; 10 μ M).

Angegeben sind Mittelwerte \pm SD von $n = 5$ Experimenten unabhängiger Zellpräparationen, gemessen nach 5 Minuten in Gegenwart von 10 μ M ATP. Die Phosphorylierung der MAPK nach 30-minütiger Hemmstoffvorinkubation ist jeweils sowohl basal als auch 5 Minuten nach ATP-Zugabe signifikant gegenüber der Kontrolle (K) erniedrigt (* $P < 0,05$). n.s.= Werte nicht signifikant verschieden voneinander. Nach Zugabe von ATP in Gegenwart der MEK-Inhibitoren ist die MAPK-Phosphorylierung signifikant erniedrigt gegenüber ATP alleine.

4.3 p42 MAPK-Phosphorylierung in Gegenwart von 8-Phenyltheophyllin und NECA

Endothelzellen besitzen sowohl Adenosin- als auch ATP-Rezeptoren, über die Nukleotide, wie ATP, wirken können. Von extrazellulärem ATP ist bekannt, dass es durch Ektonukleotidasen zu Adenosin abgebaut werden kann.

Um zu klären, ob die ATP-Wirkung auf die p42 MAPK über Adenosin-Rezeptoren vermittelt wird, wurden Experimente durchgeführt, in denen die Adenosin-Rezeptoren durch eine Hemmkonzentration des Adenosin-Rezeptor-antagonisten 8-Phenyltheophyllin (8-PT) gehemmt wurden. Dafür wurden die Zellen für 30 Minuten mit 8-PT (10 μ M) inkubiert und dann für 5 Minuten mit ATP (10 μ M) stimuliert. 8-PT alleine zeigte keinen Einfluss auf die basale MAPK-Phosphorylierung und war auch nicht in der Lage, die ATP-Wirkung auf die MAPK-Phosphorylierung zu antagonisieren (Abb. 4.5). Dies legt die Vermutung nahe, dass Adenosin-Rezeptoren bei der MAPK-Phosphorylierung durch ATP keine Rolle spielen. Dies wurde in weiteren Experimenten überprüft, in denen die Adenosin-Rezeptoren durch das stabile Adenosinanalogon 5'-(N-ethylcarboxamido)adenosin (NECA) aktiviert wurden. Die Zellen wurden für 10 Minuten mit NECA (1 μ M) inkubiert und anschließend wurde die MAPK-Phosphorylierung bestimmt. Die Wirkung von NECA auf die MAPK-Phosphorylierung ließ keinen signifikanten Unterschied zur unbehandelten Kontrolle erkennen (Abb. 4.5). Diese Daten zeigen, dass eine direkte Stimulation von Adenosin-Rezeptoren keinen Einfluss auf die Phosphorylierung der p42 MAPK hat.

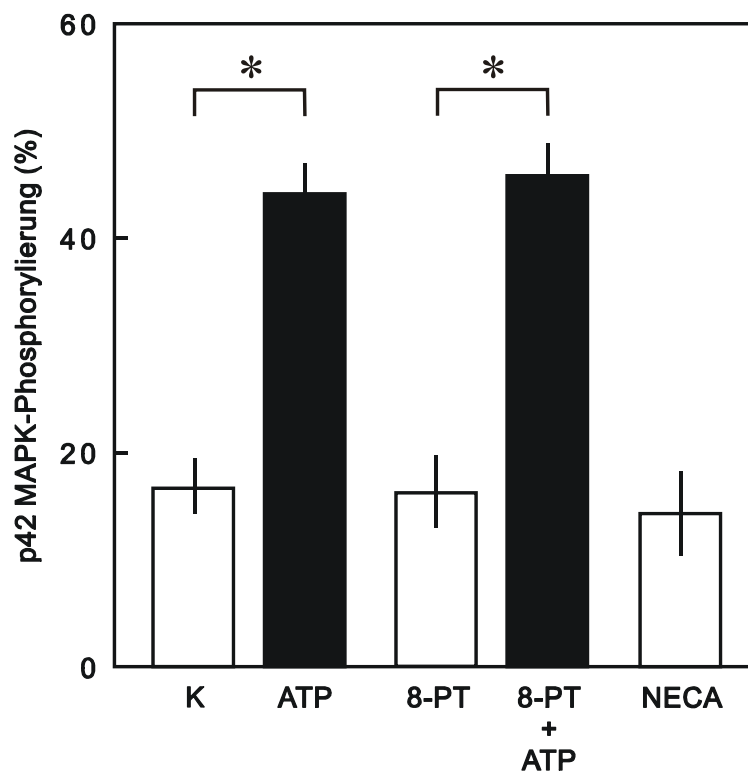


Abb. 4.5: Wirkung von ATP in Gegenwart des Adenosin-Rezeptorantagonisten 8-Phenyltheophyllin (8-PT) und Wirkung des Adenosinanalogs 5'-(N-ethylcarboxamido)adenosin (NECA) auf die p42 MAPK-Phosphorylierung.

(ATP) Endothelzellen wurden für 5 Minuten in Gegenwart von 10 μ M ATP inkubiert. (8-PT) Zellen wurden für 30 Minuten in Gegenwart von 10 μ M 8-PT inkubiert. (8-PT+ATP) Zellen wurden für 30 Minuten in Gegenwart von 10 μ M 8-PT inkubiert und anschließend für 5 Minuten mit 10 μ M ATP stimuliert. (NECA) Zellen wurden für 10 Minuten mit 1 μ M NECA stimuliert. Angegeben sind Mittelwerte \pm SD von n = 5 Experimenten unabhängiger Zellpräparationen. 5 Minuten nach Zugabe von ATP ist die MAPK-Phosphorylierung in Gegenwart von 8-PT signifikant erhöht gegenüber 8-PT alleine (*P < 0,05). Die MAPK-Phosphorylierung in Gegenwart von 8-PT und NECA ist nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (K). Die Werte in Gegenwart von ATP und 8-PT+ATP sind nicht signifikant verschieden voneinander.

4.4 ATP-Wirkung unter Blockade des zytosolischen Ca^{2+} -Anstieges

In Endothelzellen ist gut belegt, dass extrazelluläres ATP einen raschen und transienten Ca^{2+} -Anstieg bewirkt (Lückhoff und Busse, 1986). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der ATP-induzierte Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in Endothelzellen (i) durch ein vorheriges Beladen der Zellen mit dem Ca^{2+} -Komplexbildner BAPTA/AM oder (ii) durch Hemmung der IP_3 -sensitiven Ca^{2+} -Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum mit dem spezifischen Inhibitor Xestospongine C unterdrückt werden kann (Noll et al., 2000).

Um zu untersuchen, ob eine Veränderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration die Phosphorylierung der p42 MAPK beeinflusst, wurden die Endothelzellen für 30 Minuten mit BAPTA/AM (10 μM) inkubiert und dann für 5 Minuten mit ATP (10 μM) stimuliert. Die Inkubation mit BAPTA/AM zeigte keinen Einfluss auf die ATP-induzierte MAPK-Phosphorylierung (Abb. 4.6). Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurden die Zellen für 30 Minuten mit Xestospongine C (3 μM) inkubiert und anschließend für 5 Minuten mit ATP (10 μM) stimuliert. Auch eine Vorbehandlung der Zellen mit Xestospongine C hatte keinen Einfluss auf die ATP-induzierte MAPK-Phosphorylierung (Abb. 4.6). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die ATP-induzierte p42 MAPK-Phosphorylierung unabhängig von einem ATP-bedingten zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg ist.

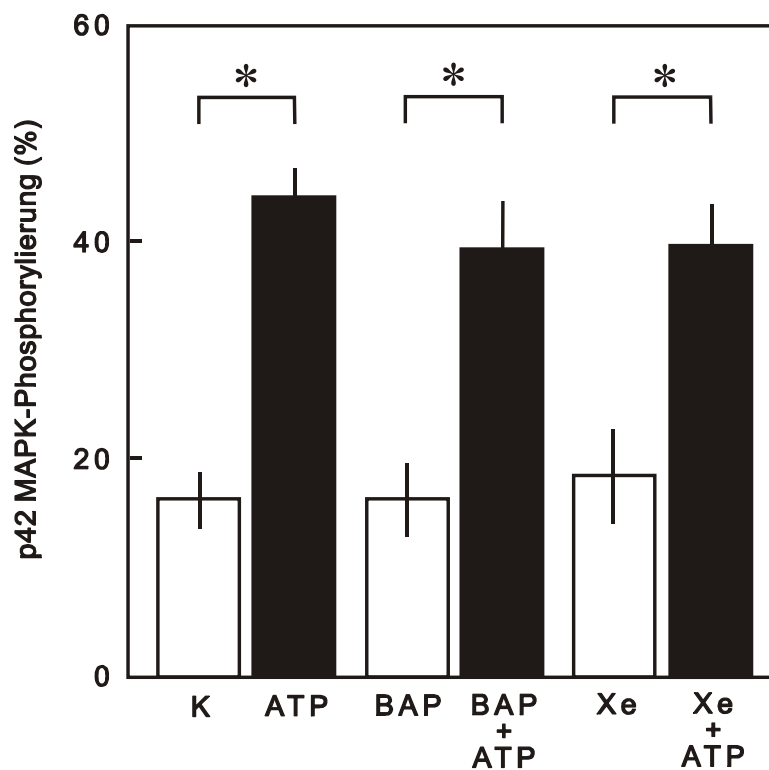


Abb. 4.6: Wirkung von ATP auf die p42 MAPK-Phosphorylierung nach 30 Minuten in Gegenwart von BAPTA/AM (BAP; 10 μ M) oder Xestospongin C (Xe; 3 μ M).

Endothelzellen wurden in Gegenwart von BAP, einem Ca^{2+} -Komplexbildner, und Xe, einem Hemmstoff des IP_3 -abhängigen Ca^{2+} -Kanals, inkubiert und dann für 5 Minuten mit 10 μ M ATP stimuliert. Angegeben sind Mittelwerte \pm SD von $n = 5$ Experimenten unabhängiger Zellpräparationen. 5 Minuten nach ATP-Zugabe ist die MAPK-Phosphorylierung signifikant erhöht gegenüber der jeweiligen Kontrolle (* $P < 0,05$). Die MAPK-Phosphorylierung in Gegenwart von BAP und Xe ist nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (K). Die Werte von ATP, BAP+ATP sowie Xe+ATP sind nicht signifikant verschieden voneinander.

4.5 Rolle des MEK/MAPK-Signalweges bei der MLK-Phosphorylierung unter Hemmung der MLK-Phosphatase

Unter basalen Bedingungen lag die MLK-Phosphorylierung bei $65 \pm 7 \%$ (Abb. 4.7 B). Eine 30-minütige Vorinkubation der Zellen mit $20 \mu\text{M}$ PD 98059, einer Konzentration, die die basale p42 MAPK-Phosphorylierung unterdrückt, reduzierte die basale MLK-Phosphorylierung nur schwach auf $57 \pm 8 \%$ ($P > 0,05$; nicht signifikant unterschiedlich von unbehandelter Kontrolle). Dies deutet darauf hin, dass die MLK-Phosphorylierung unter basalen Bedingungen nicht signifikant durch den MAPK-Signalweg beeinflusst wird.

Um den Einfluss des MEK/MAPK-Signalweges auf die MLK-Kinase zu untersuchen, wurde ein Protokoll verwendet, bei dem die Phosphatase-Aktivität in den Zellen gehemmt wurde. Zu diesem Zweck wurde der Phosphatase-Inhibitor Calyculin A zugegeben und der folgende Anstieg der MLK-Phosphorylierung wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten gemessen. Bei der Konzentration von $10 \mu\text{M}$ Calyculin A handelt es sich um eine Konzentration, die die MLK-Phosphatase hemmt. In Konzentrations-Findungs-Experimenten bestätigte sich, dass dies die kleinste Konzentration war, die zu einem maximalen Anstieg der unmittelbaren MLK-Phosphorylierung führte. Bereits früher (Noll et al., 2000) konnte gezeigt werden, dass der langsame, kontinuierliche Anstieg der MLK-Phosphorylierung in Gegenwart von Calyculin A alleine, auf die basale Aktivität der MLK-Kinase zurückzuführen ist. In Gegenwart des MEK-Hemmstoffes PD 98059 ($20 \mu\text{M}$) war dieser unmittelbare Anstieg der MLK-Phosphorylierung signifikant abgeschwächt (Abb. 4.7 A+B). Dieser Befund deutet darauf hin, dass der MEK/MAPK-Signalweg die basale Aktivität der MLK-Kinase kontrolliert.

Wurde ATP ($10 \mu\text{M}$) nach 10 Minuten in Gegenwart von Calyculin A zugegeben, verursachte ATP einen raschen, zusätzlichen Anstieg der MLK-Phosphorylierung, was auf die Aktivierung der MLK-Kinase hinweist. Dieser schnelle, zusätzliche Anstieg wurde vollständig in Gegenwart von PD 98059 gehemmt (Abb. 4.7 B). Eine gleiche Hemmwirkung auf den Calyculin A/ATP-induzierten Anstieg der MLK-Phosphorylierung wurde auch mit U0 126 beobachtet (Daten hier nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, dass die ATP-induzierte Aktivierung der MLK-Kinase über den MEK/MAPK-Signalweg vermittelt wird.

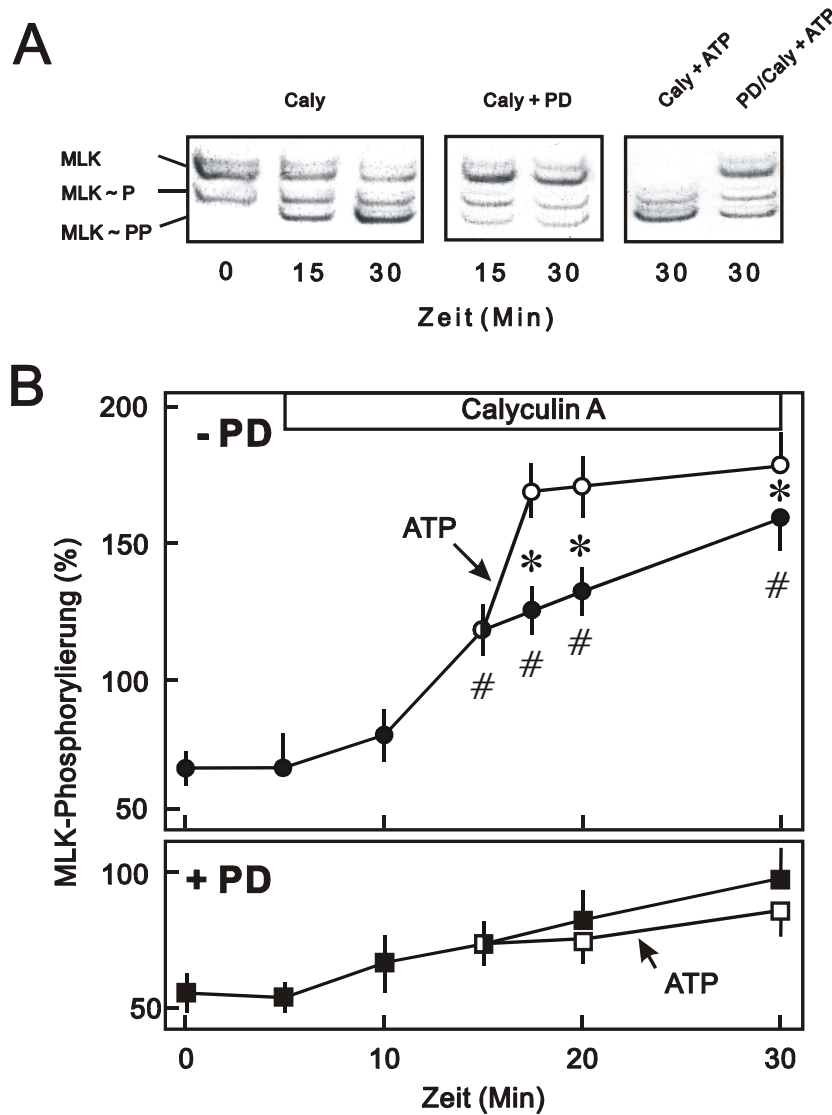


Abb. 4.7: Wirkung von ATP auf die Phosphorylierung der Myosinleichtketten (MLK) unter Hemmung der MLK-Phosphatase durch Calyculin A. Endothelzellen wurden entweder nicht vorbehandelt oder mit dem MEK-Inhibitor PD 98059 (20 μ M) für 30 Minuten vorinkubiert. Dann wurden Calyculin A (Caly; 10 nM), ATP (10 μ M) oder Caly und ATP zugegeben. (A) Repräsentative Western-Blots zeigen die MLK-Phosphorylierung (Nachweis mit Anti-MLK). Die Banden repräsentieren von oben nach unten: nicht-phosphorylierte MLK (MLK), monophosphorylierte MLK (MLK~P) und diphosphorylierte MLK (MLK~PP). (B) Oben: MLK-Phosphorylierung in Abwesenheit von PD 98059 (-PD). ATP stimuliert die MLK-Phosphorylierung. Unten: MLK-Phosphorylierung in Gegenwart von PD 98059 (+PD). ATP stimuliert die MLK-Phosphorylierung nicht mehr. (●) Calyculin A vs. (○) Calyculin A und ATP. (■) PD 98059 vs. (□) PD 98059 und ATP. Angegeben sind Mittelwerte \pm SD aus n = 5 Experimenten unabhängiger Zellpräparationen. *P < 0,05; Caly vs. Caly und ATP. #P < 0,05; Caly vs. Caly und PD.

4.6 Beteiligung des MEK/MAPK-Signalweges an der MLK-Phosphorylierung unter Hemmung der MLK-Kinase

In früheren Untersuchungen (Noll et al., 2000) wurde außerdem gezeigt, dass ATP in Abwesenheit von Phosphatase-Inhibitoren, wie z.B. Calyculin A, eine Dephosphorylierung der MLK bewirkt und dass dies auf die Aktivierung der vorherrschenden MLK-Phosphatase zurückzuführen ist. Eine MLK-Dephosphorylierung nach ATP-Zugabe wurde auch in dieser Studie beobachtet (Abb. 4.8). Die zusätzliche Gegenwart des MEK-Inhibitors PD 98059 bewirkte eine weitere signifikante Abnahme der MLK-Phosphorylierung. Diese Daten lassen darauf schließen, dass die Hemmung des MEK/MAPK-Signalweges die ATP-stimulierte MLK-Dephosphorylierung steigern kann.

Um zu klären, ob dieser Effekt von einer Steigerung der Phosphatase-Aktivität hervorgerufen wird, wurde die MLK-Kinase in einer Serie von weiteren Experimenten durch den MLK-Kinase-Inhibitor ML-7 gehemmt. Wie in Abb. 4.8 zu sehen ist, verursachte eine 30-minütige Inkubation der Zellen in Gegenwart des MLK-Kinase-Hemmstoffes ML-7 (50 μM) eine signifikante MLK-Dephosphorylierung, welche auf die basale Aktivität der MLK-Phosphatase zurückzuführen ist. Die gleichzeitige Gabe von ML-7 und PD bewirkte keine weitere signifikante Reduktion der MLK-Phosphorylierung, was die Annahme unterstützt, dass der PD-hemmbarer Schritt oberhalb der MLK-Kinase liegt. Die Zugabe von ML-7 und ATP reduzierte die MLK-Phosphorylierung über den Effekt von ML-7 alleine hinaus. Wurden die Endothelzellen unter letztgenannten Bedingungen vorher 30 Minuten mit PD 98059 (20 μM) inkubiert, blieb der Grad der MLK-Phosphorylierung unverändert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die durch ATP induzierte Aktivierung der MLK-Phosphatase nicht über den MEK/MAPK-Signalweg vermittelt wird.

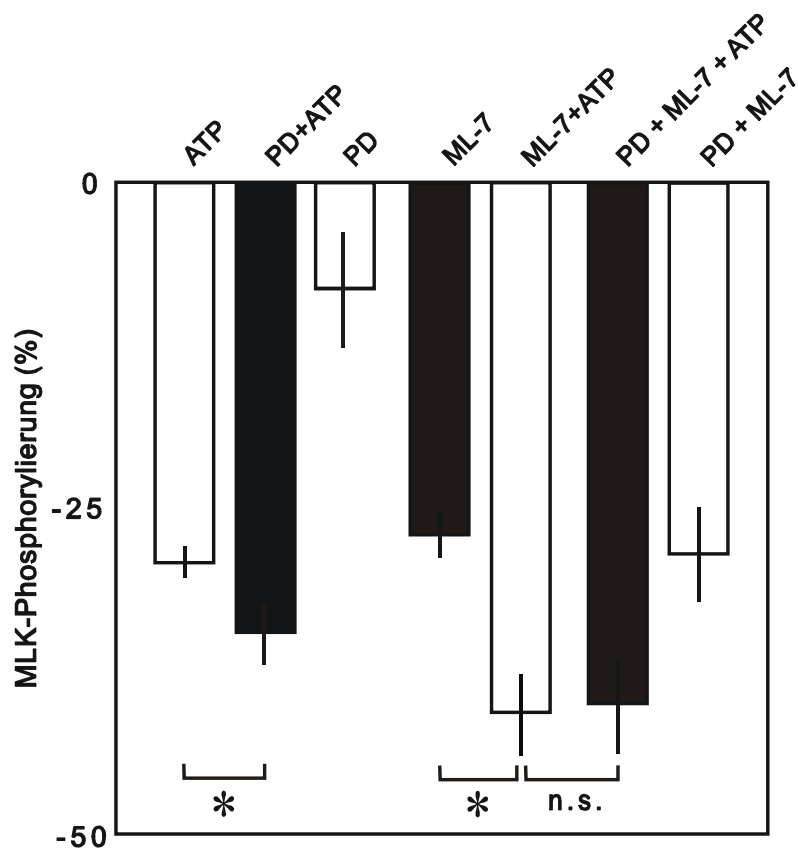


Abb. 4.8: Wirkung von ATP auf die MLK-Phosphorylierung in Gegenwart von MEK-Inhibitor PD 98059, MLK-Kinase-Inhibitor ML-7 oder einer Kombination von PD und ML-7.

Die Zellen wurden für 30 Minuten in Gegenwart von 20 μ M PD 98059 und/oder 50 μ M ML-7 inkubiert und dann mit 10 μ M ATP stimuliert. Angegeben sind Mittelwerte \pm SD von n = 5 Experimenten unabhängiger Zellpräparationen, gemessen nach 10 Minuten in Gegenwart von ATP. *P < 0,05; n.s.= Werte nicht signifikant verschieden voneinander. Unter allen Bedingungen ist die MLK-Phosphorylierung signifikant gegenüber der basalen MLK-Phosphorylierung erniedrigt. Die basale MLK-Phosphorylierung von 65 ± 7 % ist dabei auf 0 gesetzt.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des MEK/MAPK-Signalweges auf den kontraktile Apparat in Endothelzellen zu untersuchen. In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass ATP gleichzeitig auf eine Ca^{2+} -abhängige Weise die MLK-Kinase und auf eine Ca^{2+} -unabhängige Weise die MLK-Phosphatase aktiviert (Noll et al., 2000). Die Hauptaussage der vorliegenden Studie ist, dass die Ca^{2+} -unabhängige Aktivierung des MEK/MAPK-Signalweges die ATP-induzierte Aktivierung der MLK-Kinase vermittelt, nicht aber die der MLK-Phosphatase. Die Untersuchungen zeigen im Einzelnen:

1. Extrazelluläres ATP induziert die Phosphorylierung der p42/p44 MAPK in aortalen Endothelzellen des Schweines.
2. Diese Phosphorylierung wird über MEK 1/2 vermittelt.
3. Die Phosphorylierung der p42 MAPK ist ein direkter ATP-Effekt und wird nicht über Adenosin-Rezeptoren vermittelt.
4. Die Phosphorylierung der p42 MAPK ist unabhängig von dem ATP-induzierten intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg.
5. Inhibitoren des MEK/MAPK-Signalweges hemmen die ATP-vermittelte Aktivierung der MLK-Kinase, beeinflussen jedoch nicht die ATP-induzierte Aktivierung der MLK-Phosphatase.

5.1 Einfluss von ATP auf die Phosphorylierung der p42/p44 MAPK

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die p42 MAPK unter basalen experimentellen Bedingungen teilweise in phosphoryliertem Zustand vorlag, was darauf hindeutet, dass sie teilweise aktiv ist. Übereinstimmend mit diesem Befund ist das Ergebnis, dass die Hemmung von MEK1/2, den Kinasen oberhalb von p42 MAPK, durch PD 98059 und U0 126, den basalen Phosphorylierungsstatus fast vollständig reduzierte. Bereits früher wurde gezeigt, dass kultivierte Endothelzellen über einen basal aktivierten MEK/MAPK-Weg verfügen, der wahrscheinlich durch Faktoren des Kulturmediums stimuliert wird (Ikeda et al., 1999).

Die Stimulierung der Zellen mit exogen zugegebenem ATP führte zu einem vorübergehenden, konzentrationsabhängigen Anstieg der p42 MAPK-Phosphorylierung, welcher durch die MEK-Inhibitoren PD 98059 und U0 126 gehemmt wurde. Wie in Western-Blots gezeigt werden konnte, stimulierte ATP simultan die Phosphorylierung der p42 MAPK und p44 MAPK. Diese Koinzidenz deutet darauf hin, dass die Aktivierung der beiden MAPK-Isoformen durch extrazelluläres ATP koreguliert wird. Deshalb wurde im Folgenden die p42 MAPK stellvertretend für die p42/p44 MAPK untersucht. Der maximale Effekt von ATP war in seiner Stärke vergleichbar mit der p42 MAPK-Aktivierung, die in Gegenwart von Phorbol ester (PMA) beobachtet wurde, einem Aktivator der oberhalb gelegenen Kinase PKC. Dieser Vergleich zeigt, dass ATP einen starken Einfluss auf die p42 MAPK-Aktivität hat.

Da ATP durch Ektonukleotidasen auf der Oberfläche von Endothelzellen zu Adenosin abgebaut wird, wurde in den vorliegenden Untersuchungen geprüft, ob ATP auch über seinen Metaboliten Adenosin die MAPK-Aktivität beeinflusst. Dazu wurden (1) die Adenosin-Rezeptoren mit dem Adenosin-Rezeptorantagonisten 8-Phenyltheophyllin (8-PT) gehemmt und die MAPK mit ATP stimuliert oder (2) die Zellen mit dem Adenosinanalogen NECA stimuliert. Es zeigte sich, dass (1) der Adenosin-Rezeptorantagonist 8-PT nicht in der Lage war, den ATP-Effekt auf die p42 MAPK-Phosphorylierung zu inhibieren und (2) die Zugabe des Adenosinanalogs NECA keinen Effekt auf die p42 MAPK-Phosphorylierung hatte. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung von p42 MAPK in Gegenwart von extrazellulär zugegebenem ATP nicht auf die Bildung von Adenosin aus ATP zurückzuführen ist.

Endothelzellen exprimieren Purin-Rezeptoren für extrazelluläres ATP. Diese unterteilen sich in Adenosin-empfindliche P1- und ATP-empfindliche P2X- und P2Y-Rezeptoren (Motte et al., 1993; Communi et al., 2000; Burnstock, 2002). In der vorliegenden Studie wurde der purinerge Rezeptor, der den ATP-Effekt vermittelt, nicht weiter charakterisiert. Wie in einer früheren Studie gezeigt, gehört der purinerge Rezeptor, der den ATP-Effekt auf die endotheliale Permeabilität vermittelt, zur P2Y-Familie (Motte et al., 1993; Noll et al., 1999). Es liegt daher die Vermutung nahe, dass die hier beobachtete ATP-Wirkung auf die p42 MAPK ebenfalls über P2Y-Rezeptoren vermittelt wird.

Die Aktivierung des MEK/MAPK-Signalweges durch ATP war unabhängig von dem vorübergehenden Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, welcher durch

die Zugabe von ATP ausgelöst wird. Dieser Anstieg wird durch eine Ca^{2+} -Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum über den IP_3 -sensitiven Freisetzungskanal bewirkt. Frühere Untersuchungen zeigten, dass dieser Kanal spezifisch durch Xestospongine C blockiert werden kann (Gafni et al., 1997) und dass Xestospongine C den ATP-induzierten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration verhindert (Noll et al., 2000). Hier zeigte sich, dass die Aktivierung der p42 MAPK von diesen veränderten experimentellen Bedingungen unbeeinflusst blieb. Auch die Unterdrückung des Ca^{2+} -Anstieges durch ein Beladen der Zellen mit dem Ca^{2+} -Chelator BAPTA/AM hatte keine Auswirkungen auf die p42 MAPK-Aktivierung. Diese Ergebnisse zeigen deshalb, dass die Aktivierung des MEK/MAPK-Signalweges durch ATP unabhängig von dessen Effekt auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ist.

Die Beobachtung, dass extrazelluläres ATP die p42 MAPK aktiviert, konnte bereits in Endothelzellen und anderen Zellen gemacht werden. Dabei wurde der Signalweg im Hinblick auf ATP-induziertes Zellwachstum und in Bezug auf ATP-induzierte Prostaglandinproduktion untersucht (Huwiler und Pfeilschifter, 1994; Graham et al., 1996; Patel et al., 1996; Neary et al., 1998; Burnstock, 2002). Es wird dabei vermutet, dass die ATP-induzierte MAPK-Aktivierung nicht über Adenosin-Rezeptoren, sondern über G-Protein-gekoppelte P_2Y -Rezeptoren erfolgt. Über diese Rezeptoren kommt es zu einer Stimulation des IP_3 -DAG-Weges und anschließender Aktivierung von PKC bzw. einem Ca^{2+} -Anstieg. Beide Signale werden im Wesentlichen für die ATP-Effekte und somit auch für die MAPK-Phosphorylierung verantwortlich gemacht (Communi et al., 2000; Short et al., 2000; Burnstock, 2002). Aber auch Ca^{2+} -unabhängige Wege der MAPK-Aktivierung werden diskutiert. Die Befunde der vorliegenden Arbeit zeigen, dass in den hier untersuchten porcinen Aortenendothelzellen die Aktivierung der MAPK nicht durch einen ATP-induzierten intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg vermittelt wird, sondern unabhängig von Ca^{2+} erfolgt. Diese Schlussfolgerung wird durch neuere Arbeiten unterstützt, die belegen, dass Ca^{2+} -unabhängigen Mechanismen, wie Signalwegen über PKA, PI3-Kinase, Ca^{2+} -unabhängige PKC-Isoformen oder Scaffoldproteine, wie z.B. β -Arrestin oder IQGAP1, eine weitaus größere Bedeutung in der ATP-vermittelten MAPK-Aktivierung zukommt, als bisher angenommen (Ikeda et al., 1998; Neary et al., 1999; Pouysségur, 2000; Liebmann, 2001; Santiago-Perez et al., 2001; Roy et al., 2004). Eine Involvierung von Scaffoldproteinen an der MAPK-Aktivierung wäre darüber

hinaus auch geeignet, zu erklären, warum die MAPK nicht zum Zellkern wandert und dort ihre mitogenen Effekte auslöst, sondern im Zytosol verbleibt und über die MLK-Phosphorylierung auf den Kontraktionsapparat wirkt.

5.2 Modell der phosphorylierbaren MLK

In der vorliegenden Arbeit wurde die Myosinleichtkettenphosphorylierung in Aortenendothelzellen vom Schwein nachgewiesen. Mit einem bestimmten Verfahren (Persechini et al., 1986) war es möglich, die MLK in ihre nicht-phosphorylierten, mono- und diphosphorylierten Formen aufzutrennen. Nach gegenwärtiger Auffassung wird die Endothelpermeabilität über die Aktivierung endothelialer kontraktile Elemente gesteuert, wobei die MLK-Phosphorylierung das Startsignal für die kontraktile Aktivierung ist (Wysolmerski und Lagunoff, 1990; Kolodney und Wysolmerski, 1992; Sheldon et al., 1993; Garcia und Schaphorst, 1995; van Hinsbergh, 1997). In zwei früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass extrazelluläres ATP die Makromolekülpermeabilität in Endothelzellen deutlich senkt und dies vermutlich über die ATP-induzierte MLK-Dephosphorylierung verursacht wird (Noll et al., 1999, 2000).

5.3 Rolle des MEK/MAPK-Signalweges bei der ATP-vermittelten MLK-Phosphorylierung über MLK-Kinase

Um die Aktivierung der MLK-Kinase in intakten Zellen zu untersuchen, wurde ein indirektes Protokoll benutzt, in welchem die MLK-Phosphorylierung in Gegenwart einer Hemmkonzentration des Phosphatase-Inhibitors Calyculin A gemessen wurde. In einer früheren Arbeit (Noll et al., 2000) konnte gezeigt werden, dass der kontinuierliche Anstieg der MLK-Phosphorylierung in Gegenwart von Calyculin A durch die basale Aktivität der MLK-Kinase bedingt wird. Wie früher berichtet (Noll et al., 2000), zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass ATP die MLK-Kinase aktiviert. Diese Aktivierung konnte durch die MEK-Inhibitoren PD 98059 und U0 126 vollständig gehemmt werden. Dies zeigt, dass der MEK/MAPK-Signalweg oberhalb der MLK-Kinase liegt. Dieses Ergebnis wird dadurch bestätigt, dass in Gegenwart

des MLK-Kinase-Hemmstoffes ML-7, die Blockade des MEK/MAPK-Weges durch PD 98059 keine zusätzliche Hemmung der MLK-Phosphorylierung bewirkte.

Beobachtungen aus einer früheren Studie zeigten, dass ATP die MLK-Kinase Ca^{2+} -abhängig aktiviert (Noll et al., 2000). Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Studie kann davon ausgegangen werden, dass der Ca^{2+} -abhängige Schritt unterhalb des MEK/MAPK-Signalweges liegt. Es ist anzunehmen, dass es sich dabei um die Ca^{2+} /CaM-abhängige MLK-Kinase selbst handelt.

In COS-7 und MCF-7 Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass die p42/p44 MAPK über eine Aktivierung der MLK-Kinase die MLK-Phosphorylierung erhöht und eine Zellmigration auslöst (Klemke et al., 1997; Nguyen et al., 1999). Mansfield et al. (2000) beschreiben, dass die p42/p44 MAPK in polymorphkernigen Leukozyten im Rahmen der Phagozytose die MLK-Kinase aktiviert. Auch in Glattmuskelzellen wird vermutet, dass die p42/p44 MAPK die MLK-Kinase aktiviert und darüber den kontraktile Apparat beeinflusst (Morrison et al., 1996; Arner und Pfitzer, 1999; Goetze et al., 2001). Dies unterstützt die These von Jin et al. (1996), dass es einen „cross-talk“ zwischen dem RTK-Weg und dem MLK-Kinase-Signalweg in der glatten Gefäßmuskulatur gibt. Es wird dabei auch von anderen Kinasen, wie PKA, PKC und CaM-Kinase II, angenommen, dass sie auf die MLK-Kinase-Aktivität Einfluss nehmen (Stull et al., 1993; Arner und Pfitzer, 1999). Dabei ist eine Hypothese, dass die p42/p44 MAPK, im Gegensatz zu anderen Kinasen, die Sensitivität der MLK-Kinase gegenüber Ca^{2+} /Calmodulin erhöht und dadurch die MLK-Kinase aktiviert (Morrison et al., 1996; Arner und Pfitzer, 1999; Kamm und Stull, 2001). Andere Arbeitsgruppen vermuten, dass die MAPK die MLK auch direkt oder über MAPK-Substrate, wie die MAPKAPK-1b, phosphorylieren kann (Suizu et al., 2000; D'Angelo und Adam, 2002).

Mit den Befunden der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die ATP-Wirkung auf die MLK-Kinase über die p42/p44 MAPK vermittelt wird und dass die MLK-Phosphorylierung nicht direkt durch die MAPK erfolgt. Die p42/p44 MAPK wirkt über die MLK-Kinase auf die MLK-Phosphorylierung und über diesen Weg nimmt sie vermutlich auch Einfluss auf die endotheliale Kontraktion und Gefäßpermeabilität.

5.4 Rolle des MEK/MAPK-Signalweges bei der ATP-vermittelten MLK-Dephosphorylierung über MLK-Phosphatase

In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass ATP neben seiner Ca^{2+} -abhängigen Wirkung auf die MLK-Kinase eine noch stärkere, Ca^{2+} -unabhängige Wirkung auf die MLK-Phosphatase besitzt (Noll et al., 2000). Dies ist insofern von Bedeutung, als dass von Entzündungsmediatoren, wie Thrombin und Histamin, bisher nur gezeigt werden konnte, dass diese die MLK-Kinase aktivieren und/oder die MLK-Phosphatase hemmen und so über eine Aktivierung des kontraktilel Apparates zu einer gesteigerten Gefäßpermeabilität führen.

In dieser Studie wurde nachgewiesen, dass der Ca^{2+} -unabhängige Signalweg von ATP auf die MLK-Phosphatase, nicht über den MEK/MAPK-Weg vermittelt wird. Sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit des MLK-Kinase-Inhibitors ML-7 hatte die Hemmung des MEK/MAPK-Signalweges keinen Einfluss auf die ATP-induzierte MLK-Dephosphorylierung durch die MLK-Phosphatase. Der MEK/MAPK-Signalweg ist also ausschließlich an dem Signalweg von ATP beteiligt, der die MLK-Kinase aktiviert. Auch in der Literatur finden sich bislang keine Hinweise dafür, dass die p42/p44 MAPK die vorherrschende MLK-Phosphatase aktivieren kann.

Zusammengenommen ergibt sich aus den Befunden dieser Arbeit folgendes Szenario zur Modulation der kontraktilel Aktivierung durch extrazelluläres ATP (Abb. 5.1). Wie bereits früher gezeigt (Noll et al., 2000) aktiviert ATP sowohl die MLK-Kinase in einem Ca^{2+} -abhängigen Schritt als auch die MLK-Phosphatase in einem Ca^{2+} -unabhängigen Schritt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die ATP-Wirkung auf die MLK-Kinase über MEK/MAPK vermittelt wird und der Ca^{2+} -abhängige Schritt unterhalb von MEK/MAPK liegt. Die ATP-Wirkung auf die MLK-Phosphatase wird nicht über den MEK/MAPK-Signalweg reguliert.

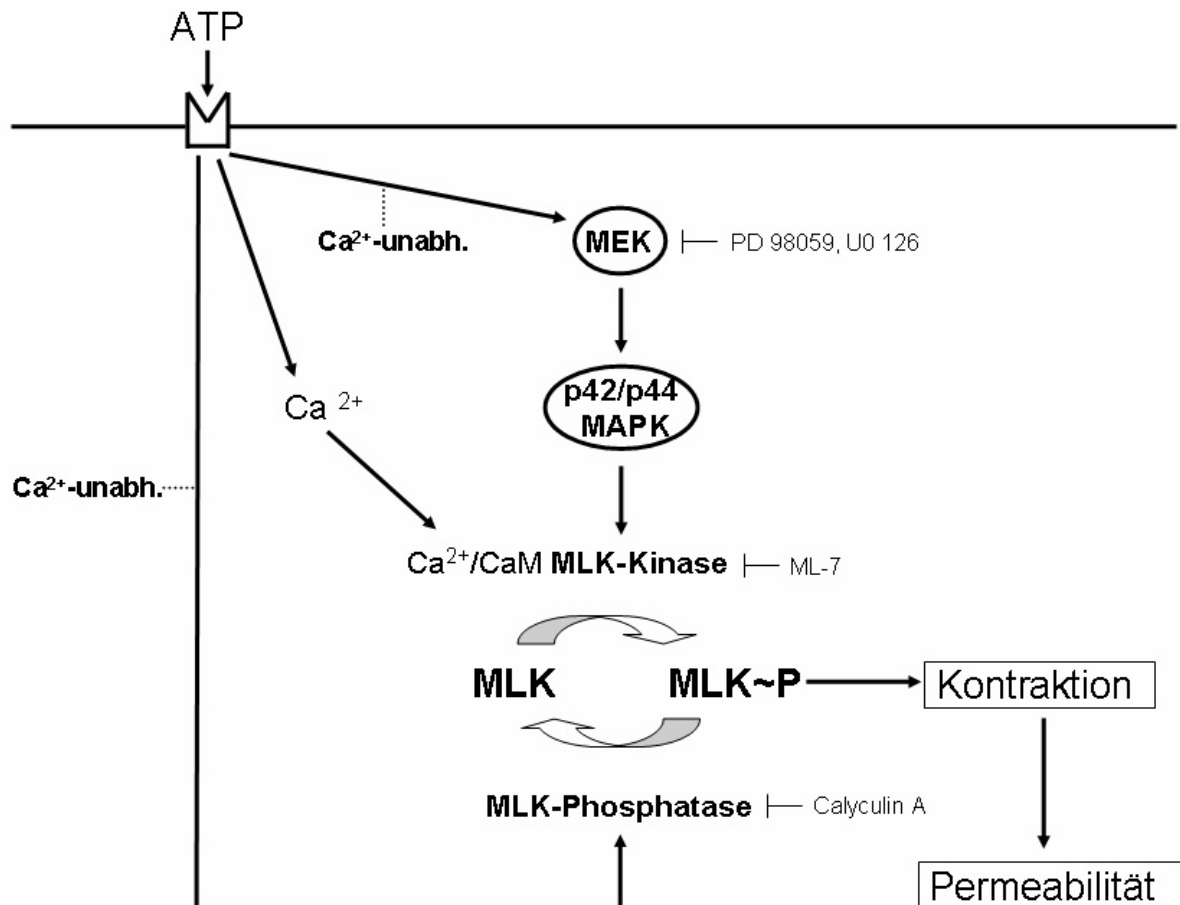


Abb. 5.1: Wirkung von ATP auf den kontraktile Apparat und die Permeabilität in Aortenendothelzellen vom Schwein.

ATP reguliert die Phosphorylierung der MLK (MLK~P) über die Aktivierung der p42/p44 MAPK. Dieser Teil der ATP-induzierten MLK-Aktivierung ist Ca²⁺-unabhängig. Die ATP-Wirkung auf den MEK/MAPK-Signalweg wird nicht über ATP-Metabolite vermittelt. Die forcierte, Kinase-induzierte MLK-Phosphorylierung induziert die Interaktion von Aktin und Myosin des endothelialen Zytoskeletts und steigert die Kontraktionskraft der Zellen. Als Folge der Kontraktion nimmt die Makromolekülpermeabilität der Endothelzellschichten zu. Die ATP-vermittelte Aktivierung der MLK-Kinase wird in Gegenwart des Phosphatase-Hemmstoffes Calyculin A sichtbar. ATP aktiviert über einen Ca²⁺-unabhängigen Mechanismus die MLK-Phosphatase. Dieser Schritt stellt eine sehr potente Wirkung auf den kontraktile Apparat dar, der die Wirkung der MLK-Kinase überspielt.

→ Aktivierung; |— Hemmung

5.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass extrazelluläres ATP über den MEK/p42/p44 MAPK-Weg die Phosphorylierung der MLK vermittelt. Darüber hinaus wurde erstmalig nachgewiesen, dass der MEK/MAPK-Signalweg über die Aktivierung der MLK-Kinase und nicht über eine Hemmung der MLK-Phosphatase an der Kontrolle des kontraktiven Apparates in Endothelzellen beteiligt ist. Es konnte gezeigt werden, dass ATP die MLK-Phosphorylierung nicht nur über einen Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Schritt, sondern auch Ca^{2+} -unabhängig über den MEK/MAPK-Weg steigern kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind aus zwei Gründen von besonderem Interesse:

(1) Extrazelluläres ATP ist als ein Mediator beschrieben, der in Endothelzellen die MLK-Phosphatase aktiviert und über eine MLK-Dephosphorylierung zu einer Abnahme der Gefäßpermeabilität führt (Noll et al., 2000). ATP hat aber auch eine Wirkung auf die MLK-Kinase, die, wie in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden konnte, über MEK/p42/p44 MAPK vermittelt wird. Durch Hemmung der MAPK ist es möglich, diesen Teil des Weges zu hemmen und die abdichtende Wirkung von ATP auf die Endothelzellschicht zu verstärken und somit die Permeabilität zu verringern.

Auf der Suche nach Substanzen, die die endotheliale Permeabilität steuern können, sind diejenigen, die eine Dephosphorylierung der MLK verursachen und damit kontraktile Kräfte und die Spannung innerhalb der Endothelzellschicht reduzieren, von besonderem Interesse. Diese Substanzen könnten zukünftig eingesetzt werden, um die Funktion der endothelialen Schranke einerseits zu stabilisieren und andererseits Organe vor Ödemen zu schützen. ATP ist der einzige zur Zeit bekannte Rezeptor-vermittelte Mediator, der die MLK-Phosphatase potent aktiviert. Zusätzlich zu diesem therapeutischen Ansatz sind Wirkstoffe, die vor einer Aktivierung der endothelialen MLK-Kinase schützen, ebenfalls von Interesse, da sie wahrscheinlich eine Aktivierung der MLK-Phosphatase und somit eine Dephosphorylierung der MLK begünstigen. Diese Studie zeigt, dass neben Hemmstoffen der MLK-Kinase, wie z.B. ML-7, auch Hemmstoffe des MEK/MAPK-Signalweges zu diesem Zweck genutzt werden könnten.

(2) Es wurde mit der Aktivierung der MLK-Kinase eine neue, Agonisten-induzierte Wirkung des MEK/MAPK-Weges in Endothelzellen beschrieben, der möglicherweise eine entscheidende Rolle bei einer Vielzahl von Funktionen zukommt.

Seit längerem ist bekannt, dass die p42/p44 MAPK eine zentrale Rolle bei Proliferations-, Migrations- und Angiogeneseprozessen, wie z.B. beim Tumorstromwachstum, einnimmt (Klemke et al., 1997; Berra et al., 2000; Schramek et al., 2002; Bogatcheva et al., 2003; Huang et al., 2004). Diese Prozesse gehen größtenteils mit einer Aktivierung des kontraktiven Apparates und mit einer gesteigerten Gefäßpermeabilität einher. Verschiedene Arbeitsgruppen haben aus diesem Grund bereits in Endothelzellen die Beteiligung der p42/p44 MAPK an der Kontrolle der Permeabilität untersucht. Hierzu gibt es kontroverse Befunde. Während manche Arbeitsgruppen zeigen, dass MEK-Hemmstoffe keine Auswirkungen auf die Gefäßpermeabilität haben, konnten andere Arbeitsgruppen sehr wohl zeigen, dass der MEK/MAPK-Signalweg an der Regulation der endothelialen Permeabilität beteiligt ist. (Kevil et al., 1998, 2000; Verin et al., 2000; Varma et al., 2002; Wu et al., 2005). Ob die p42/p44 MAPK allerdings bei der VEGF-induzierten Hyperpermeabilität eine Rolle spielt, ist fraglich (Pocock und Bates, 2001; Lal et al., 2001; Breslin et al., 2003).

Die Bedeutung der p42/p44 MAPK bei Migration und Angiogenese ist jedoch unumstritten. Die genauen Mechanismen, die dies vermitteln, sind allerdings noch unklar, ebenso wie die Frage, ob und inwiefern die MAPK-Aktivierung an der begleitenden Permeabilität beteiligt ist. In Glattmuskel- und Endothelzellen wird beschrieben, dass die p42/p44 MAPK Caldesmon phosphoryliert und es wird vermutet, dass die MAPK über diesen Weg den kontraktiven Apparat und die endotheliale Permeabilität beeinflusst (Adam et al., 1995; Verin et al., 2000; Liu et al., 2001; D'Angelo und Adam, 2002). Es gibt aber auch Hinweise, dass die p42/p44 MAPK in Endothelzellen zu einer Desorganisation und Instabilität von Occludinen und VE-Cadherinen an den Zell-Zell-Verbindungen führt (Kevil et al., 1998, 2000; Wu und Sheibani, 2003) sowie Einfluss auf Komponenten der Zell-Matrix-Verbindungen, wie z.B. Fokaladhäsions-Kinase (FAK) und Paxillin, nimmt (Liu et al., 2002; Ma et al., 2003; Huang et al., 2004).

In COS-7 Zellen konnte die MLK-Phosphorylierung über p42/p44 MAPK und MLK-Kinase und deren Einfluss auf die Zellmigration nachgewiesen werden und

auch in Glattmuskelzellen wird die Beteiligung des MEK/MAPK-Signalweges an der MLK-Phosphorylierung über MLK-Kinase angenommen (Morrison et al., 1996; Klemke et al., 1997; Arner und Pfitzer, 1999). Darüber hinaus wird vermutet, dass die p42/p44 MAPK im Rahmen der Zellteilung und Bildung des Spindelapparates die MLK phosphoryliert. Über eine Aktivierung der MLK-Phosphatase finden sich in der Literatur bislang keine Hinweise.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Verbindung der p42/p44 MAPK und der MLK-Kinase in Endothelzellen gezeigt. Die p42/p44 MAPK stellt damit ein mögliches Bindeglied zwischen Permeabilitätsregulation, Migration und Proliferation in Endothelzellen dar (Abb. 5.2). Die Fähigkeit der p42/p44 MAPK, über eine Aktivierung des kontraktilen Apparates die Permeabilität zu beeinflussen, würde sehr gut erklären, über welche Mechanismen es bei Angiogenese und Migration, bei denen immer auch die p42/p44 MAPK-Phosphorylierung erhöht ist, zu einer gesteigerten parazellulären Permeabilität kommt. Die vorliegende Arbeit trägt somit dazu bei, die komplexen Mechanismen der p42/p44 MAPK in Endothelzellen weiter aufzuklären und das Zusammenspiel von Proliferation, Migration und Angiogenese, bei dem die p42/p44 MAPK eine zentrale Rolle spielt, besser zu verstehen. Dieses Wissen trägt wiederum die Möglichkeit in sich, neue Therapieansätze zu finden, falls diese Mechanismen, wie im Fall von Atherosklerose, Herzhypertrophie oder Tumorangio-genese, außer Kontrolle geraten.

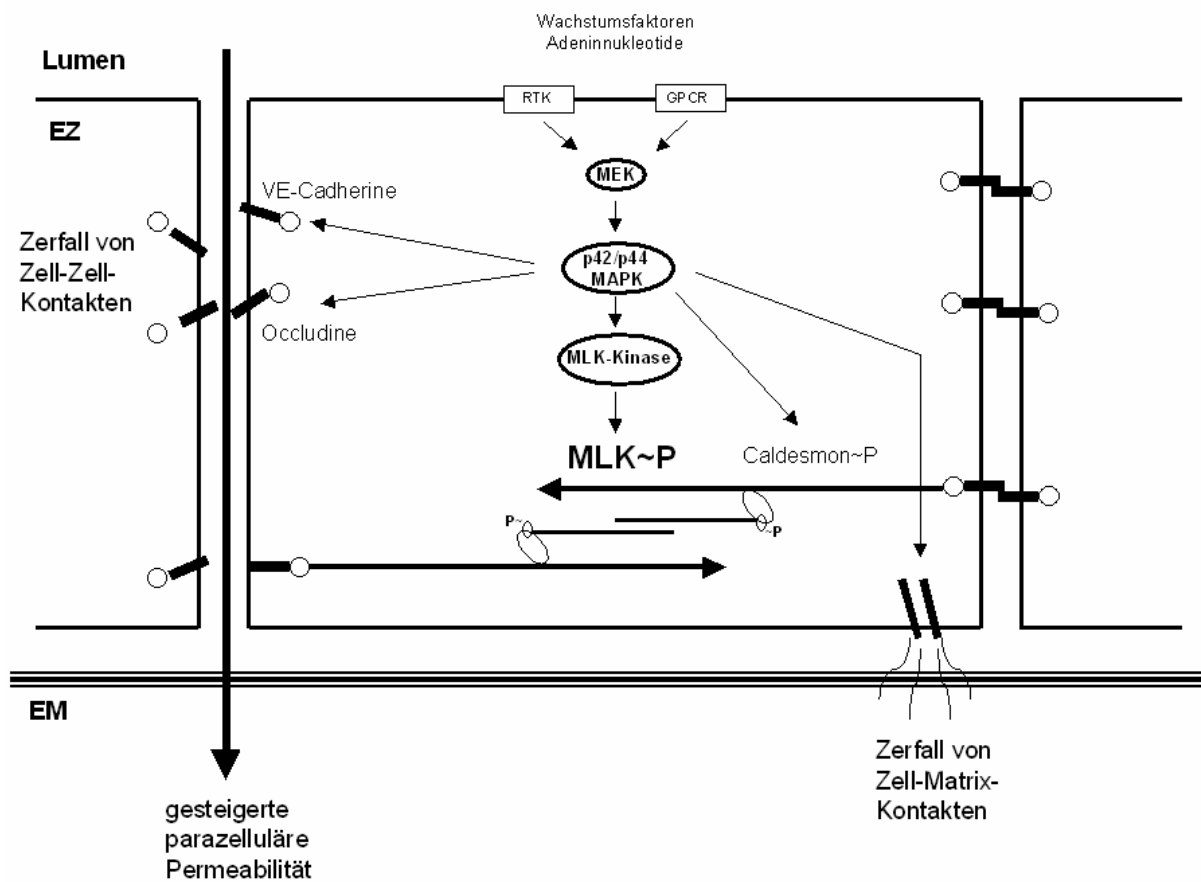


Abb. 5.2: Wirkung der p42/p44 MAPK auf die Aktivierung des kontraktilen Apparates und das Loslösen von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten, Zellfunktionen, die im Rahmen von Angiogenese, Migration und der endothelialen Schrankenfunktion eine entscheidende Rolle spielen und bei verschiedenen krankhaften Prozessen, wie z.B. Tumorwachstum und Ödembildung, pathologisch verändert sind.

6 Zusammenfassung

Die Phosphorylierung der endothelialen Myosinleichtketten (MLK) ist ein zentraler Mechanismus für die Kontrolle des endothelialen kontraktiven Apparates und der endothelialen Schrankenfunktion. Extrazelluläres ATP reguliert die Phosphorylierung der endothelialen Myosinleichtketten durch eine Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen MLK-Kinase und durch eine überwiegende Aktivierung der Ca^{2+} -unabhängigen MLK-Phosphatase. In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob die MEK/MAPK-Kaskade in den ATP-induzierten Signalwegen eingeschaltet ist. Die Phosphorylierung der p42 MAPK und die Phosphorylierung der MLK wurden dabei in kultivierten Aortenendothelzellen vom Schwein untersucht. ATP (10 μM) führte zu einer Steigerung der p42 MAPK-Phosphorylierung von basalen Werten von $17 \pm 3 \%$ auf $53 \pm 4 \%$. Dieser Effekt konnte durch zwei chemisch unterschiedliche MEK-Hemmstoffe, PD 98059 (20 μM) oder U0 126 (10 μM), unterdrückt werden.

Die Phosphorylierung der p42 MAPK war dabei unabhängig von dem ATP-induzierten zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg, da weder die Komplexbildung von Ca^{2+} durch den Ca^{2+} -Chelator BAPTA/AM (10 μM) noch die Hemmung des IP_3 -sensitiven Ca^{2+} -Freisetzungsmechanismus aus dem Endoplasmatischen Retikulum durch Xestospongin C (3 μM) die ATP-induzierte p42 MAPK-Phosphorylierung beeinflusste. Die Wirkung von ATP auf die p42 MAPK-Phosphorylierung beruhte weder auf einer Wirkung des ATP-Abbauproduktes Adenosin noch wurde die ATP-Wirkung über Adenosin-Rezeptoren vermittelt.

ATP steigerte die Aktivität der MLK-Kinase. Dieser Effekt konnte durch PD 98059 gehemmt werden. ATP steigerte ebenfalls die Aktivität der MLK-Phosphatase, welche jedoch nicht durch PD 98059 unterdrückt werden konnte. Daraus lässt sich schließen, dass der MEK/MAPK-Signalweg ein Ca^{2+} -unabhängiger Schritt der ATP-Signaltransduktion ist, der auf die MLK-Kinase zielt, nicht jedoch auf die MLK-Phosphatase.

7 Summary

Phosphorylation of endothelial myosin light chains (MLC) is a key mechanism in the control of endothelial contractile machinery and barrier function. Extracellular ATP influences phosphorylation of endothelial myosin light chains by an activation of Ca^{2+} -dependent MLC kinase and predominant activation of Ca^{2+} -independent MLC phosphatase. Here the role of the MEK/MAPK pathway in this signaling was investigated. Phosphorylation of p42 MAPK and phosphorylation of MLC were analyzed in cultured porcine aortic endothelial cells. ATP (10 μM) increased p42 MAPK phosphorylation from basal $17 \pm 3 \%$ to $53 \pm 4 \%$. This effect was suppressed in presence of the MEK inhibitors PD 98059 (20 μM) or U0 126 (10 μM). Phosphorylation of p42 MAPK was not dependent on the ATP-induced cytosolic Ca^{2+} rise, as it was unaltered when this was suppressed by the Ca^{2+} chelator BAPTA/AM (10 μM) or xestospongine C (3 μM), an inhibitor of the IP_3 -sensitive Ca^{2+} release mechanism of the endoplasmic reticulum. ATP-induced phosphorylation of p42 MAPK was not mimicked by the ATP-product adenosine nor mediated by adenosine receptors.

ATP increased MLC kinase activity. This effect was blocked in presence of PD 98059. ATP also increased MLC phosphatase activity, which was not inhibited by PD 98059. The MEK/MAPK pathway is a Ca^{2+} -independent part of the ATP signaling towards MLC kinase but not of an ATP signaling towards MLC phosphatase.

8 Literatur

- Adam L.P., Hathaway D.R. (1993).** Identification of mitogen-activated protein kinase phosphorylation sequences in mammalian h-Caldesmon. *FEBS Lett* 322: 56-60
- Adam L.P., Franklin M.T., Raff G.J., Hathaway D.R. (1995).** Activation of mitogen-activated protein kinase in porcine carotid arteries. *Circ Res* 76: 183-190
- Albelda S.M., Daise M., Levine E.M., Buck C.A. (1989).** Identification and characterization of cell-substratum adhesion receptors on cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 83: 1992-2002
- Albert J.L., Boyle J.P., Roberts J.A., Challiss R.A., Gubby S.E., Boarder M.R. (1997).** Regulation of brain capillary endothelial cells by P2Y receptors coupled to Ca²⁺, phospholipase C and mitogen-activated protein kinase. *Br J Pharmacol* 122: 935-941
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. (1997).** *Molekularbiologie der Zelle*. Jaenicke L. (Hrsg). VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- Arner A., Pfitzer G. (1999).** Regulation of cross-bridge cycling by Ca²⁺ in smooth muscle. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 134: 63-146
- Baldwin A.L., Thurston G. (2001).** Mechanics of endothelial cell architecture and vascular permeability. *Crit Rev Biomed Eng* 29: 247-278
- Bassenge E. (1996).** Endothelial function in different organs. *Prog Cardiovasc Dis* 39: 209-228
- Berra E., Milanini J., Richard D.E., Le Gall M., Vinals F., Gothie E., Roux D., Pages G., Pouysségur J. (2000).** Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia. *Biochem Pharmacol* 60: 1171-1178
- Bogatcheva N.V., Garcia J.G., Verin A.D. (2002).** Role of tyrosine kinase signaling in endothelial cell barrier regulation. *Vascul Pharmacol* 39: 201-212
- Bogatcheva N.V., Dudek S.M., Garcia J.G., Verin A.D. (2003).** Mitogen-activated protein kinases in endothelial pathophysiology. *J Investig Med* 51: 341-352
- Borbiev T., Verin A.D., Birukova A., Liu F., Crow M.T., Garcia J.G. (2003).** Role of CaM kinase II and ERK activation in thrombin-induced endothelial cell barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285: L43-L54
- Bornfeldt K.E., Krebs E.G. (1999).** Crosstalk between protein kinase A and growth factor receptor signaling pathways in arterial smooth muscle. *Cell Signal* 11: 465-477

Boswell C.A., Majno G., Joris I., Ostrom K.A. (1992). Acute endothelial cell contraction in vitro: a comparison with vascular smooth muscle cells and fibroblasts. *Microvasc Res* 43: 178-191

Breslin J.W., Pappas P.J., Cerveira J.J., Hobson R.W. 2nd, Duran W.N. (2003). VEGF increases endothelial permeability by separate signaling pathways involving ERK-1/2 and nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H92-H100

Burnstock G. (2002). Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 364-373

Campbell D.H., Sutherland R.L., Daly R.J. (1999). Signaling pathways and structural domains required for phosphorylation of EMS1/cortactin. *Cancer Res* 59: 5376-5385

Canagarajah B.J., Khokhlatchev A., Cobb M.H., Goldsmith E.J. (1997). Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* 90: 859-869

Catravas J.D., Orfanos S.E. (1997). Pathophysiologic functions of endothelial angiotensin-converting enzyme. In: *Vascular Endothelium: Physiology, Pathology, and Therapeutic Opportunities*. Born G.V.R., Schwartz C.J. (Hrsg). Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart: 193-204

Cheresh D.A., Leng J., Klemke R.L. (1999). Regulation of cell contraction and membrane ruffling by distinct signals in migratory cells. *J Cell Biol* 146: 1107-1116

Cho S.Y., Klemke R.L. (2000). Extracellular-regulated kinase activation and CAS/Crk coupling regulate cell migration and suppress apoptosis during invasion of the extracellular matrix. *J Cell Biol* 149: 223-236

Cobb M.H., Goldsmith E.J. (1995). How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* 270: 14843-14846

Communi D., Raspe E., Piroton S., Boeynaems J.M. (1995). Coexpression of P_{2Y} and P_{2U} receptors on aortic endothelial cells. Comparison of cell localization and signaling pathways. *Circ Res* 76: 191-198

Communi D., Janssens R., Suarez-Huerta N., Robaye B., Boeynaems J.M. (2000). Advances in signalling by extracellular nucleotides: the role and transduction mechanisms of P_{2Y} receptors. *Cell Signal* 12: 351-360

Conti M.A., Adelstein R.S. (1981). The relationship between calmodulin binding and phosphorylation of smooth muscle myosin kinase by the catalytic subunit of 3':5' cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 256: 3178-3181

Cotran R.S. (1987). American association of pathologists president's address. New roles for the endothelium in inflammation and immunity. *Am J Pathol* 129: 407-413

D'Angelo G., Adam L.P. (2002). Inhibition of ERK attenuates force development by lowering myosin light chain phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H602-H610

Davis R.J. (1993). The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 268: 14553-14556

de Clerck F., de Brabander M., Neels H., van de Velde V. (1981). Direct evidence for the contractile capacity of endothelial cells. *Thromb Res* 23: 505-520

Dejana E., Corada M., Lampugnani M.G. (1995). Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J* 9: 910-918

Dessy C., Kim I., Sougnez C.L., Laporte R., Morgan K.G. (1998). A role for MAP kinase in differentiated smooth muscle contraction evoked by alpha-adrenoceptor stimulation. *Am J Physiol* 275: C1081-C1086

Drenckhahn D., Wagner J. (1986). Stress fibers in the splenic sinus endothelium in situ: molecular structure, relationship to the extracellular matrix, and contractility. *J Cell Biol* 102: 1738-1747

Drenckhahn D., Dermietzel R. (1988). Organization of the actin filament cytoskeleton in the intestinal brush border: a quantitative and qualitative immunoelectron microscope study. *J Cell Biol* 107: 1037-1048

Drenckhahn D., Ness W. (1997). The endothelial contractile cytoskeleton. In: *Vascular Endothelium: Physiology, Pathology, and Therapeutic Opportunities*. Born G.V.R., Schwartz C.J. (Hrsg). Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart: 1-25

Dubyak G.R., El-Moatassim C. (1993). Signal transduction via P₂-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 265: C577-C606

Dudek S.M., Birukov K.G., Zhan X., Garcia J.G. (2002). Novel interaction of cortactin with endothelial cell myosin light chain kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 298: 511-519

Dudek S.M., Jacobson J.R., Chiang E.T., Birukov K.G., Wang P., Zhan X., Garcia J.G. (2004). Pulmonary endothelial cell barrier enhancement by sphingosine 1-phosphate: roles for cortactin and myosin light chain kinase. *J Biol Chem* 279: 24692-24700

Dvorak A.M., Feng D. (2001). The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle. *J Histochem Cytochem* 49: 419-432

English J., Pearson G., Wilsbacher J., Swantek J., Karandikar M., Xu S., Cobb M.H. (1999). New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp Cell Res* 253: 255-270

- Erlinge D. (1998).** Extracellular ATP: a growth factor for vascular smooth muscle cells. *Gen Pharmacol* 31: 1-8
- Fincham V.J., James M., Frame M.C., Winder S.J. (2000).** Active ERK/MAP kinase is targeted to newly forming cell-matrix adhesions by integrin engagement and v-Src. *EMBO J* 19: 2911-2923
- Folkman J., Klagsbrun M. (1987).** Vascular physiology. A family of angiogenic peptides. *Nature* 329: 671-672
- Furchgott R.F., Zawadzki J.V. (1980).** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376
- Gabbiani G., Gabbiani F., Lombardi D., Schwartz S.M. (1983).** Organization of actin cytoskeleton in normal and regenerating arterial endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2361-2364
- Gaehtgens P. (1994).** Das Kreislaufsystem. In: *Lehrbuch der Physiologie*. Klinke R., Silbernagl S. (Hrsg). Georg Thieme Verlag, Stuttgart: 135-181
- Gafni J., Munsch J.A., Lam T.H., Catlin M.C., Costa L.G., Molinski T.F., Pessah I.N. (1997).** Xestospongins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor. *Neuron* 19: 723-733
- Garcia J.G., Siflinger-Birnboim A., Bizios R., Del Vecchio P.J., Fenton J.W. 2nd, Malik A.B. (1986).** Thrombin-induced increase in albumin permeability across the endothelium. *J Cell Physiol* 128: 96-104
- Garcia J.G., Davis H.W., Patterson C.E. (1995).** Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation. *J Cell Physiol* 163: 510-522
- Garcia J.G., Schaphorst K.L. (1995).** Regulation of endothelial cell gap formation and paracellular permeability. *J Investig Med* 43: 117-126
- Gardner T.W., Leshner T., Khin S., Vu C., Barber A.J., Brennan W.A. Jr. (1996).** Histamine reduces ZO-1 tight-junction protein expression in cultured retinal microvascular endothelial cells. *Biochem J* 320: 717-721
- Goeckeler Z.M., Wysolmerski R.B. (1995).** Myosin light chain kinase-regulated endothelial cell contraction: the relationship between isometric tension, actin polymerization, and myosin phosphorylation. *J Cell Biol* 130: 613-627
- Goetze S., Kintscher U., Kim S., Meehan W.P., Kaneshiro K., Collins A.R., Fleck E., Hsueh W.A., Law R.E. (2001).** Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit nuclear but not cytosolic extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase-regulated steps in vascular smooth muscle cell migration. *J Cardiovasc Pharmacol* 38: 909-921

- Gordon J.L. (1986).** Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J* 233: 309-319
- Gottlieb A.I., Langille B.L., Wong M.K., Kim D.W. (1991).** Structure and function of the endothelial cytoskeleton. *Lab Invest* 65: 123-137
- Graham A., McLees A., Kennedy C., Gould G.W., Plevin R. (1996).** Stimulation by the nucleotides, ATP and UTP of mitogen-activated protein kinase in EAhy 926 endothelial cells. *Br J Pharmacol* 117: 1341-1347
- Haraldsson B., Zackrisson U., Rippe B. (1986).** Calcium dependence of histamine-induced increases in capillary permeability in isolated perfused rat hindquarters. *Acta Physiol Scand* 128: 247-258
- Hashimoto Y., Soderling T.R. (1990).** Phosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II: comparative study of the phosphorylation sites. *Arch Biochem Biophys* 278: 41-45
- Hecker M. (1999).** Pathophysiologie der koronaren Endothelfunktion. In: *Autonomes Nervensystem und Koronare Herzkrankheit*. Griebenow R., Gülker H., Dominiak P., Piper H.M. (Hrsg). Novartis Pharma GmbH, Nürnberg: 65-86
- Howe A., Aplin A.E., Alahari S.K., Juliano R.L. (1998).** Integrin signaling and cell growth control. *Curr Opin Cell Biol* 10: 220-231
- Huang C., Jacobson K., Schaller M.D. (2004).** MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* 117: 4619-4628
- Huwiler A., Pfeilschifter J. (1994).** Stimulation by extracellular ATP and UTP of the mitogen-activated protein kinase cascade and proliferation of rat renal mesangial cells. *Br J Pharmacol* 113: 1455-1463
- Ikeda M., Takei T., Mills I., Sumpio B.E. (1998).** Calcium-independent activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 by cyclic strain. *Biochem Biophys Res Commun* 247: 462-465
- Ikeda M., Takei T., Mills I., Kito H., Sumpio B.E. (1999).** Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 activation in endothelial cells exposed to cyclic strain. *Am J Physiol* 276: H614-H622
- Jin N., Siddiqui R.A., English D., Rhoades R.A. (1996).** Communication between tyrosine kinase pathway and myosin light chain kinase pathway in smooth muscle. *Am J Physiol* 271: H1348-H1355
- Kamm K.E., Stull J.T. (2001).** Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J Biol Chem* 276: 4527-4530
- Katoch S.S., Moreland R.S. (1995).** Agonist and membrane depolarization induced activation of MAP kinase in the swine carotid artery. *Am J Physiol* 269: H222-H229

Kevil C.G., Payne D.K., Mire E., Alexander J.S. (1998). Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins. *J Biol Chem* 273: 15099-15103

Kevil C.G., Oshima T., Alexander B., Coe L.L., Alexander J.S. (2000). H₂O₂-mediated permeability: role of MAPK and occludin. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C21-C30

Khokhlatchev A.V., Canagarajah B., Wilsbacher J., Robinson M., Atkinson M., Goldsmith E., Cobb M.H. (1998). Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 93: 605-615

Kinugasa T., Sakaguchi T., Gu X., Reinecker H.C. (2000). Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* 118: 1001-1011

Klemke R.L., Cai S., Giannini A.L., Gallagher P.J., de Lanerolle P., Cheresh D.A. (1997). Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol* 137: 481-492

Kolodney M.S., Wysolmerski R.B. (1992). Isometric contraction by fibroblasts and endothelial cells in tissue culture: a quantitative study. *J Cell Biol* 117: 73-82

Kroll J., Waltenberger J. (1997). The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 272: 32521-32527

Kroll J., Waltenberger J. (2000). Regulation der Endothelfunktion und der Angiogenese durch den Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktor-A (VEGF-A). *Z Kardiol* 89: 206-218

Kyhse-Andersen J. (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10: 203-209

Kyriakis J.M., Avruch J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81: 807-869

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Lal B.K., Varma S., Pappas P.J., Hobson R.W. 2nd, Duran W.N. (2001). VEGF increases permeability of the endothelial cell monolayer by activation of PKB/akt, endothelial nitric-oxide synthase, and MAP kinase pathways. *Microvasc Res* 62: 252-262

Lampugnani M.G., Resnati M., Raiteri M., Pigott R., Pisacane A., Houen G., Ruco L.P., Dejana E. (1992). A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol* 118: 1511-1522

Lampugnani M.G., Corada M., Caveda L., Breviario F., Ayalon O., Geiger B., Dejana E. (1995). The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, β -catenin, and α -catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *J Cell Biol* 129: 203-217

Laposata M., Dohnansky D.K., Shin H.S. (1983). Thrombin-induced gap formation in confluent endothelial cell monolayers in vitro. *Blood* 62: 549-556

Lee T.Y., Gotlieb A.I. (2003). Microfilaments and microtubules maintain endothelial integrity. *Microsc Res Tech* 60: 115-127

Li Y., Liu J., Zhan X. (2000). Tyrosine phosphorylation of cortactin is required for H₂O₂-mediated injury of human endothelial cells. *J Biol Chem* 275: 37187-37193

Liebich H.G. (1993). *Funktionelle Histologie: Farbatlas und Kurzlehrbuch der mikroskopischen Anatomie der Haussäugetiere*. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

Liebmann C. (2001). Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell signal* 13: 777-785

Liu F., Verin A.D., Borbiev T., Garcia J.G. (2001). Role of cAMP-dependent protein kinase A activity in endothelial cell cytoskeleton rearrangement. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L1309-L1317

Liu Z.X., Yu C.F., Nickel C., Thomas S., Cantley L.G. (2002). Hepatocyte growth factor induces ERK-dependent paxillin phosphorylation and regulates paxillin-focal adhesion kinase association. *J Biol Chem* 277: 10452-10458

Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.E. (2001). *Molekulare Zellbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg

Lückhoff A., Busse R. (1986). Increased free calcium in endothelial cells under stimulation with adenine nucleotides. *J Cell Physiol* 126: 414-420

Lum H., Aschner J.L., Phillips P.G., Fletcher P.W., Malik A.B. (1992). Time course of thrombin-induced increase in endothelial permeability: relationship to Ca²⁺_i and inositol polyphosphates. *Am J Physiol* 263: L219-L225

Lum H., Malik A.B. (1994). Regulation of vascular endothelial barrier function. *Am J Physiol* 267: L223-L241

Luna E.J., Hitt A.L. (1992). Cytoskeleton-plasma membrane interactions. *Science* 258: 955-964

- Luttrell L.M., Daaka Y., Della Rocca G.J., Lefkowitz R.J. (1997).** G protein-coupled receptors mediate two functionally distinct pathways of tyrosine phosphorylation in rat 1a fibroblasts. Shc phosphorylation and receptor endocytosis correlate with activation of Erk kinases. *J Biol Chem* 272: 31648-31656
- Ma H., Calderon T.M., Kessel T., Ashton A.W., Berman J.W. (2003).** Mechanisms of hepatocyte growth factor-mediated vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res* 93: 1066-1073
- Madara J.L. (1987).** Intestinal absorptive cell tight junctions are linked to cytoskeleton. *Am J Physiol* 253: C171-C175
- Majno G., Palade G.E. (1961).** Studies on inflammation. I. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. *J Biophys Biochem Cytol* 11: 571-605
- Majno G., Shea S.M., Leventhal M. (1969).** Endothelial contraction induced by histamine-type mediators: an electron microscopic study. *J Cell Biol* 42: 647-672
- Mansfield P.J., Shayman J.A., Boxer L.A. (2000).** Regulation of polymorphonuclear leukocyte phagocytosis by myosin light chain kinase after activation of mitogen-activated protein kinase. *Blood* 95: 2407-2412
- Michel C.C. (1996).** Transport of macromolecules through microvascular walls. *Cardiovasc Res* 32: 644-653
- Morel N.M., Dodge A.B., Patton W.F., Herman I.M., Hechtman H.B., Shepro D. (1989).** Pulmonary microvascular endothelial cell contractility on silicone rubber substrate. *J Cell Physiol* 141: 653-659
- Morel N.M., Petruzzo P.P., Hechtman H.B., Shepro D. (1990).** Inflammatory agonists that increase microvascular permeability in vivo stimulate cultured pulmonary microvessel endothelial cell contraction. *Inflammation* 14: 571-583
- Morgan-Boyd R., Stewart J.M., Vavrek R.J., Hassid A. (1987).** Effects of bradykinin and angiotensin II on intracellular Ca^{2+} dynamics in endothelial cells. *Am J Physiol* 253: C588-C598
- Morrison D.L., Sanghera J.S., Stewart J., Sutherland C., Walsh M.P., Pelech S.L. (1996).** Phosphorylation and activation of smooth muscle myosin light chain kinase by MAP kinase and cyclin-dependent kinase-1. *Biochem Cell Biol* 74: 549-557
- Motte S., Piroton S., Boeynaems J.M. (1993).** Heterogeneity of ATP receptors in aortic endothelial cells. Involvement of P_{2Y} and P_{2U} receptors in inositol phosphate response. *Circ Res* 72: 504-510

Motte S., Communi D., Piroton S., Boeynaems J.M. (1995). Involvement of multiple receptors in the actions of extracellular ATP: the example of vascular endothelial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 27: 1-7

Moy A.B., Shasby S.S., Scott B.D., Shasby D.M. (1993). The effect of histamine and cyclic adenosine monophosphate on myosin light chain phosphorylation in human umbilical vein endothelial cells. *J Clin Invest* 92: 1198-1206

Moy A.B., Blackwell K., Kamath A. (2002). Differential effects of histamine and thrombin on endothelial barrier function through actin-myosin tension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H21-H29

Nawroth P., Lasch H.G. (1999). *Vaskuläre Medizin systematisch*. UNI-MED Verlag AG, Bremen

Neary J.T., McCarthy M., Kang Y., Zuniga S. (1998). Mitogenic signaling from P1 and P2 purinergic receptors to mitogen-activated protein kinase in human fetal astrocyte cultures. *Neurosci Lett* 242: 159-162

Neary J.T., Kang Y., Bu Y., Yu E., Akong K., Peters C.M. (1999). Mitogenic signaling by ATP/P2Y purinergic receptors in astrocytes: involvement of a calcium-independent protein kinase C, extracellular signal-regulated protein kinase pathway distinct from the phosphatidylinositol-specific phospholipase C/calcium pathway. *J Neurosci* 19: 4211-4220

Nguyen D.H., Catling A.D., Webb D.J., Sankovic M., Walker L.A., Somlyo A.V., Weber M.J., Gonias S.L. (1999). Myosin light chain kinase functions downstream of Ras/ERK to promote migration of urokinase-type plasminogen activator-stimulated cells in an integrin-selective manner. *J Cell Biol* 146: 149-164

Nishikawa M., Shirakawa S., Adelstein R.S. (1985). Phosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase by protein kinase C. Comparative study of the phosphorylated sites. *J Biol Chem* 260: 8978-8983

Noll T., Hölschermann H., Koprek K., Gündüz D., Haberbosch W., Tillmanns H., Piper H.M. (1999). ATP reduces macromolecule permeability of endothelial monolayers despite increasing $[Ca^{2+}]_i$. *Am J Physiol* 276: H1892-H1901

Noll T., Schäfer M., Schavier-Schmitz U., Piper H.M. (2000). ATP induces dephosphorylation of myosin light chain in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C717-C723

Olsson R.A., Pearson J.D. (1990). Cardiovascular purinoceptors. *Physiol Rev* 70: 761-845

Pages G., Milanini J., Richard D.E., Berra E., Gothie E., Vinals F., Pouysségur J. (2000). Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase cascade. *Ann N Y Acad Sci* 902: 187-200

- Patel V., Brown C., Goodwin A., Wilkie N., Boarder M.R. (1996).** Phosphorylation and activation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinase are required for the P2 purinoceptor stimulation of endothelial prostacyclin production. *Biochem J* 320: 221-226
- Pawson T., Scott J.D. (1997).** Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278: 2075-2080
- Pearson J.D., Slakey L.L., Gordon J.L. (1983).** Stimulation of prostaglandin production through purinoceptors on cultured porcine endothelial cells. *Biochem J* 214: 273-276
- Persechini A., Kamm K.E., Stull J.T. (1986).** Different phosphorylated forms of myosin in contracting tracheal smooth muscle. *J Biol Chem* 261: 6293-6299
- Peters S.C., Reis A., Noll T. (2005).** Preparation of endothelial cells from micro- and macrovascular origin. In: *Practical Methods in Cardiovascular Research*. Dhein S., Mohr F.W., Delmar M. (Hrsg). Springer Verlag, Heidelberg: 610-629
- Pierce K.L., Luttrell L.M., Lefkowitz R.L. (2001).** New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades. *Oncogene* 20: 1532-1539
- Pocock T.M., Bates D.O. (2001).** In vivo mechanisms of vascular endothelial growth factor-mediated increased hydraulic conductivity of Rana capillaries. *J Physiol* 534: 479-488
- Pouyssegur J. (2000).** Signal transduction. An arresting start for MAPK. *Science* 290: 1515-1518
- Rabiet M.J., Plantier J.L., Rival Y., Genoux Y., Lampugnani M.G., Dejane E. (1996).** Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 488-496
- Reszka A.A., Seger R., Diltz C.D., Krebs E.G., Fischer E.H. (1995).** Association of mitogen-activated protein kinase with the microtubule cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8881-8885
- Robinson M.J., Cobb M.H. (1997).** Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9: 180-186
- Roy M., Li Z., Sacks D.B. (2004).** IQGAP1 binds ERK2 and modulates its activity. *J Biol Chem* 279: 17329-17337
- Santiago-Perez L.I., Flores R.V., Santos-Berrios C., Chorna N.E., Krugh B., Garrad R.C., Erb L., Weisman G.A., Gonzalez F.A. (2001).** P2Y₂ nucleotide receptor signaling in human monocytic cells: activation, desensitization and coupling to mitogen-activated protein kinases. *J Cell Physiol* 187: 196-208

- Schnittler H.J., Wilke A., Gress T., Suttorp N., Drenckhahn D. (1990).** Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium. *J Physiol* 431: 379-401
- Schramek H. (2002).** MAP kinases: from intracellular signals to physiology and disease. *News Physiol Sci* 17: 62-67
- Sheldon R., Moy A., Lindsley K., Shasby S., Shasby D.M. (1993).** Role of myosin light-chain phosphorylation in endothelial cell retraction. *Am J Physiol* 265: L606-L612
- Short S.M., Boyer J.L., Juliano R.L. (2000).** Integrins regulate the linkage between upstream and downstream events in G protein-coupled receptor signaling to mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 275: 12970-12977
- Sobue K., Sellers J.R. (1991).** Caldesmon, a novel regulatory protein in smooth muscle and nonmuscle actomyosin systems. *J Biol Chem* 266: 12115-12118
- Soltoff S.P. (1998).** Related adhesion focal tyrosine kinase and the epidermal growth factor receptor mediate the stimulation of mitogen-activated protein kinase by the G-protein-coupled P_{2Y2} receptor. Phorbol ester or [Ca²⁺]_i elevation can substitute for receptor activation. *J Biol Chem* 273: 23110-23117
- Spahr R., Piper H.M. (1990).** Microcarrier cultures of endothelial cells. In: *Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research*. Piper H.M. (Hrsg). Springer Verlag, Heidelberg: 220-229
- Srinivas S.P., Satpathy M., Gallagher P., Lariviere E., van Driessche W. (2004).** Adenosine induces dephosphorylation of myosin II regulatory light chain in cultured bovine corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 79: 543-551
- Stevens T., Garcia J.G., Shasby D.M., Bhattacharya J., Malik A.B. (2000).** Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L419-L422
- Stull J.T., Tansey M.G., Tang D.C., Word R.A., Kamm K.E. (1993).** Phosphorylation of myosin light chain kinase: a cellular mechanism for Ca²⁺ desensitization. *Mol Cell Biochem* 127-128: 229-237
- Sugden P.H., Clerk A. (1997).** Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cell Signal* 9: 337-351
- Suizu F., Ueda K., Iwasaki T., Murata-Hori M., Hosoya H. (2000).** Activation of actin-activated MgATPase activity of myosin II by phosphorylation with MAPK-activated protein kinase-1b (RSK-2). *J Biochem* 128: 435-440
- Sumpio B.E., Riley J.T., Dardik A. (2002).** Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 1508-1512

- Toborek M., Kaiser S. (1999).** Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol* 94: 295-314
- Tohgo A., Pierce K.L., Choy E.W., Lefkowitz R.J., Luttrell L.M. (2002).** β -Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *J Biol Chem* 277: 9429-9436
- Vale R.D. (1994).** Getting a grip on myosin. *Cell* 78: 733-737
- van Hinsbergh V.W.M. (1997).** Endothelial permeability for macromolecules. Mechanistic aspects of pathophysiological modulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 1018-1023
- van Hinsbergh V.W.M., van Nieuw Amerongen G.P., Draijer R. (1997).** Regulation of the permeability of human endothelial cell monolayers. In: *Vascular Endothelium: Physiology, Pathology, and Therapeutic Opportunities*. Born G.V.R., Schwartz C.J. (Hrsg). Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart: 61-76
- Vane J.R., Botting R.M. (1995).** Orchestration of the blood circulation by the endothelium. In: *The endothelial cell in health and disease*. Vane J.R., Born G.V.R., Welzel D. (Hrsg). Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart: 1-32
- Vanhoutte P.M., Mombouli J.V. (1996).** Vascular endothelium: vasoactive mediators. *Prog Cardiovasc Dis* 39: 229-238
- Varma S., Breslin J.W., Lal B.K., Pappas P.J., Hobson R.W. 2nd, Duran W.N. (2002).** p42/44 MAPK regulates baseline permeability and cGMP-induced hyperpermeability in endothelial cells. *Microvasc Res* 63: 172-178
- Verin A.D., Liu F., Bogatcheva N., Borbiev T., Hershenson M.B., Wang P., Garcia J.G. (2000).** Role of ras-dependent ERK activation in phorbol ester-induced endothelial cell barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L360-L370
- Wang Y., Zhang J., Yi X.J., Yu F.S. (2004).** Activation of ERK1/2 MAP kinase pathway induces tight junction disruption in human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* 78: 125-136
- Weed S.A., Parsons J.T. (2001).** Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. *Oncogene* 20: 6418-6434
- Whitmarsh A.J., Davis R.J. (1998).** Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem Sci* 23: 481-485
- Wong A.J., Pollard T.D., Herman I.M. (1983).** Actin filament stress fibers in vascular endothelial cells in vivo. *Science* 219: 867-869

- Wu N.Z., Baldwin A.L. (1992).** Transient venular permeability increase and endothelial gap formation induced by histamine. *Am J Physiol* 262: H1238-H1247
- Wu J., Sheibani N. (2003).** Modulation of VE-cadherin and PECAM-1 mediated cell-cell adhesions by mitogen-activated protein kinases. *J Cell Biochem* 90: 121-137
- Wu M.H., Yuan S.Y., Granger H.J. (2005).** The protein kinase MEK 1/2 mediate vascular endothelial growth factor- and histamine-induced hyperpermeability in porcine coronary venules. *J Physiol* 563: 95-104
- Wysolmerski R.B., Lagunoff D. (1988).** Inhibition of endothelial cell retraction by ATP depletion. *Am J Pathol* 132: 28-37
- Wysolmerski R.B., Lagunoff D. (1990).** Involvement of myosin light-chain kinase in endothelial cell retraction. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 16-20
- Wysolmerski R.B., Lagunoff D. (1991).** Regulation of permeabilized endothelial cell retraction by myosin phosphorylation. *Am J Physiol* 261: C32-C40
- Yang L., Cranson D., Trinkaus-Randall V. (2004).** Cellular injury induces activation of MAPK via P2Y receptors. *J Cell Biochem* 91: 938-950
- Yousufzai S.Y., Gao G., Abdel-Latif A.A. (2000).** Mitogen-activated protein kinase inhibitors suppress prostaglandin F_{2α}-induced myosin-light chain phosphorylation and contraction in iris sphincter smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 407: 17-26
- Yuan S.Y. (2002).** Protein kinase signaling in the modulation of microvascular permeability. *Vascul Pharmacol* 39: 213-223
- Zhang Y., Moreland S., Moreland R.S. (1994).** Regulation of vascular smooth muscle contraction: myosin light chain phosphorylation dependent and independent pathways. *Can J Physiol Pharmacol* 72: 1386-1391
- Zimmermann H. (1994).** Signalling via ATP in the nervous system. *Trends Neurosci* 17: 420-426

9 Danksagung

Besonders danke ich meinem Doktorvater und Betreuer des Graduiertenkollegs Herrn PD Dr. Noll für die Bereitstellung des Themas, die theoretische Einarbeitung und Hilfe bei der Auswertung der Experimente, seine freundliche und hilfsbereite Art, die regelmäßige Diskussion von kritischen Fragen und so manche erheiternden Gespräche und Diskussionen darüber hinaus.

Unserem Institutsleiter und Sprecher des Graduiertenkollegs Herrn Prof. Dr. Dr. Piper danke ich für die konstruktive Kritik und die aufbauenden Worte während der Samstagsberichtsseminare und besonders für die Hilfe zur Anfertigung des Papers.

Bei Herrn Prof. Dr. Gerstberger bedanke ich mich sehr für die freundliche Betreuung dieser Arbeit im Fachbereich Veterinärmedizin.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Graduiertenkollegs 534 und die mit dem Kolleg verbundenen Seminare, Praktika und Veranstaltungen. Diese haben dazu verholfen Kontakte zu knüpfen und Einblicke in andere Labore und Methoden zu gewinnen, die über das Thema der eigenen Arbeit hinausgingen.

Allen Teilnehmern des Graduiertenkollegs danke ich für den Austausch und das gute Verhältnis untereinander. Den Praktikumsleitern und allen Vortragenden im Rahmen der Donnerstagsseminare vielen Dank für ihre Mühe und Geduld.

Mein ganz besonderer Dank gilt den Technischen Assistenten Andrea Fischer-Heuschkel, Hermann Holzträger, Anna Reis und Anika Seipp für ihre Einarbeitung, Hilfe und das freundschaftliche Verhältnis.

Allen weiteren Mitarbeitern des Institutes und allen Mitdoktoranden danke ich ebenfalls für ihre Hilfsbereitschaft, das freundschaftliche Verhältnis und für die nette Arbeitsatmosphäre.

Dr. Frauke Härtel, Anna Reis, Daniela Schreiber und Dr. Ralph Brehm danke ich für das Korrekturlesen meiner Promotionsarbeit.

Darüber hinaus danke ich meinem Mann Ralph ganz herzlich für seine Geduld und seine fachliche und moralische Unterstützung, welche sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Und mein besonderer Dank gilt nicht zuletzt meinen Eltern, die mir das Tiermedizinstudium ermöglicht haben und mich auch bei meinem Promotionsvorhaben unterstützt haben. Ich habe ihnen viel zu verdanken.

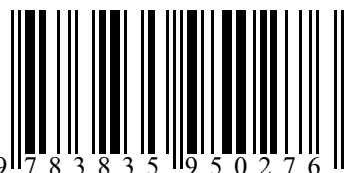
édition scientifique

VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5027-4



9 783835 950276