ETH zürich

ETH Library

The cyclic GMP-dependent protein kinase of vascular smooth muscle sarcolemma

characterization of the major substrate of the phosphorylation process

Doctoral Thesis

Author(s):
Baltensperger, Kurt

Publication date:
1989

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-000543882

Rights / license:
In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

This page was generated automatically upon download from the ETH Zurich Research Collection.
For more information, please consult the Terms of use.

Diss. ETH No. 9007

THE CYCLIC GMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE SARCOLEMMA: CHARACTERIZATION OF THE MAJOR SUBSTRATE OF THE PHOSPHORYLATION PROCESS

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
KURT BALTENSPERGER
dipl. Natw. ETH
born December 1, 1959
citizen of Brütten, ZH

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. E. Carafoli, examiner
Prof. Dr. H. Eppenberger, co-examiner
Dr. M. Chiesi, co-examiner

Zürich 1989

ZUSAMMENFASSUNG

Endothelium-abhängige Vasorelaxation ist von grosser pharmakologischer Bedeutung bei der Therapie von Coronarspasmen und Angina pectoris mittels Nitrovasodilatoren. Neuere Arbeiten schlagen einen cGMP-abhängigen Mechanismus vor, um die Effekte der Nitrovasodilatoren auf glatte Muskulatur zu erklären. Dabei soll die Ca-Pumpe der Plasmamembran durch cGMP-abhängige Phosphorylierung stimuliert werden [Popescu, L.M., Panoiu, C., Hinescu, M., und Nutu, O. (1985) Eur. J. Pharmacol. 107, 393-394, Furukawa, K., und Nakamura, H. (1987) J. Biochem. 101, 287-290]. Diese Hypothese wurde an einer Sarkolemma-Präparation aus glatter Muskulatur der Aorta thoracica (Schwein) überprüft. In den Actomyosin-extrahierten Membranen konnte sowohl eine ATP-abhängige Ca-Pumpe als auch eine cGMP-abhängige Kinase (G-Kinase) Aktivität nachgewiesen werden. Die Molekularmasse des Hauptsubstrates (G1) der G-Kinase and dasjenige der Ca-Pumpe wurden miteinander verglichen. Die elektrophoretische Analyse des phosphorylierten Zwischenproduktes der Ca-ATPase und des G1-Phosphoproteins zeigte, dass diese zwei Proteine nicht identisch sind. Die Resultate wurden durch die Verwendung zweier anderer Methoden (^{125}I-Calmodulin Overlay und immunologischer Vergleich mit der Erythrozyten Ca-ATPase) bestätigt. Mögliche Effekte einer cGMP-abhängigen Phosphorylierung von Membran-Proteinen auf die Ca-Aufnahme sarkolemmaler Vesikel wurden ebenfalls in Betracht gezogen. Es stellte sich jedoch heraus, dass die cGMP-abhängige Phosphorylierung der Substrate der G-Kinase extrem temperaturempfindlich ist, was zu einem niedrigen steady-state Wert der G1-Phosphorylierung bei 37° C führt. Diese Schwierigkeit konnte durch die Verwendung von ATP[γS] zur Phosphorylierung überwunden werden. Die cGMP-abhängige Thiophosphorylierung führte jedoch zu keiner Stimulation der Ca-Aufnahme in Membranvesikel. Diese Resultate zeigen, dass die Ca-Pumpe der Plasmamembran glatter Muskulatur weder ein Substrat der G-Kinase ist noch durch einen cGMP-abhängigen Mechanismus reguliert wird. Frühere Publikationen, die eine direkte cGMP-abhängige Modulation der Ca-Pumpe postulierten, müssen deshalb neu interpretiert werden.

Offenbar stellt G1 ein unbekanntes Substrat der G-Kinase dar, obwohl seine Phosphorylierung schon vor mehreren Jahren beschrieben wurde. Im zweiten Teil

der Arbeit wurden deshalb die physiko-chemischen und biochemischen Eigenschaften des G1-Phosphoproteins näher untersucht. Kupferphenanthrolin-katalysierte Oxidation von G1 in sarkolemmalen Membranen und in einer solubilisierten Fraktion ergab, dass G1 *in situ* als Oligomer vorliegt. G1-Oligomere konnten zusätzlich mit einer sedimentierbaren Spezies oxidativ vernetzt werden. Letztere wurde durch 2-dimensionale (nichtreduziert/reduziert) SDS-PAGE als Aktin identifiziert, welches vermutlich membrangebundenes Aktin repräsentiert. Im weiteren zeigten Experimente mit DNase I Affinitätschromatographie, dass ein Teil von G1 spezifisch zusammen mit Aktin angereichert werden konnte. G1 wurde nur unter bestimmten Bedingungen durch nicht-ionische Detergentien solubilisiert. Interessanterweise waren hohe Salzkonzentrationen oder millimolare ATP-Konzentrationen zu dessen Solubilisation durch Triton X-100 notwendig. Ein ähnliches Verhalten wurde für einen Komplex von Calmodulin und einem 110 kDa Protein aus isolierten Bürstensaum-Mikrovilli beschrieben [Verner und Bretscher (1985) J. Cell Biol. 100, 1455-1465]. Obwohl sich G1 und 110K-CaM in verschiedener Hinsicht unterscheiden, lassen Aktinbindung und ähnliche Solubilisations-Eigenschaften auf eine mögliche Rolle von G1 in der Interaktion von Zellmembran und Zytoskelett schliessen. Diese könnte im Kontraktions-Relaxations-Zyklus durch einen cGMP-abhängigen Mechanismus reguliert werden.

SUMMARY

Endothelium-dependent vasorelaxation is of great pharmacological importance in the treatment of coronary spasms and angina pectoris by nitrovasodilators. Recent work suggests the involvement of a cyclic GMP-dependent phosphorylation of the sarcolemmal Ca-pump, inducing stimulation of Ca^{2+}-extrusion as the mechanism of vasodilation [Popescu, L.M., Panoiu, C., Hinescu, M., and Nutu, O. (1985) Eur. J. Pharmacol. 107, 393-394, Furukawa, K., and Nakamura, H. (1987) J. Biochem. 101, 287-290]. This hypothesis has been tested on a smooth muscle sarcolemma preparation from pig thoracic aorta. The isolated membrane preparation showed ATP-dependent Ca-uptake as well as cGMP-dependent protein kinase (G-kinase) activity. The molecular masses of the major protein substrate of the G-kinase, G1, and that of the plasmalemmal Ca-pump were compared. Electrophoretic analysis of the phosphorylated intermediate of the sarcolemmal Ca-ATPase and the G1 phosphoprotein showed that these two proteins are not identical. The results were confirmed by using a ^{125}I-calmodulin overlay technique and an antibody against the human erythrocyte Ca-ATPase. Ca-uptake experiments with prephosphorylated membrane-vesicles were carried out to elucidate possible effects of cGMP-dependent phosphorylation of membrane proteins on the activity of the Ca-pump. The cGMP-dependent phosphorylation was found to be extremely sensitive to temperature leading to a very low steady state phosphorylation level at 37° C. The difficulty was overcome by using ATP[γS], which produced maximal and stable thiophosphorylation of G1 during the Ca-uptake experiments at 37° C. However, the cGMP-dependent thiophosphorylation failed to influence the Ca-uptake properties of sarcolemmal vesicles. The results have thus shown that the Ca-pump of smooth muscle plasma membrane is not a direct target of the cGMP-dependent protein kinase and is not regulated by the cGMP-dependent phosphorylation of membrane proteins. Earlier reports in support of the hypothesis suggesting a direct modulation of the Ca-pump by cGMP must therefore be reinterpreted.

G1 is a hitherto unidentified substrate of the G-kinase, although its presence in smooth muscle sarcolemma has been known for many years. Since it represents the major target of the G-kinase in smooth muscle sarcolemma its physico-

chemical and biochemical properties were investigated. Cupric phenanthroline-catalyzed oxidation of G1 in sarcolemmal membranes and in a soluble fraction revealed that G1 constitutes an oligomeric structure. In addition, the G1-oligomer could be oxidatively crosslinked to a sedimentable moiety. The latter was identified by 2-dimensional (nonreduced/reduced) SDS-PAGE as actin that is presumably attached to the sarcolemmal membranes *in vivo*. Furthermore, DNase I affinity chromatography demonstrated that a fraction of G1 directly interacted with actin, since it was specifically coeluted with actin from the column. G1 could be solubilized by non-ionic detergents only under very special conditions. Solubilization with Triton X-100 occurred only in the presence of high salt concentrations or millimolar concentrations of ATP. A similar behaviour has been recently observed for a complex of calmodulin and a protein of 110 kDa isolated from brush border microvilli [Verner and Bretscher (1985) J. Cell Biol. 100, 1455-1465]. This complex was shown to be involved in the lateral interaction of the microvillus F-actin bundles with the plasma membrane. G1 and the 110K-CaM complex differ in several respects. However, the actin-binding property and the similar solubility properties suggest a possible role of G1 in the plasmamembrane-cytoskeleton interaction in smooth muscle cells, which may be regulated by cGMP-dependent phosphorylation during the contraction-relaxation cycle.