

3 Ergebnisse

Zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Endozytose und der nachfolgenden intrazellulären Transportwege wurden Plasmide konstruiert (Abb. auf Seite 86), die für ET_A GFP bzw. ET_B GFP-Fusionsproteine kodieren. Hierbei liegt das GFP am intrazellulären C-Terminus vor (Abb. 3.1). Die Plasmide wur-

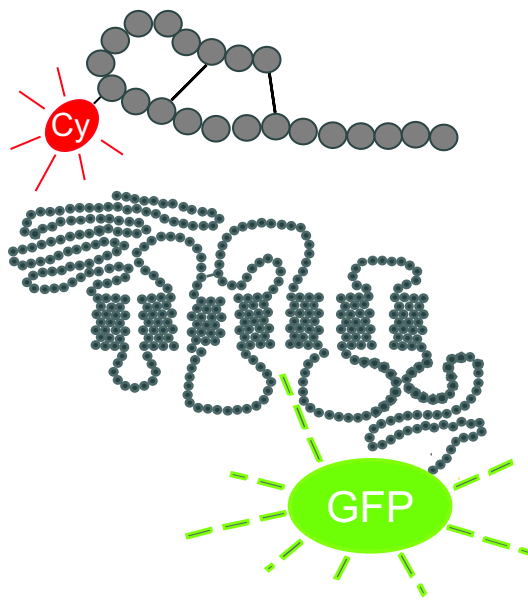


Abbildung 3.1: Fluorochrom-konjugiertes ET1, sowie die Endothelin-Rezeptor/GFP-Fusionsproteine: Die Fluorochrome Cy3, Cy3.5, Cy5 und Fluos, wurden mit der primären Aminogruppe des Lysins an Position 9 von ET1 konjugiert. Die Endothelin-Rezeptoren wurden mit Hilfe eines Expressionsvektors am C-terminalen Ende mit dem grünen Fluoreszenzprotein fusioniert.

den anschließend stabil in CHO-Zellen transfiziert und die resultierenden Zelllinien mittels Fluoreszenzmikroskopie und ^{125}I -ET1 Bindung charakterisiert. Für die weiteren Untersuchungen wurden jeweils zwei Klone ausgewählt, die unab-

hängig voneinander hergestellt wurden und die eine membranständige Lokalisation von ET_B -Rezeptoren aufwiesen. Desweiteren wurden auch Klone etabliert, welche die wildtypischen Rezeptoren exprimieren. Diese wurden zunächst in Bindungsanalysen charakterisiert und ebenfalls zwei voneinander unabhängige Klone ausgewählt. Um auch den Transport des Liganden nachweisen zu können, wurde synthetisch hergestelltes ET1 selektiv am Lysin 9 mit den Fluorochromen Cyanin3 (Cy3), Cyanin3.5 (Cy3.5) oder 5(6)-carboxyfluorescein-M-hydroxysuccinimide ester (Fluos) markiert (Oksche et al., 2000a).

3.1 Pharmakologische Eigenschaften der Endothelin-Rezeptoren, im Vergleich mit ihren GFP-Fusionsprotein

Eine Konjugation von ET1 mit Fluorochromen bzw. die Fusionierung der Endothelin-Rezeptoren mit dem 27 kDa großen Fluoreszenzprotein (GFP) können zu Veränderungen der Ligand-Rezeptor-Bindungseigenschaften führen. Die etablierten Klone wurden daher auf ihre pharmakologischen Eigenschaften hin untersucht.

Zunächst wurden zur Sättigungsbindungsanalyse mit ^{125}I -ET1 die Affinitäten von ET_A -Rezeptor und ET_B -Rezeptor bestimmt. Beide Rezeptorsubtypen weisen einen K_D im picomolaren Bereich auf ($K_D ET_A = 6 \pm 4$ pM; $K_D ET_B = 16 \pm 8$ pM). Zusätzlich wurden Membranpräparationen von CHO-Klonen, die den ET_B -Rezeptor oder ET_B GFP exprimieren, in Verdünnungsanalysen von ^{125}I -ET1 mittels unterschiedlicher Agonisten und Antagonisten charakterisiert. Durch Zugabe einer steigenden Konzentration verschiedener Liganden konnte aus der Verdrängung von 20 pM ^{125}I -ET1 die Inhibitionskonstante K_i berechnet werden (Tab. 3.1). Die wildtypischen Rezeptoren weisen gleiche K_i -Werte wie die GFP-Fusionsproteine auf. Als unmarkierte Liganden wurde ET1 und ET3, sowie der ET_B -Rezeptor selektive Antagonist BQ788, der ET_A -Rezeptor selektive Antagonist BQ123 und der nicht selektive Antagonist PD145065 eingesetzt. Ein Vergleich der K_i -Werte für ET_B -Rezeptor und ET_B GFP-Fusionsproteine zeigt, daß der GFP-Tag nur einen geringfügigen Einfluß auf Ligandbindungseigenschaften hat. In Verdrängungsanalysen wurden auch die Fluorochrom-konjugierten Liganden (Cy3-ET1,

	ET _B -Rezeptor	ET _B GFP
	<i>nM</i>	<i>nM</i>
ET1	0,059 ± 0,01	0,046 ± 0,01
ET3	0,077 ± 0,01	0,045 ± 0,01
BQ788	0,91 ± 0,2	0,89 ± 0,2
BQ123	>1000	>1000
PD145065	7,9 ± 0,6	7,5 ± 0,6
Cy3-ET1	0,272 ± 0,07	0,174 ± 0,04
FluoET1	0,091 ± 0,01	0,071 ± 0,01

Tabelle 3.1: K_i -Werte von unterschiedlichen Liganden des ET_B-Rezeptors und des ET_BGFP Fusionsproteins.

Fluo-ET1) auf ihre Bindungseigenschaften hin untersucht. Im Vergleich mit nativem ET1 zeigt Fluo-ET1 eine identische, Cy3-ET1 eine 5-fach geringere Affinität am ET_B-Rezeptor sowie am ET_BGFP-Fusionsprotein (Tab. 3.1).

3.2 Internalisierung und intrazellulärer Transport

3.2.1 Visualisierung der Endozytose von Endothelin-Rezeptoren

Die Untersuchung zur Internalisierung und dem intrazellulären Transport von Endothelin-Rezeptoren wurde an CHO-Zellen durchgeführt, die stabil ET_A- bzw. ET_B-GFP Fusionsproteine exprimieren. Die Klone wurden für 30 Min. bei 4°C mit 100 nM Cy3-ET1 inkubiert. Nicht gebundener Ligand wurde mit kaltem Puffer aus dem Überstand entfernt. Die Zellen wurden dann fixiert oder bis zu 4 Std. bei 37°C vor der Fixierung inkubiert. Zum Zeitpunkt 0 liegt eine Kolokalisation von Cy3-ET1 (mittlere Reihe; rot) und Endothelin-Rezeptor/GFP (linke Reihe; grün) an der Oberfläche der CHO-Zellen vor. In der Nähe des Zellkerns sowie diffus im Cytoplasma sind GFP-Signale, jedoch keine Signale für Cy3 zu erkennen (Abb. 3.3, 3.2). Diese GFP Fluoreszenzen könnten Transportintermediate sein, auf dem Weg zur Zelloberfläche oder fehlgefaltete Proteine, die noch nicht abgebaut wurden. Nach einer Behandlung mit Cycloheximid (CHX) über 2 Std. sind diese z.T. diffusen intrazellulären Signale nicht zu erkennen (Abb. 3.6). Die Über-

lagerung von Cy3- und GFP-Signalen resultiert bei einer Kolo­kalisierung in einer gelben Fluoreszenz (rechte Reihe). Beim ET_B GFP sind bereits nach 5 Min. Inku­bation bei 37°C zahlreiche Vesikel mit Ligand/Rezeptor-Komplexen intrazellulär zu erkennen (5 Min. Wert in Abb. 3.2 nicht gezeigt). Diese Fluoreszenzen des

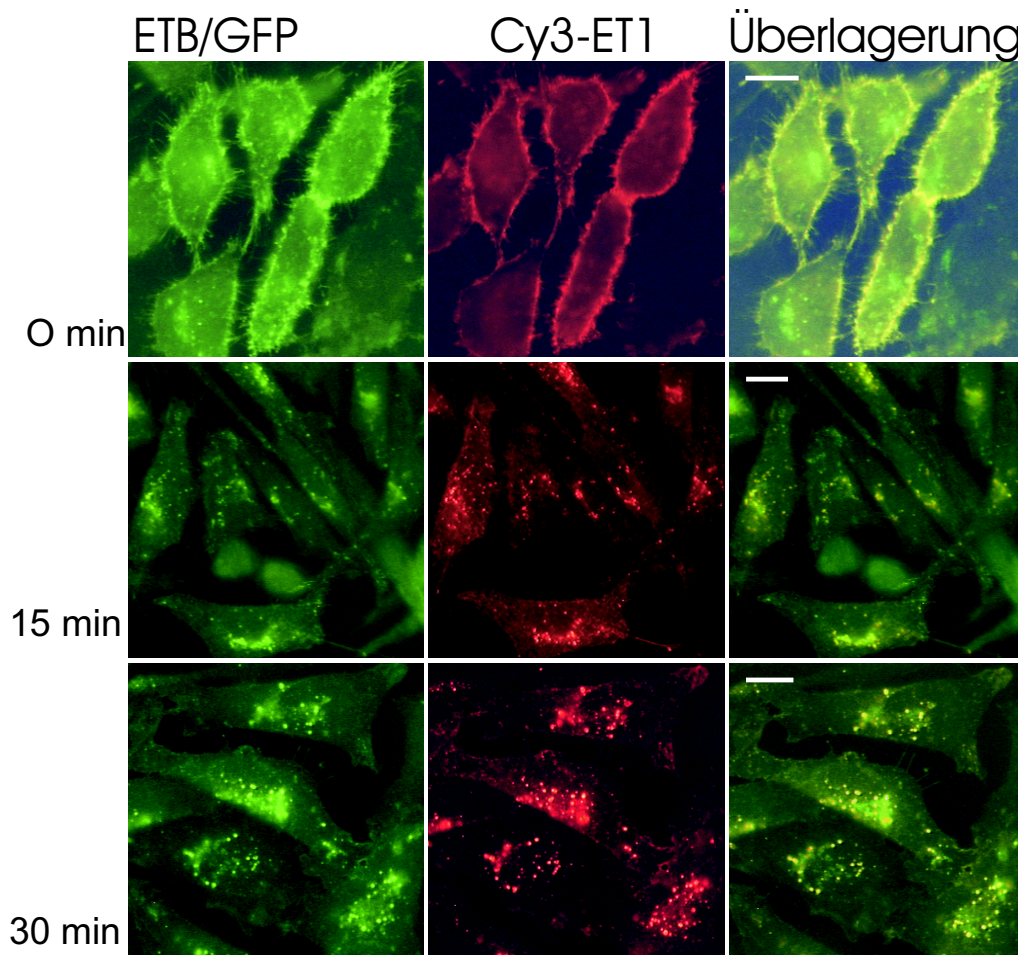


Abbildung 3.2: Cy3-ET1 vermittelte Internalisierung des Endothelin-Rezeptor/GFP-Fusionsproteins, in stabil transfizierten CHO-Zellen: Abhängig von der Inkubationszeit sind die Fluoreszenzsignale in unterschiedlichen Kompartimenten intrazellulär lokalisiert. Das GFP-Signal ist in der linken Bildreihe, das Cy3 Signal in der mittleren Bildreihe und die Überlagerung beider Signale in der rechten Bildreihe zu sehen. Die Balken entsprechen 10 μ m.

Cy3-ET1/ ET_B GFP -Komplexes befinden sich nach 15 Min. in größeren Strukturen, möglicherweise in „späten“-Endosomen. An der Plasmamembran sind hingegen kaum mehr Rezeptor oder Ligand zu erkennen. Nach 30 Min. ist eine deutliche perinukleäre Ansammlung (Kerndarstellung mit Hoe33258, nicht gezeigt) zu

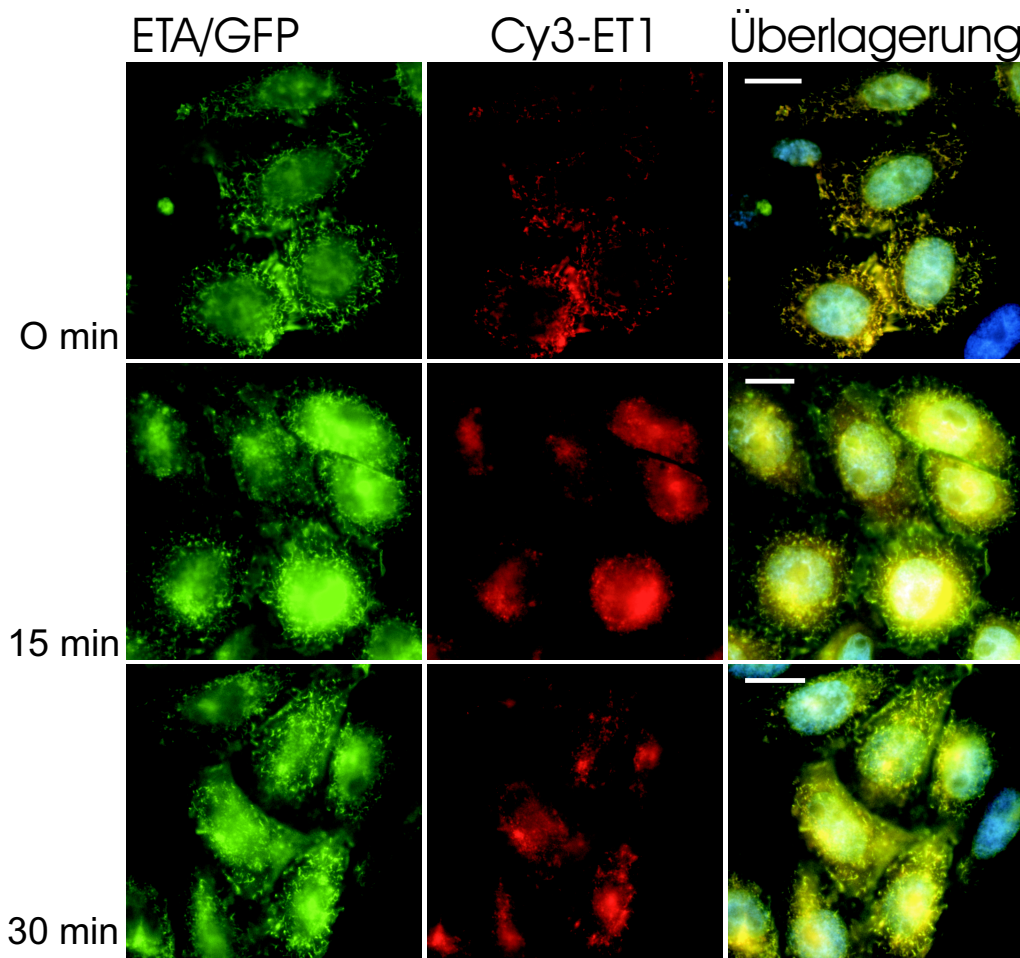


Abbildung 3.3: Cy3-ET1 vermittelte Internalisierung des ET_A GFP, in stabil transfizierten CHO-Zellen: Beschreibung entsprechend wie unter Abb. 3.2.

beobachten, welche sich nach 60 Min. in peripheren intrazellulären Strukturen der Zelle verteilt (Abb. 3.2). In diesen peripheren Kompartimenten überwiegt das Cy3 Signal (Abb. 3.6). Die deutlich schwächere GFP-Fluoreszenz kann durch Proteolyse des Fusionsproteins oder durch den sauren pH in den Kompartimenten bedingt sein (Llopis et al., 1998; Patterson et al., 1997). Im Gegensatz zum GFP ist Cyanin 3 im pH Bereich von 2,5 bis 7,5 stabil (Slice et al., 1998). Es wird deutlich, daß der ET_B-Rezeptor Agonist-abhängig internalisiert und schließlich herabreguliert wird („Downregulation“). Ein solcher Transport ist für GPCRs sehr ungewöhnlich und wurde bisher nur für den LH/hCG-Rezeptor (Ghinea et al., 1992) und die Superfamilie der PARs beschrieben (Hein et al., 1994; Trejo und Coughlin, 1999; Déry et al., 1999). Bemerkenswert ist zudem, daß der ET_B-Re-

zeptor auch nach 2 Std. im Komplex mit dem Liganden vorliegt (Abb. 3.6). Für den ET_A -Rezeptor ist die Internalisierung in der Literatur, bereits gut untersucht worden. Ein Großteil des Cy3-ET1/ ET_A -Rezeptor-Komplexes verbleibt auch 30 Min. nach der Inkubation assoziiert mit der Plasmamembran (Abb. 3.3). Zur Beobachtung schneller Recyclingprozesse über „frühe“-Endosomen, ist die Fluoreszenzmikroskopie jedoch ungeeignet. Auffällig ist eine diffuse Lokalisation des Komplexes nahe des Zellkerns. Möglicherweise handelt es sich hierbei um das perizentrioläre Recycling-Kompartiment. In diesen kann der ET_A -Rezeptor über längere Zeit verweilen, bevor er zurück an die Zelloberfläche gelangt. Die Analyse zur Internalisierung wurde auch an primär kultivierten Astrozyten durchgeführt, die in Kultur eine hohe Expression beider Rezeptorsubtypen aufweisen. Hierbei findet sich in Abhängigkeit der Kultur ein Verhältnis von 3:1 bis 1:1 zwischen ET_B - und ET_A -Rezeptor. Darüberhinaus wurden auch primär kultivierte Astrozyten untersucht, die eine natürlich vorkommende Nullmutation des ET_B -Rezeptors besitzen (Garipey et al., 1996). In diesen ET_B -Rezeptor-defizienten „spotting lethal“ (sl/sl)-Astrozyten konnte die Internalisierung des ET_A -Rezeptors analysiert werden (Abb. 3.4). Im Gegensatz zu CHO-Zellen wird der Ligand/Rezeptor-Komplex langsamer aufgenommen und ist erst nach ca. 30 Min. vollständig internalisiert. Im weiteren Verlauf zeigen die Präparate ein heterogenes Bild. Während man in einigen Zellen die ET_B -Rezeptor-typische perinukleäre Lokalisation findet, zeigt sich in anderen Zellen eine gleichmäßige vesikuläre Verteilung. Ebenso konnte in Astrozyten auch nach längeren Inkubationszeiten über 2- bis 4 Std. keine Relokalisation von Cy3.5-ET1 in periphere Bereiche der Zellen beobachtet werden. Wildtypische (wt)-Astrozyten zeigen nach 30 Min. Inkubation von Cy3.5-ET1 deutliche Signale an der Zelloberfläche. Die Darstellung der Internalisierung des ET_A -Rezeptors an (sl/sl)-Astrozyten ist äußerst schwierig. Durch Verlängerung der Vorinkubation bei 4°C von 30 Min. auf 1 Std. konnten die Signale verstärkt werden. Auch nach 2 Std. Inkubation mit Cy3.5-ET1 bei 37°C ist in (sl/sl)-Astrozyten keine Internalisierung des fluoreszierenden ET1 zu erkennen (Abb. 3.4).

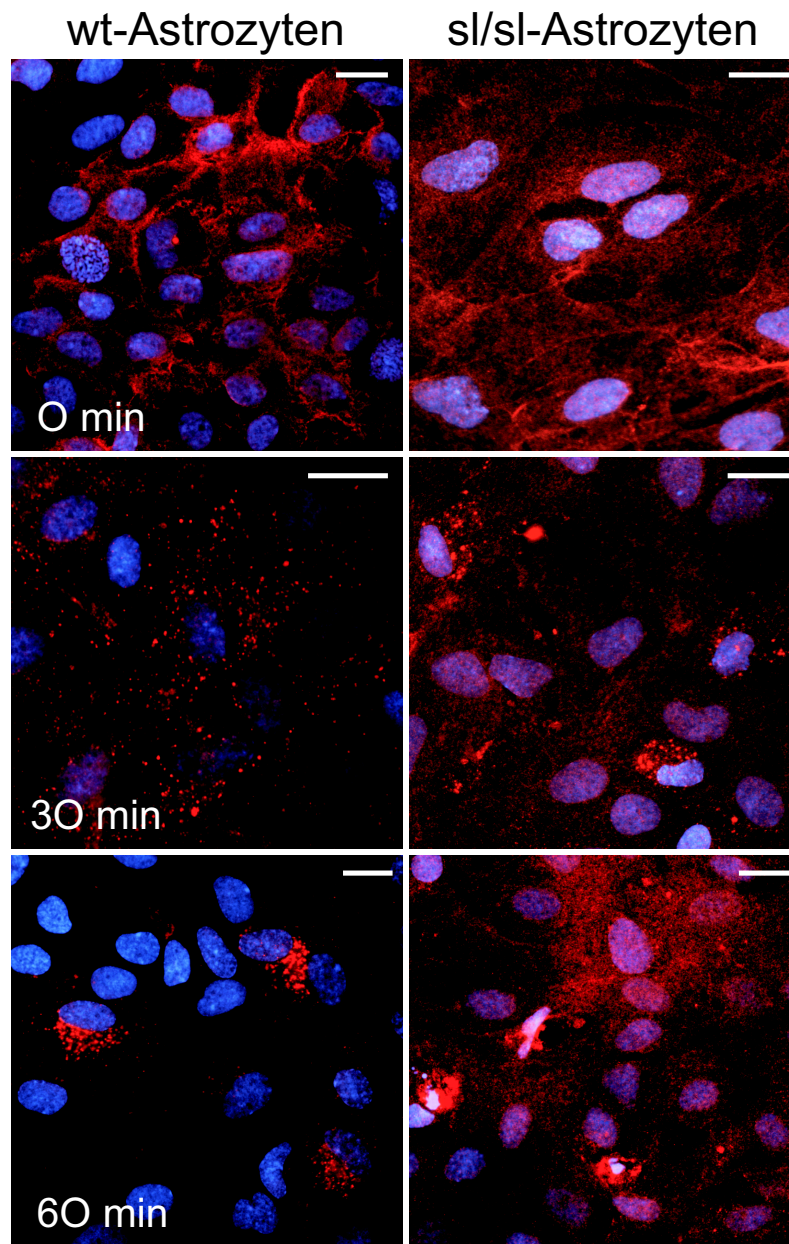


Abbildung 3.4: Cy3.5-ET1 vermittelte Internalisierung: Cy3.5-ET1 Bindung (rote Fluoreszenzsignale) nach 1 Std. bei 4°C (0 Min.) und Inkubation bei 37°C (30 Min. und 60 Min.) in wt-Astrozyten (links) und (sl/sl)-Astrozyten (rechts). Der Kern wurde mit Hoe33258 gefärbt (blau). Balken entsprechen 10 µm.

3.2.2 Wiedererscheinen des ET_B-Rezeptors an der Zelloberfläche nach erfolgter Internalisierung

Mittels eines Radioliganden-Assays sollte die am Fluoreszenzmikroskop beobachtete „Downregulation“ des ET_B-Rezeptors überprüft werden. Hierzu war aber

eine Modifikation der in der Literatur beschriebenen Internalisierungsprotokolle mit Radioliganden notwendig, da sich gebundenes ET1 am ET_B-Rezeptor nicht durch Säurebehandlung (bis zu einem pH von 3,0) entfernen läßt. Daher wurde ein Internalisierungsprotokoll etabliert in dem das Wiedererscheinen von ET_B-Rezeptoren an die Zelloberfläche nach ET1 Stimulation gemessen wurde. Stabil transfizierte CHO-Zellen wurden mit 100 nM ET1, 30 Min. bei 37°C inkubiert und überschüssiger Ligand mit DPBS/50 mM Essigsäure, pH 5,0 abgewaschen. Vor der Oberflächenbindung mit ¹²⁵I-ET1 wurde in serumhaltigem Medium für 0-240 Min. inkubiert. Kurz nach der Präinkubation (0 Min.) konnte keine weitere Bindung gemessen werden (Abb. 3.5).

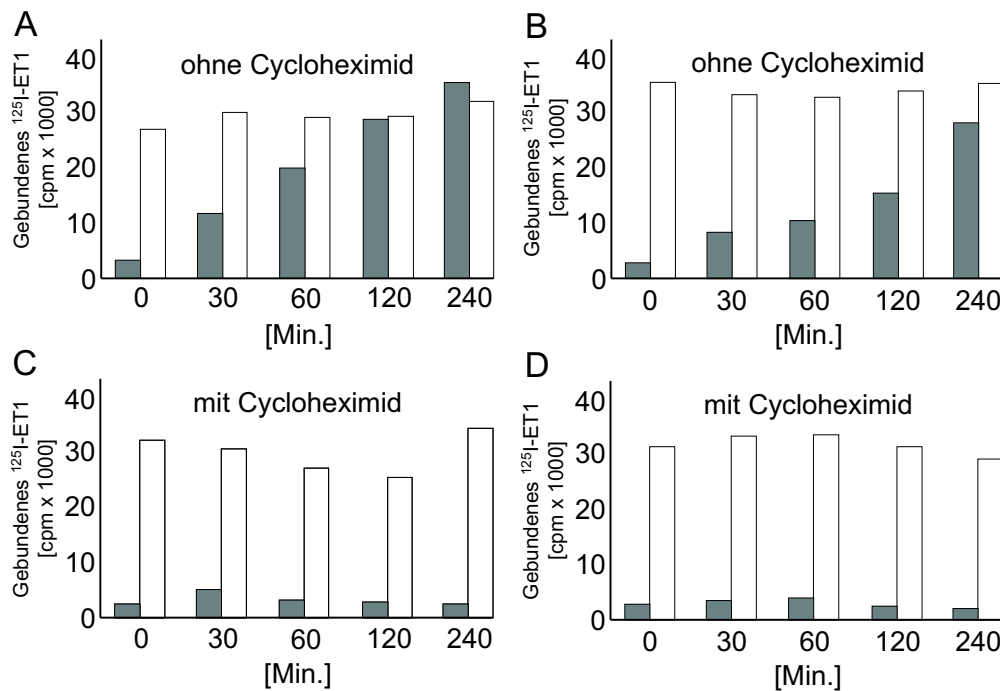


Abbildung 3.5: Relokalisation des ET_B-Rezeptors an der Zelloberfläche: Stabil transfizierte CHO-Zellen, mit ET_B-Rezeptor (A, C) bzw. ET_BGFP (B, D) wurden für 30 Min. bei 37°C mit 100 nM ET1 inkubiert. Die Bindung von ¹²⁵I-ET1 reduziert sich um ca. 90% (0 Min.). Nach 30 Min., 60 Min., 120 Min. und 240 Min. erreicht die ¹²⁵I-ET1 Bindung (schwarze Säulen) annähernd den Kontrollwert (weiße Säulen) (A, B). Wird mit Cycloheximid (CHX) die Protein Neusynthese inhibiert, bleibt der 0 Min. Wert bestehen (C, D).

Im weiteren Verlauf zeigte sich eine kontinuierliche Zunahme der Bindung, die nach 4 Std. etwa den Ausgangswert erreichte. Somit zeigt das GFP auch keinen

Einfluß auf den Rezeptortransport zur Zelloberfläche. Dieses Wiedererscheinen von ET_B -Rezeptor und ET_B GFP-Fusionsprotein kann sowohl durch ein verzögertes Recycling, als auch durch Rezeptor Neusynthese bedingt sein. Um den Anteil von neu synthetisierten Rezeptoren an der Zelloberfläche bestimmen zu können, werden die Zellen während des gesamten Versuchs mit CHX, einem Inhibitor der Proteinsynthese, behandelt. In diesen Analysen war auch nach 4 Std. keine ^{125}I -ET1 Bindung an der Zelloberfläche zu messen. Diese Kinetik war für CHO-Zellen mit einer stabilen ET_B -Rezeptor sowie einer ET_B GFP Expression identisch (Abb. 3.5).

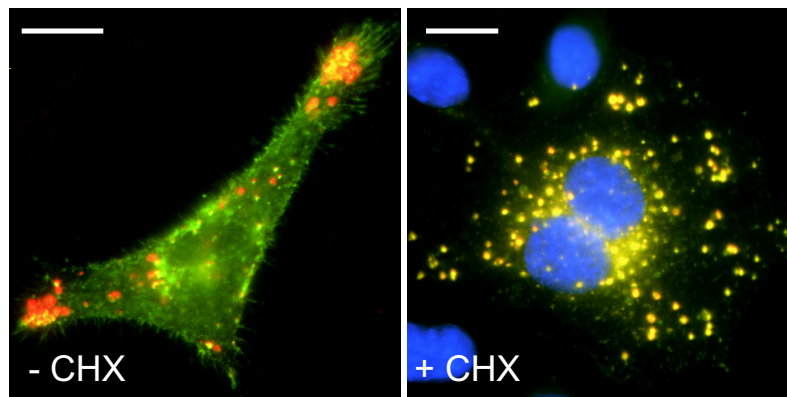


Abbildung 3.6: Wiedererscheinen des ET_B -Rezeptors an der Zelloberfläche, nach Vorbehandlung mit Cy3-ET1: Mit ET_B GFP stabil transfizierte CHO-Zellen wurden mit Cy3-ET1, 2 Std. bei 37°C induziert. In der Abbildungen erscheinen die Überlagerungen beider Fluoreszenzen gelb. Neben den typischen peripheren Ansammlungen sind deutliche GFP-Signale von neu synthetisiertem ET_B GFP zu erkennen. Bei Zugabe des Proteinsynthese Inhibitors Cycloheximid, (+CHX, 20 µg/ml) sind auch nach 2 Std. Inkubation keine GFP-Fluoreszenzen an der Zelloberfläche zu sehen.

3.2.3 Kolokalisation mit Fluorochrom-markiertem Low-Density-Lipoprotein (LDL)

Der intrazelluläre Transport des Ligand/Endothelin-Rezeptor Komplexes wurde mit Hilfe von Fluorochrom-markiertem Low-Density-Lipoprotein (DiI-LDL) (Ghosh und Maxfield, 1995), näher untersucht. DiI-LDL bindet an den LDL-Rezeptor und wird über den Clathrin-vermittelten Weg internalisiert (Chen et al., 1990). Während der LDL-Rezeptor zurück an die Zelloberfläche gelangt (Recycling), wird LDL über „späte“-Endosomen in Lysosomen transportiert und schließ-

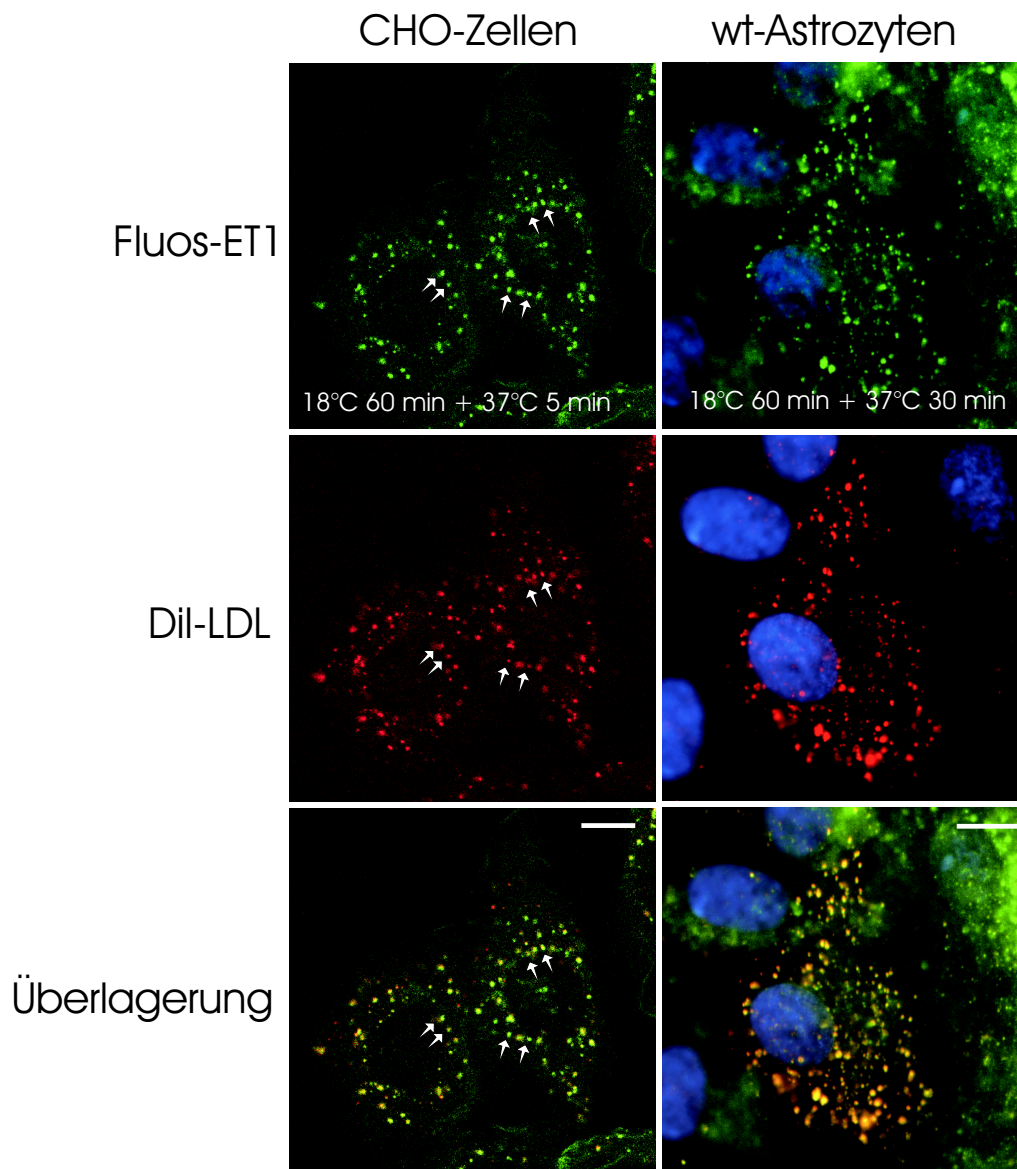


Abbildung 3.7: Die Internalisierung von Fluo-ET1 und DiI-LDL erfolgt über die gleichen intrazellulären Kompartimente: CHO-Zellen, die stabil den ET_B -Rezeptor exprimieren, sowie wt-Astrozyten wurden mit Fluo-ET1 und DiI-LDL zunächst für 60 Min. bei 18°C inkubiert, um eine ausreichende Bindung zu ermöglichen und die Temperatur anschließend auf 37°C erhöht. Fluo-ET1 ist mit dem Markermolekül DiI-LDL gemeinsam in „späten“-Endosomen bzw. Lysosomen lokalisiert. Zur besseren Darstellung wurden die Zellkerne der wt-Astrozyten mit Hoe33258 gefärbt. Balken entsprechen $10\ \mu\text{m}$.

lich abgebaut (Mayor et al., 1993; Ghosh und Maxfield, 1995; Maxfield und Yamashiro, 1991). CHO-Zellen, die stabil den ET_B -Rezeptor exprimieren, wurden

mit Fluo-ET1 und DiI-LDL für 1 Std. bei 18°C inkubiert. Bei dieser Temperatur ist eine quantitative Bindung beider Liganden möglich (Dunn et al., 1980). Durch Inkubation der Zellen bei 37°C, werden LDL und ET1 in die Zellen aufgenommen. Sowohl nach 5 Min. Inkubation bei 37°C, als auch bei 30 Min. Inkubation, sind DiI-LDL und Fluo-ET1 in großen intrazellulären Kompartimenten kolokalisiert (Abb. 3.7). Die Internalisierung von LDL zusammen mit ET1 wurde auch an wildtypischen (wt)-Astrozyten untersucht, die ET_A - und ET_B -Rezeptoren exprimieren (Abb. 3.7).

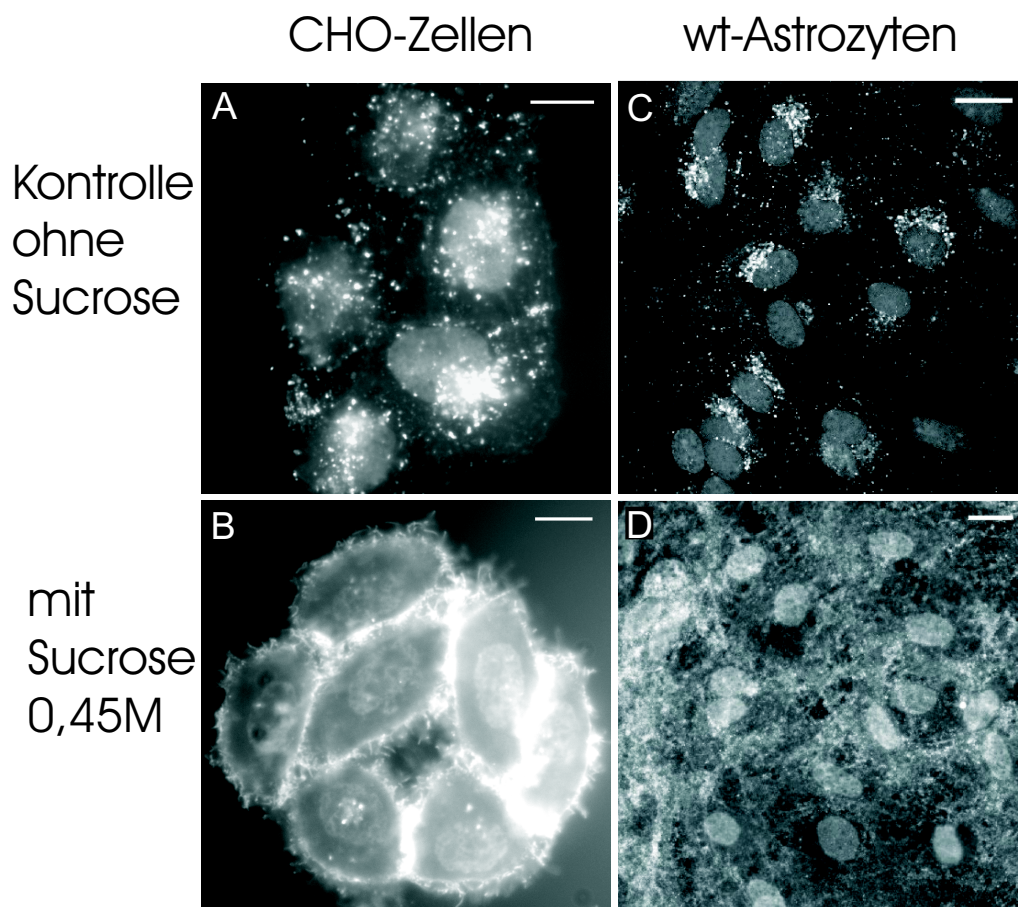


Abbildung 3.8: Der ET_B -Rezeptor wird über einen Chlatriin-abhängigen Weg internalisiert: CHO-Zellen, die stabil den ET_B -Rezeptor exprimieren, sowie wt-Astrozyten wurden mit Fluo-ET1 (30 Min., 4°C) inkubiert. Anschließend erfolgte ein Inkubation für 60 Min. bei 37°C in normalem (A, C) bzw. Sucrosehaltigem (0,45 M) Medium (B, D). Zur besseren Darstellung wurden die Zellkerne mit Hoe33258 gefärbt. Balken entsprechen 10 μ m.

3.2.4 Sucrose inhibiert die Clathrin-abhängige Endozytose des ET_B -Rezeptors

Wie in der Einleitung beschrieben, wird zwischen der Clathrin- und Caveolae-vermittelten Internalisierung unterschieden. Die Clathrin-vermittelte Endozytose kann in hyperosmolarem Medium durch Zusatz von Sucrose inhibiert werden (Daukas und Zigmond, 1985; Heuser und Anderson, 1989). CHO-Zellen, die in 0,45 M Sucrose (750 mosmol Endkonzentration) mit Cy3-ET1 behandelt werden, zeigen keine Internalisierung (Abb. 3.8). Zur Kontrolle der Vitalität der Zellen wurde das hypertone Medium ausgewaschen und durch isotones Medium ersetzt. Es zeigte sich eine „normale“ Internalisierung (nicht gezeigt). Wie auch für CHO-Zellen ließ sich die Endozytose von ET1 in wt-Astrozyten mit Sucrose vollständig inhibieren.

3.3 Strukturelle Motive für die Oberflächenexpression des ET_B -Rezeptors in polarisierten MDCK-Zellen

ET_B -Rezeptoren werden in verschiedenen polarisierten Zelltypen, wie z.B. den Nierenepithelzellen und Gefäßendothelzellen exprimiert. Ob der ET_B -Rezeptor eine polare Expression aufweist ist bislang unklar. Es sollte daher an MDCK-Zellen geprüft werden in welchen Membransubdomänen der ET_B -Rezeptor vorliegt. Da der ET_B -Rezeptor im C-Terminus ein durch alle Spezies konserviertes tyrosinhaltiges Motiv aufweist, das als basolaterales Transportmotiv wirken könnte, wurden Aminosäuren dieses Motivs durch gerichtete Mutagenese gegen Alanine ausgetauscht (GYDNF gegen AAXXA = ET_B GYF). Zudem wurde eine Mutante des ET_B -Rezeptors konstruiert, der die terminalen 15 Aminosäuren fehlen ($ET_B\Delta 426$). Weiterhin wurde eine Chimäre hergestellt, in welcher der C-Terminus des ET_B -Rezeptors durch den C-Terminus des ET_A -Rezeptors ausgetauscht wurde. Hierbei wird die Sensitivität der Zellen, gegenüber einer apikalen bzw. basolateralen Stimulation mit ET1, durch die Expression des Rezeptors in einen der beiden Kompartimente oder Plasmamembransubdomänen bestimmt. Es wurden jeweils zwei stabile MDCK-Klone etabliert, die den ET_B WT, den ET_B GYF, den $ET_B\Delta 426$ und den ET_B Act exprimieren. Zur Charakterisierung

Plasmide	Aminosäuresequenzen des C-Terminus
ET _B WT	WCQSFEEKQSLEEKKQSCLKFKANDHGYDNFRSSNKYSSS
ET _B GYF	WCQSFEEKQSLEEKKQSCLKFKANDHAADNARSSNKYSSS
ET _B Δ426	WCQSFEEKQSLEEKKQSCLKFKAND
ET _B Act	CCYQSKSLMTSVP MNGTSIQWKNHDQNNHNTDRSSHKDSMN

Tabelle 3.3: C-terminale Aminosäuresequenzen des wildtypischen ET_B-Rezeptors (ET_B WT), einer Alaninmutante (ET_B GYF), einer Deletionsmutante (ET_B Δ426) und einer Chimäre (ET_B Act), in welcher der C-Terminus des ET_B-Rezeptors durch den C-Terminus des ET_A-Rezeptors ausgetauscht wurde.

der Bindungseigenschaften des ET_B-Rezeptor -GFP-Fusionsproteins wurden Displacementanalysen durchgeführt (hier nicht gezeigt). Vergleichbar mit den Ergebnissen bei CHO-Zellen zeigt das GFP-Protein keinen Einfluß auf die Bindung von ET1 (Oksche et al., 2000b). In Vorversuchen wurde das Wachstum auf verschiedenen extrazellulären Matrixproteinen (Laminin, Fibronectin, Kollagen) mit unterschiedlicher Zelleinsaat auf semipermeablen Filtereinsätzen optimiert. Wurden 2.5×10^5 Zellen/cm² ausgesät, bildete sich innerhalb von 3-4 Tagen auf Kollagen beschichteten Filtern, ein homogener dichter „Zellrasen“ aus. Auf diesen permeablen Membraneinsätzen ist die Ausbildung polarer Zellen möglich. Desweiteren können mit den Filtern Bindungsmessungen sowohl an der apikalen als auch basolateralen Seite durchgeführt werden (Abb. 3.9).

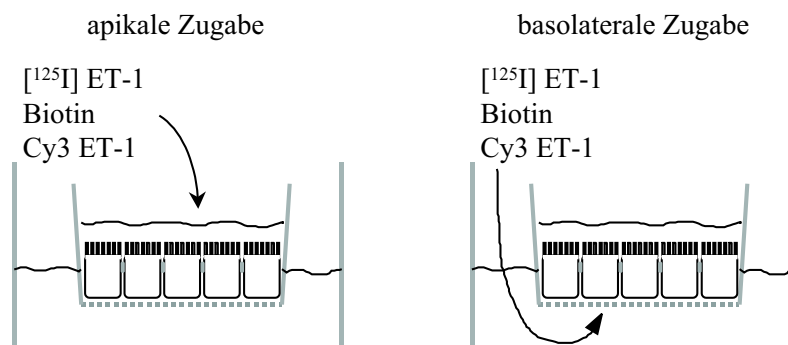


Abbildung 3.9: Permeable Transwellfilter zur Kultivierung der MDCK-Klone. Die Zellen bilden auf diesen Kollagenbeschichteten Filtereinsätzen innerhalb weniger Tage einen geschlossenen „Zellrasen“ und sind mit Agenzien von beiden Seiten d.h. apikal und basolateral zu inkubieren.

3.3.1 Verteilung der ET_BGFP Konstrukte in MDCK-Zellen

Die verschiedenen MDCK ET_BGFP Klone wurden über 3 Tage auf Kollagen beschichteten Transwellfiltern kultiviert. Zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurden die Membranen gewaschen, ausgeschnitten, fixiert und in Immount (Shandon, Pittsburg, PA) Medium eingebettet. Für die Untersuchungen wurden jeweils zwei Klone von jeder Mutante ausgewählt, welche sich durch ein geschlossenes homogenes GFP-Fluoreszenzmuster auszeichneten. Im unstimulierten Zustand läßt sich im Querschnitt (z-scan) des dichten zylindrischen „Zellrasens“ eine GFP-Lokalisation zu beiden Membranseiten erkennen (Abb. 3.10). Das verstärkte laterale Signal resultiert aus der GFP-Fluoreszenz zweier sich kontaktierender Zellen, was eine genaue Beschreibung der Rezeptorverteilung erschwert. Zylindrisch ausgewachsene Epithelzellen sind am Übergang der lateralen Plasmamembran zur apikalen Oberfläche über „tight junctions“ fest miteinander verbunden und lassen kaum einen parazellulären Stoffaustausch zu. Darüberhinaus verhindern diese auch den Austausch von Membranproteinen zwischen der apikalen und basolateralen Membran. Alle Membranproteine haben, in Bezug auf die polarisierte Proteinexpression, ihren Gleichgewichtszustand erreicht. Ebenso sind auch die GFP-Fusionsproteine vollständig in der Plasmamembran lokalisiert.

3.3.2 Radioaktiver Ligand-Bindungs-Assay an MDCK-Zellen

Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen zeigen, daß in MDCK-Zellen ET_B-Rezeptoren sowohl an apikalen als auch basolateralen Membranabschnitten exprimiert werden. Zur genauen Quantifizierung dieser Rezeptorexpression wurde ein Radioaktiver Ligand-Bindungs-Assay durchgeführt. Vollständig dichte Filterkulturen mit den verschiedenen MDCK-Klonen, wurden bei 4°C (Hemmung der Endozytose), von der apikalen bzw. basalen Seite mit ¹²⁵I-ET1 inkubiert. Zur Überprüfung der Dichtigkeit des Zellverbands, wurde nach 30 Min. ein Aliquot aus dem apikalen und basalen Medium entnommen. Es wurden nur solche Versuche berücksichtigt, in denen weniger als 3% des eingesetzten ¹²⁵I-ET1 nachweisbar waren. Nach Abschluß der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, die Filter ausgeschnitten und die Radioaktivität bestimmt. Die unspezifische

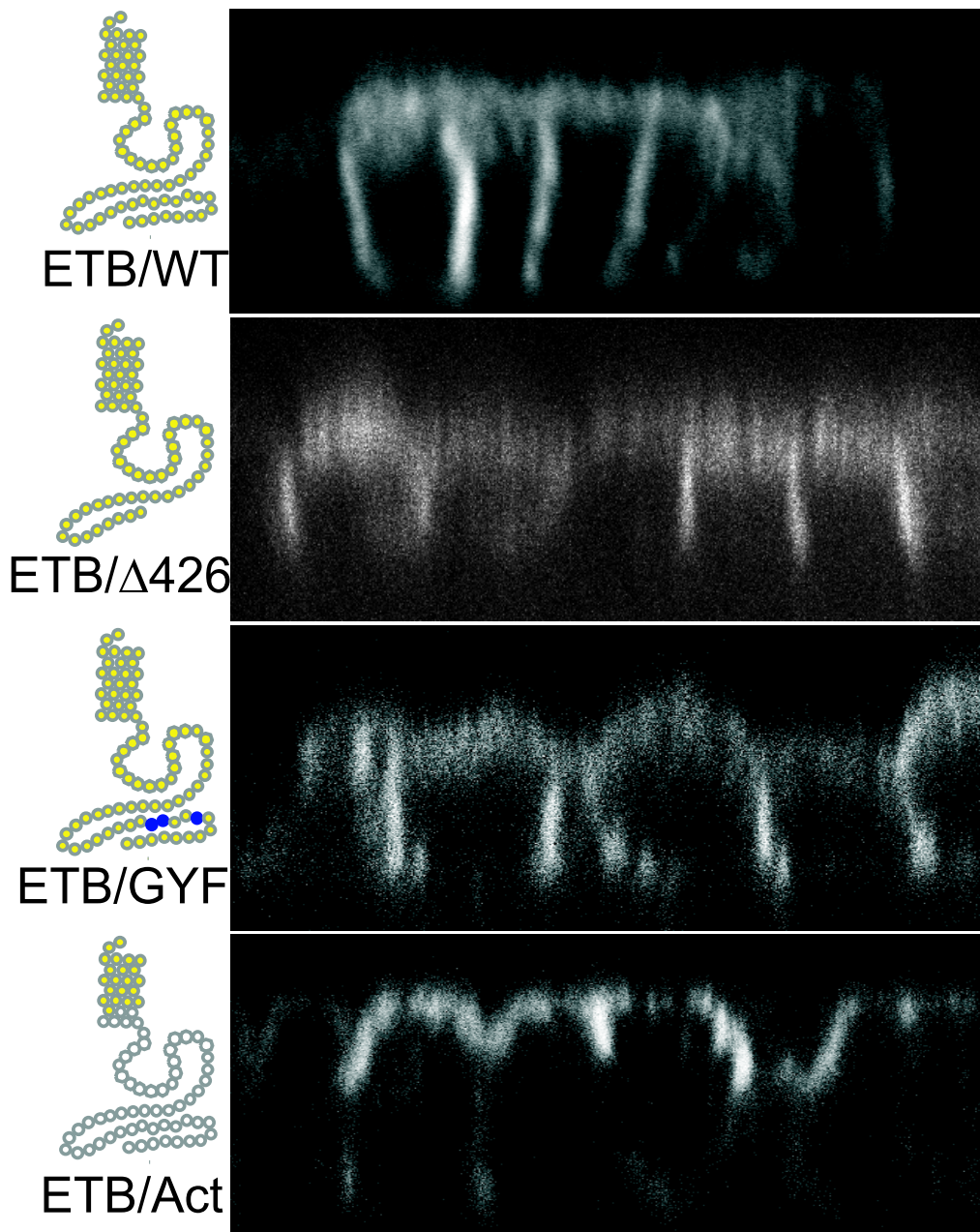


Abbildung 3.10: Verteilung heterolog exprimierter ET_B -Rezeptor -GFP-Fusionsproteine in polaren MDCK-Zellen: MDCK-Zellen, die stabil unterschiedliche ET_B GFP-Konstrukte exprimieren, wurden auf semipermeablen Membranen bis zum Erreichen eines Gleichgewichtszustandes für 4 Tage kultiviert. Die Zellen wurden fixiert und mit Hilfe der Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert. Der Querschnitt (z-scan) durch den Zellmonolayer zeigt, dass ET_B GFP-Fusionsproteine an der apikalen bzw. basolateralen Plasmamembranseite vorliegen.

sche Bindung wurde an Filterkulturen gemessen, die einen Überschuss an kaltem ET1 enthalten. Die spezifische Bindung wurde an der Gesamtbindung nach Abzug der unspezifischen Bindung ermittelt. Der Anteil der apikalen und basolateralen Bindung wurde in Prozent der Gesamtbindung dargestellt (Abb. 3.11).

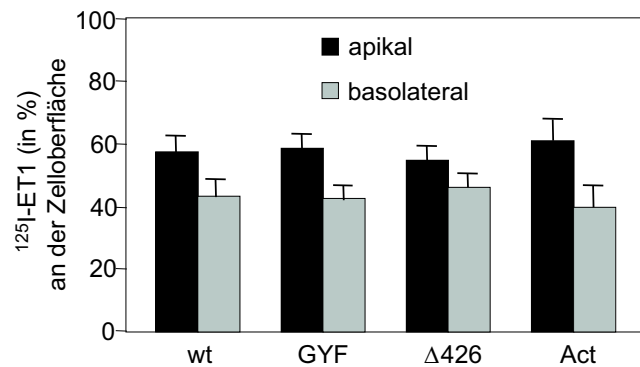


Abbildung 3.11: ^{125}I -ET1 Radioaktiver-Ligand-Bindungs-Assay: Auf Filtern kultivierte MDCK-Klone wurden mit 100 pM ^{125}I -ET1 für 60 Min. bei 4°C von der apikalen oder basalen Seite inkubiert. Die Filter wurden gewaschen, ausgeschnitten und gemessen. Die prozentuale Verteilung ihre spezifische Radioaktivität wurde berechnet.

Trotz C-terminaler Veränderungen zeigen alle Rezeptorkonstrukte ein nahezu gleiches Verhältnis mit einem apikalen Anteil von 60% gegenüber 40% auf der basolateralen Seiten.

3.3.3 Biotinylierungs-Assay zur Messung der apikalen und basolateralen Membranoberflächen

Einstülpungen der basalen- (basales Labyrinth), oder Ausbuchtungen der apikalen Seite (Bürstensaum), werden häufig bei Epithelzellen beobachtet und führen zur Vergrößerung der Membranoberfläche. So weisen Epithelzellen ein Verhältnis der apikalen zur basolateralen Membran von 1 : 8 auf. Für Nieren-Epithelzellen wurde ein Verhältnis von 1 : 1 bzw. 1 : 2 beschrieben. Um mögliche Unterschiede zwischen apikaler und basolateraler Membranoberfläche erfassen zu können, wurden apikale und basolaterale Membranen voneinander unabhängig biotinyliert. Die Biotinylierten apikalen und basolateralen Membranproteine wurden im Dot-Blot auf Nitrocellulose (NC) aufgetragen und mit ^{125}I -Streptavidin markiert. Auch in diesen Experimenten wurde jeder Filteransatz auf die Dichtigkeit des Zellverbands durch die Bestimmung von NHS-Biotin im basalen bzw. apikalen Medium

überprüft. Die Untersuchungen zeigten, daß alle MDCK-Klone ein prozentuales Oberflächenverhältnis zwischen apikal zu basolateral von nahezu 60% zu 40% aufweisen (Abb. 3.12).

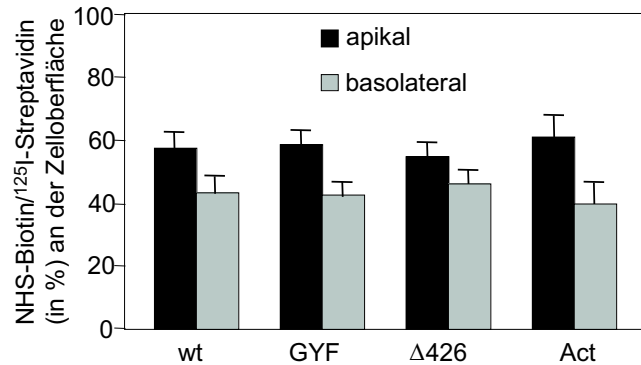


Abbildung 3.12: Biotinylierungs-Assay zur Messung apikaler zu basolateraler Oberflächenverhältnisse in polaren MDCK-Zellen: Die Oberflächenproteine der auf Filtern kultivierten MDCK-Klone wurden mit NHS-Biotin kovalent gebunden. Die Zellen wurden lysiert und auf Nitrocellulose geblottet mit ^{125}I -Streptavidin autoradiographisch quantifiziert. Das Ergebnis zeigt den Mittelwert aus drei Unabhängigen Experimenten, mit jeweiliger Doppelmessung.

Somit ergibt sich abschließend das die hier untersuchten Signalmotive keinen Einfluß auf die Polarität der ET_B -Rezeptoren zeigen.

3.3.4 Signaltransduktion des ET_B -Rezeptors an polaren MDCK-Zellen

Endotheline führen über die Stimulation der Endothelin-Rezeptoren zur Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden. Insbesondere für polarisierte Zellen stellt sich die Frage, ob Endothelin-Rezeptoren nur in einer Membransubdomäne (apikal oder basolateral), oder in beiden exprimiert wird. Dadurch wird auch bestimmt, ob eine Zelle durch ET_1 von beiden Seiten stimuliert werden kann oder nur gegenüber ET_1 von einem Kompartiment sensitiv ist. Desweiteren stellt sich auch die Frage, ob apikale bzw. basolaterale Rezeptoren auf Signalkaskaden einwirken, deren Signalmoleküle in bestimmten Mikrodomänen (Lipid-rafts, Fokal Adhesions) lokalisiert sind. Zu dieser Fragestellung gibt es für GPCRs nur wenig Untersuchungen. Muskarinerge-Rezeptoren von MDCK-Zellen führen bei Stimulation apikaler, nicht aber bei Stimulation basolateraler Rezeptoren zu einer

Hemmung der Adenylatzyklase (AC). Diese Unterschiede beruhen auf einer AC-Isoform der basolateralen Plasmamembran die nicht durch $G\alpha_i$ gehemmt werden kann. (Nadler et al., 1999).

Um zu überprüfen, ob ET1 vermittelte Signalkaskaden über apikale und basolaterale Rezeptoren aktiviert werden, wurden MDCK-Zellen, die stabil den ET_B -Rezeptor exprimieren, auf semipermeablen Filtern kultiviert und mit 3H -Inositol im Brutschrank inkubiert. Überschüssiges 3H -Inositol wurde entfernt und die Zellen apikal und basolateral mit 10 nM ET1 über 30 Min. bei $37^\circ C$ in Gegenwart von LiCl inkubiert. LiCl verhindert den Abbau von Inositolphosphaten, die durch die Aktivität der Rezeptor-stimulierten PLC freigesetzt werden. Somit kommt es zur Anreicherung von 3H -IP₃ welches aus Zellextrakten über Ionenaustauschchromatographie isoliert und mittels β -Counter gemessen werden kann. Das Ergebnis zeigt, das Inositolphosphate sowohl nach apikaler als auch basaler Stimulation gebildet werden. Bemerkenswert ist, daß die Bildung von Inositolphosphat bei apikaler Stimulation etwa 2-3 fach stärker ist als nach basaler Stimulation (Abb. 3.13).

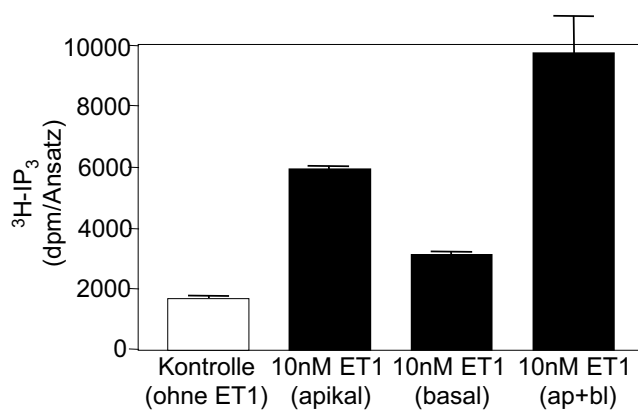


Abbildung 3.13: 3H -IP₃ Akkumulation nach apikaler und basolateraler ET1 Stimulation: Polarisierte MDCK ET_B GFP Klone, über 12 Std. kultiviert in 3H -Inositol, wurden mit 10 nM ET1 30 Min. bei $37^\circ C$ apikal bzw. basolateral inkubiert und die Anreicherung von 3H -IP₃ gemessen.

Zudem wurde auch an polarisierten MDCK ET_B GFP Klonen geprüft, inwieweit eine Hemmung der Forskolin-stimulierten Adenylatzyklase (AC) über ET_B -Rezeptoren der apikalen oder basolateralen Plasmamembranseite möglich ist.

Auf Filtern kultivierte MDCK ET_B GFP Klone wurden von beiden Seiten mit 10 nM ET1 bzw. 10 μM Forskolin (Fsk) stimuliert (Abb. 3.14).

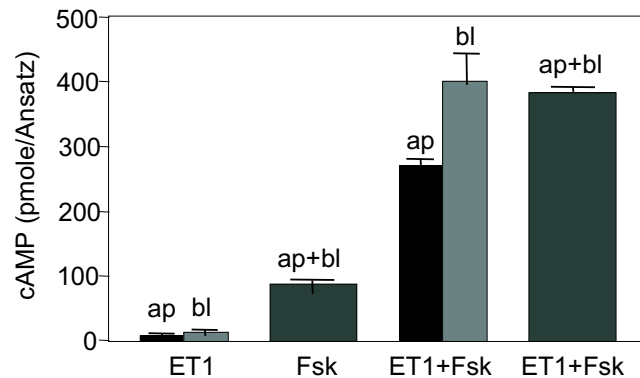


Abbildung 3.14: Adenylatzyklase Aktivität an MDCK ET_B GFP Klonen, nach apikaler oder basaler Inkubation von ET1 bzw. Forskolin. Auf Filtereinsätzen, konfluent gewachsene MDCK ET_B GFP Klone, wurden 30 Min. mit Forskolin (Fsk) bzw. ET1 von der apikalen oder basalen Seite stimuliert. Die AC-Aktivität wurde mittels cAMP-RIA an den Zellextrakten gemessen.

Die Zellen wurden aufgeschlossen und die Zellextrakte nach der Neutralisierung im cAMP-RIA weiter untersucht. Forskolin stimuliert die AC etwa um den Faktor 20-30. Durch die Zugabe von ET1 in apikales oder basales Medium, kommt es zu einer weiteren Aktivierung der AC. Bei apikaler Stimulation um etwa den Faktor 3, bei basaler Stimulation um den Faktor 4.

Erwartet wurde eine Inhibition der Forskolin-stimulierten AC-Aktivität durch $G_{\alpha i}$ -Kopplung des ET_B -Rezeptors, doch zeigt sich bei gleichzeitiger Forskolin/ET1 Inkubation ein scheinbar synergistischer Effekt. Dies steht auch im Widerspruch zu bisherigen Befunden, nach welchen der ET_B -Rezeptor über cAMP abhängige PKA-Aktivität spezifisch phosphoryliert und damit desensitisiert wird (Takemoto et al., 1995; Wong et al., 2000). Da ET1 alleine keine AC-Aktivität bewirkt, muß angenommen werden, das unter Einfluß von Forskolin eine AC-Stimulierende $G_{\alpha s}$ -Protein Kopplung erfolgt. Weiterhin könnten verschiedene AC-Subtypen (Duzic und Lanier, 1992), für die Polaritätsunterschiede (verstärkt basolateraler Effekt) verantwortlich sein.