

4 Diskussion

Für den ET_A -Rezeptor der im Gefäßsystem v.a. in vaskulären Muskelzellen exprimiert wird, konnte ein Recycling als auch eine Internalisierung über Caveolae beschrieben werden. Hierbei kommt der Internalisierung über Caveolae eine funktionelle Bedeutung zu, da etwa 30% der ET_A -Rezeptoren auch nach 2 Std. noch den gebundenen Liganden tragen und somit für eine langanhaltende Signaltransduktion verantwortlich sein könnte.

Der ET_B -Rezeptor wird im Gefäßsystem v.a. in Endothelzellen exprimiert und hat sowohl für die Regulation des Blutdrucks, durch die Freisetzung von NO und Prostacyclin (PGI_2), als auch die Entfernung von ET1 aus der Blutzirkulation eine besondere Bedeutung. Es war bisher aber unklar, ob der ET_B -Rezeptor eine polare Expression aufweist und über welche Wege die Internalisierung des Rezeptors erfolgt („Clearance“-funktion).

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde dargestellt, über welche Wege der ET_B -Rezeptor in stabil exprimierten CHO-Zellen und in wildtypischen Astrozyten internalisiert wird und über welche intrazellulären Kompartimente der weitere Transport erfolgt. Diese Analysen erfolgten v.a. mit Fusionsproteinen von ET_B -Rezeptoren und GFP sowie fluoreszierenden Liganden zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der Rezeptor-internalisierung und des intrazellulären Transports. Klassische Radioligandbindungsuntersuchungen waren nicht möglich, da der ET_B -Rezeptor den Liganden quasi irreversibel bindet. Es wurden Expressionsvektoren hergestellt, welche für Fusionsproteine von Endothelin-Rezeptoren mit GFP am C-Terminus kodieren (Abb. auf Seite 86). Ligandbindungsexperimente und Untersuchungen zur Inositolphosphat-Bildung haben gezeigt, daß das 27 kDa große GFP am C-Terminus der Rezeptoren keinen signifikanten Einfluß auf deren Funktionalität hat. Dies steht im Einklang mit zahlreichen weiteren

Untersuchungen an Fusionsproteinen von GPCRs mit GFP. (Barak et al., 1997; Tarasova et al., 1997; Milligan, 1999; Kallal und Benovic, 2000).

Im zweiten Teil dieser Arbeit ging es um die physiologisch sehr bedeutende Frage, ob der ET_B-Rezeptor in polarisierten Endothel- bzw. Epithelzellen bevorzugt apikal oder basal (luminal oder abluminal) exprimiert wird und ob strukturelle Merkmale in seinem cytoplasmatisch lokalisierten C-Terminus vorliegen, die für den gerichteten Transport zur Zelloberfläche verantwortlich sind. Hierfür wurden zusätzlich zum nativen ET_BGFP verschiedene C-Terminale ET_BGFP Mutanten kloniert und in MDCK-Zellen stabil transfiziert. Ausgesät auf semipermeablen Membranen, bildet sich innerhalb weniger Tage ein geschlossener homogener Verband polarisierter Zellen, welcher von beiden Seiten mit Medium in Kontakt steht (Abb. 3.9). Mit Hilfe der Laser-Scanning-Mikroskopie konnte die Verteilung der GFP-gebundenen ET_B-Rezeptor Mutanten im Querschnitt (z-scan) visualisiert werden. Weiterhin wurden die Rezeptoren mit radioaktiv markiertem ¹²⁵I-ET1 quantifiziert und die Membranoberflächen durch Biotinilierung gemessen.

4.1 Subtyp spezifische Desensitisierung der Endothelin-Rezeptoren

Entscheidend für die Endozytose von GPCRs scheint die vorausgehende Desensitisierung durch spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptor Kinasen (GRKs) zu sein (Penn et al., 2000). Obgleich beide Endothelin-Rezeptoren, insbesondere im C-Terminus, Serin- bzw. Threonin-Reste zur Phosphorylierung enthalten (Hosoda et al., 1992; Sakamoto et al., 1993), wurde bisher nur für den ET_A-Rezeptor ein spezifisches GRK Bindungsmotiv nachgewiesen (Fredericks et al., 1996). Widersprüchlich sind die Befunde zur Rezeptoren Phosphorylierung des ET_A-Rezeptors. Während Cramer in seiner Arbeit keine Phosphorylierung des ET_A-Rezeptors fand, zeigt Freedman, daß entweder GRK2, GRK3 oder GRK5 in HEK293-Zellen beide Endothelin-Rezeptoren mit unterschiedlicher Effizienz phosphorylieren können (Cramer et al., 1997; Freedman et al., 1997). Einerseits führt diese Phosphorylierung zur Abkopplung der G α -Untereinheit und damit zur Desensitisierung, zum anderen wird hierdurch auch die Endozytose von verschiedenen GPCRs durch Anlagerung von β -Arrestinen eingeleitet (Ferguson, 2001; Zhang et al., 1999). Jedoch gibt es neben der klassischen Endozytose über

Clathrin-Vesikel einen alternativen Weg. So wurde für den ET_A-Rezeptor mehrfach gezeigt, daß er schon im unstimulierten Zustand in besonderen, Cholesterolreichen Plasmamembran Einschnürungen, den Caveolae, zu finden ist. Chun hat mit seinen Experimenten an COS-Zellen als erster die Hypothese aufgestellt, daß trotz Internalisierung der ET₁/ET_A-Rezeptor -Komplex in diesen Caveolae lange aktiv bleiben kann (Chun et al., 1994; Marsault et al., 1993). Auch 20 Min. nach seiner Internalisierung wurden noch Aktivitäten von über 30% gemessen, wogegen der ET₁/ET_B-Rezeptor -Komplex schon nach 5 Min. 80% seiner Aktivität verlor (Cramer et al., 1997).

4.2 Differenzierte Internalisierung der Endothelin-Rezeptor Subtypen

Unter Kontrolle eines CMV-Promotors wurden die Endothelin-Rezeptor Konstrukte mit Hilfe eines Expressionsvektors (Abb. auf Seite 86) in CHO-Zellen stabil transfiziert und zunächst nach ihrer GFP-Fluoreszenz selektioniert. Die stabil transfizierten CHO-Klone wurden dann auch in Bindungsexperimenten mit ¹²⁵I-ET₁ weiter charakterisiert. Die Bindung mit dem Fluorochrom-markierten Liganden Cy3-ET₁ bei 4°C läßt eine deutliche Kolokalisation mit seinem GFP-fusioniertem Endothelin-Rezeptor an der Zelloberfläche erkennen (Abb. 3.3 und 3.2). Der Ligand/Rezeptor-Komplex ist nicht homogen in der Membran verteilt, sondern in Aggregaten punktuell an der Zelloberfläche lokalisiert. Jedoch scheinen die Wege der Endozytose für GPCRs nicht festgelegt zu sein. Wird beispielsweise durch Entzug von Cholesterol die Ausbildung von Caveolae Strukturen verhindert, erfolgt die Endozytose des ET_A-Rezeptors über Clathrin Vesikel (Okamoto et al., 2000).

In einer hyperosmolaren, sucrosehaltigen Umgebung wird die Anlagerung von Clathrineinheiten an das β -Arrestin verhindert und somit dieser Rezeptorvermittelte Endozytoseweg spezifisch inhibiert (Daukas und Zigmond, 1985; Heuser und Anderson, 1989). Für den in CHO-Zellen exprimierten ET_B-Rezeptor konnte gezeigt werden, daß seine Endozytose über Clathrin Vesikel vermittelt wird (Abb. 3.8).

In primär kultivierten Astrozyten, welche beide Endothelin-Rezeptoren endogen exprimieren, konnte gezeigt werden, daß der ET_B-Rezeptor auch hier in ei-

nem Clathrinvermittelten Prozeß internalisiert wird (Abb. 3.8). Nach Ablösung der Clathrinhülle fusionieren die Vesikel mit tubulären, nahe der Plasmamembran gelegenen frühen sorting Endosomen. Hier wird entschieden, ob der Rezeptor zurück an die Zelloberfläche gelangt oder sein Weg in die Lysosomen zum proteolytischen Verdau führt. Für den Cholecystokin-, AngiotensinII-, Gastrin-releasing peptide- und Gonadotropin-releasing hormon-Rezeptor, konnte gezeigt werden, das ihre Fluorochrom-markierten Liganden im sauren Milieu dieser Endosomen (pH 6,0-6,2) dissoziieren und in den Lysosomen verdaut werden, während die Rezeptoren zurück an die Zelloberfläche transportiert werden (Roettger et al., 1995; Hein et al., 1997; Slice et al., 1998; Cornea et al., 1999). Beim Recycling können Phosphatasen in den „frühen“-Endosomen einige GPCRs, wie z.B. den β 2-Adrenergen-Rezeptor, dephosphorylieren und damit vor dem Transport zurück zur Zelloberfläche resensibilisieren (Krueger et al., 1997). Im Gegensatz dazu verbleibt der ET_B-Rezeptor in einem Komplex bis zu 4 Std. mit dem fluoreszierenden Liganden kolokalisiert, was sich u.a. auf die hohe Säurestabilität des Komplexes zurückführen läßt. Eine Kolokalisation mit DiI-LDL, einem Marker für lysosomalen Transport, belegt, daß der ET₁/ET_B-Rezeptor-Komplex in die perinukleären, „späten“-Endosomen bzw. Lysosomen sortiert wird (Abb. 3.7). Diese Kolokalisation von Rezeptor und Ligand konnte sowohl für stabil transfizierte CHO-Zellen als auch primär kultivierte Astrozyten nachgewiesen werden (Abb. 3.7). In der Familie der GPCRs wurde ein solches lysosomales Sorting nur für den LH/hCG-Rezeptor (Ghinea et al., 1992) und die Superfamilie der Protease-Aktivierten-Rezeptoren (PARs) beschrieben (Hein et al., 1994; Trejo und Coughlin, 1999; Déry et al., 1999). Für PAR1 konnte gezeigt werden, daß der intrazelluläre C-Terminus den lysosomalen Transport vermittelt. Ersetzt man den C-Terminus des Neurokinin1 (NK1)-Rezeptors, der ein Recycling zeigt (Southwell et al., 1998), durch den C-Terminus von PAR1 so wird die resultierende NK1-Rezeptor-Chimäre in Lysosomen transportiert. Umgekehrt zeigt die Chimäre aus PAR1, die den C-Terminus des NK1-Rezeptors enthält, ein Recycling (Trejo und Coughlin, 1999). Ähnliche Ergebnisse werden auch für Endothelin-Rezeptoren erzielt. Der Austausch des C-Terminus des ET_A-Rezeptors durch den korrespondierenden Teil des ET_B-Rezeptors führt zur Downregulation. Umgekehrt weist eine Chimäre des ET_B-Rezeptors mit dem C-Terminus des ET_A-Rezeptors ein Recycling auf (Paasche et al., 2001). Bei

den meisten untersuchten GPCRs konnten jedoch keine einzelnen dominanten Sequenzmotive für die Endozytose bzw. den intrazellulären Transport gefunden werden (Ferguson, 2001). Dies wurde anschaulich am β_3 -Adrenergen Rezeptor (β_3 -AR) dokumentiert, wo erst eine Substitution mehrerer intrazellulärer Domänen des β_3 -AR ihm die phänotypischen Transporteigenschaften des β_2 verlieh (Jockers et al., 1996). Für den ET_A -Rezeptor wurde ein Recycling beschrieben. In CHO-Zellen erfolgt das Recycling z.T. über ein kernnahes Recycling Kompartiment, in dem der Ligand/Rezeptor-Komplex angereichert wird (Abb. 3.3). In den eigenen Untersuchungen von CHO-Zellen mit dem ET_A -Rezeptor verbleibt ein Großteil des Rezeptor/Ligand-Komplexes an der Plasmamembran. Ob diese Rezeptor/Ligand-Komplexe Ausdruck für ein schnelles Recycling oder aber eine fehlende Internalisierung wiedergeben, ist mit der Fluoreszenzmikroskopie nicht zweifelsfrei zu erkennen. Auch bei ET_B -defizienten (sl/sl)-Astrozyten verbleibt der Ligand nach 60 Min. Inkubation bei 37°C vornehmlich an der Zelloberfläche, eine vesikuläre Anreicherung des Liganden ist nicht zu beobachten. An Astrozyten ist jedoch auch kein kernnahes Recycling-Kompartiment zu erkennen (Abb. 3.4). Allgemeine Unstimmigkeiten über den Transport des ET_A -Rezeptors sind auf zell- und gewebsspezifische Differenzen zurückzuführen. Versuche mit dominant negativen Kinasen oder Adapter-Proteinen (GRKs, β -Arrestine, Rab) bzw. ihre native Überexpression können einen starken Einfluß auf die Internalisierungskinetik und auf den Transportweg haben (Paasche et al., 2001). Die lang anhaltenden Signale des ligandstimulierten ET_A -Rezeptors, welche eine dauerhafte Gefäßmuskelkontraktion bewirken, werden mit zwei Hypothesen erklärt. Zum einen führt ein schnelles Recycling über frühe Endosomen an der Plasmamembran zur schnellen Resensibilisierung des ET_A -Rezeptors, andererseits hat die Endozytose über Caveolae möglicherweise eine verzögerte Desensibilisierung zur Folge, da in diesen Mikrodomänen keine GRKs lokalisiert sind. Welche Rolle das Recycling über perizentrioläre Kompartimente hierbei spielt, ist noch nicht geklärt.

4.3 Strukturelle Motive für die Oberflächenexpression in polarisierten MDCK-Zellen

Endothelzellen, welche ausschließlich den ET_B -Rezeptor -Subtyp exprimieren, setzen 80% ET1 nach basal frei (Wagner et al., 1992). Eine polare Expression des ET_B -Rezeptors an die basale (abluminale) Plasmamembran würde damit auch zu auto- bzw. parakrinen Effekten an Endothelzellen führen. Zur Untersuchung der Expression von ET_B -Rezeptoren wurden zunächst polarisierte MDCK-Zellen als Modellzelle eingesetzt. Es wurden für die Transportuntersuchungen MDCK-Klone genutzt, die ein ET_B GFPFusionsprotein exprimieren. Desweiteren wurden auch Zellen untersucht, in denen ein potentiell basales Transportmotiv durch Alanin-Austausch ersetzt bzw. durch eine Deletion ausgeschaltet wurde. Auch eine Chimäre des ET_B -Rezeptors mit dem C-Terminus des ET_A -Rezeptors wurde genutzt (Abb. 3.3). MDCK-Zellen wurden von verschiedenen Gruppen zum Studium des Proteintransports in polarisierten Zellen verwendet (Abb. 3.9).

Entsprechend der Endozytose sind es im trans-Golgi-Netzwerk (TGN) die gleichen Adapter- und Gerüstproteine, welche den polarisierten Membrantransport unterstützen. Als Kandidat für das Sorting basolateraler Proteine konnte ein Clathrin/AP-1 Komplex identifiziert werden, der bestimmte kurze tyrosinhaltige Motive erkennt (Orzech et al., 1999; Fölsch et al., 1999). Ein ähnliches Motiv im C-terminalen Abschnitt des ET_B -Rezeptors ließ seine bevorzugt basolaterale Lokalisation vermuten. Mehr noch gelten basolaterale Sequenzmotive in MDCK-Zellen als dominant gegenüber apikalem Sorting (Brown und Stow, 1996) Review. So führt z.B. die Insertion des Tyrosinmotivs in die kurze cytosolische Domäne des Influenza Virus Hämagglutinin (ivHA), welches normalerweise apikal lokalisiert ist, zu einem Transport an die basolaterale Membran (Brewer und Roth, 1991). Umgekehrt zeigen viele Membranproteine, wie z.B. der polymere Immunglobulin-Rezeptor (Casanova et al., 1991), in denen ein basolaterales Transportsignal entfernt wurde, ein apikales Targeting (Mostov et al., 2000). Im Gegensatz zu den basolateralen Transportmotiven, mit kurzen aromatischen Sequenzen in cytoplasmatischen Domänen, wurden sehr verschiedene apikale Determinanten in transmembranären Proteinen identifiziert. Beispielsweise konnte durch künstliche N- bzw. O-Glykosilierungen an Wachstumshormonen ihr apikaler Transport her-

beigeführt werden (Rodriguez-Boulan und Gonzalez, 1999; Benting et al., 1999). Auch die Endozytose über Caveolae findet ihr Pendant im polarisierten Transport aus dem TGN und stellt eines der wichtigsten Modelle für das apikale Protein-sorting dar. So formieren sich Glykosphingolipid-Cholesterol-reiche Inselgruppen mit GPI-Ankerproteinen und Caveolinen zur Verpackung ihrer Membranproteine in apikale Vesikel (Jacobson und Dietrich, 1999). Wird z.B. Cholesterol in der Plasmamembran reduziert, ist der Transport des ivHA aus dem TGN an die apikale Zelloberfläche stark reduziert (Keller und Simons, 1998). Alle Untersuchungen zum polarisierten Proteintransport wurden an Proteinen (z.B. Tf-R, LDL-R, ivHA) mit nur einer Transmembrandomäne durchgeführt. Bei den GPCRs sind diese Mechanismen bisher wenig untersucht (Tab. 1.4). Nativer Rhodopsin-Rezeptor wird in MDCK-Zellen nach apikal transportiert. Ohne erkennbare, bisher beschriebene Sortiermotive, führt eine Deletion des C-terminalen Endes zu seiner zellulären Gleichverteilung (Chuang und Sung, 1998). Im FSH-Rezeptor wurde ein einfaches Tyrosin-haltiges basolaterales Sortiermotiv gefunden (Beau et al., 1998), während beim adrenergen Rezeptor mehrere transmembranäre Regionen für seine vollständige basale Lokalisation notwendig sind (Saunders et al., 1998; Wozniak und Limbird, 1996). Aktuelle Arbeiten konzentrieren sich auf Einflüsse von PDZ-Domänen, welche an viele C-terminale Proteinsequenzen binden und an ihrer Lokalisation mitwirken (Peifer und Tepass, 2000). Zuletzt wurde für den GABA-Rezeptor gezeigt, daß eine PDZ Interaktion ihn basolateral in der Membran verankert, jedoch nicht an seinem Transport beteiligt ist (Perego et al., 1999). Der polarisierte Transport bei GPCRs scheint weitaus komplexer und ist nur in ersten Ansätzen verstanden, doch besteht im allgemeinen, wie bei singel transmembranären Proteinen häufig beobachtet, kein Zusammenhang mit Signalsequenzen der Endozytose (Yeaman et al., 1996).

4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Es konnte gezeigt werden, daß der Ligand gebundene ET_B-Rezeptor über Clathrin Vesikel innerhalb weniger Minuten endozytiert wird. Nach ca. 30 Min. findet sich der Ligand/Rezeptor-Komplex zusammen mit dem Markermolekül DiI-LDL in „späten“-Endosomen oder Lysosomen in der Nähe des Zellkerns. Auch 4 Std. nach seiner Internalisierung ist noch eine deutliche Kollokalisierung von Cy3-ET1 und dem ET_BGFP zumeist in peripheren bisher unbekanntem zellulären Strukturen zu finden. Der ET_B-Rezeptor wird nicht recycelt. ET_B-Rezeptoren, die nach 2 Std. wieder an die Zelloberfläche gelangen, resultieren aus einer Neusynthese. Die Bedeutung dieser Downregulation ist trotzdem unklar. Vermutet wird aber, daß der ET_B-Rezeptor einen Klärungsfaktor für ET1 darstellt. So konnte gezeigt werden, daß ET1 bevorzugt in der Lyse, wo eine hohe ET_B-Rezeptor Expression vorliegt, aus dem Plasma entfernt wird. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß in Endothelzellen, die nach ET1 Stimulation vermehrt NO-produzieren, eine zu starke NO-Freisetzung verhindert wird. Weiterhin konnte für den ET_B-Rezeptor gezeigt werden, daß er, trotz starker basolateraler Sequenzdeterminante C-Terminal, im MDCK-Zellmodell keine Expressionspolarität besitzt. Weder die ET_B-Rezeptor Chimäre mit dem C-terminalen Ende des ET_B-Rezeptors noch das Entfernen, durch Verschiebung des Stop-Codons kurz vor das tyrosinhaltige Sequenzmotiv (GYDNF), bzw. ein Alanin-Austausch (GYXXF/AAXXA), hatte Einfluß auf die Polarität der resultierenden ET_B-Rezeptor Konstrukte. Jedoch ist es nicht uneingeschränkt möglich, diese Ergebnisse auf andere polarisierte Zellsysteme zu übertragen. Zahlreiche Proteine zeigen einen zelltypspezifischen polarisierten Transport. So wurden Proteine in MDCK-Zellen basolateral in LLC-PK1-Epithelzellen apikal vorgefunden (Roush et al., 1998). Im Gegensatz zu Epithelzellen ist bisher nur sehr wenig über den Proteintransport in Endothelzellen bekannt. Mit wenigen Ausnahmen (z.B. intrazerebrale Gefäße) weisen Endothelzellen keine tight junctions auf. Polarisierungen an Endothelzellen können aber über eine Rezeptor vermittelte Adhäsion, an extrazelluläre Matrixproteine der Basalmembran erfolgen (Kowalczyk und McKeown-Longo, 1992). Um endgültig Rückschlüsse auf das Endothelin-System in den Gefäßepithelzellen schließen zu können, müssen entsprechende Experimente an Endothelzellen als dem authentischen Zellsystem durchgeführt werden.