

“Functional expression of P2Y₂ receptor and trafficking of the receptor”

Zusammenfassung

Extrazelluläre Nukleotide üben eine große Anzahl von physiologischen Effekten durch die Aktivierung von P2Y Rezeptoren aus. Die Aktivität der metabotropen P2Y Rezeptoren, die zu der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören, wird durch Endozytose reguliert. Von den acht Subtypen der P2Y Rezeptoren (P2Y_{1,2,4,6,11,12,12,14}) ist der P2Y₂ Rezeptor einzigartig, da er equipotent auf Adenin- und Uridin-Nukleotide anspricht. Zusätzlich zu Purin- und Pyrimidin-Nukleosidtriphosphaten können P2Y Rezeptoren auch durch Diadenosinpolyphosphate aktiviert werden.

Da die Proteine, die den intrazellulären Transport des endozytierten P2Y₂ Rezeptors regulieren, nicht bekannt sind, haben wir den P2Y₂ Rezeptor der Ratte mit grün-fluoreszierendem Protein (GFP) markiert und funktional in HEK-293 Zellen exprimiert, um die Translokation des Rezeptors in lebenden Zellen mittels konfokaler Mikroskopie zu beobachten. Die funktionelle Expression des Rezeptors wurde durch Messung des Anstiegs der intrazellulären Ca²⁺ Konzentration ([Ca²⁺]) nach Applikation ansteigender Konzentrationen von ATP oder UTP bestätigt. Die Stimulation mit den Agonisten bewirkte eine zeitabhängige Translokation des P2Y₂ Rezeptors von der Plasmamembran in das Cytoplasma. Das Ausmaß der Endozytose des Rezeptors war von der Konzentration des Agonisten abhängig. Nach der Stimulation der Zellen mit UTP wurde zuerst eine Kollokalisierung des endozytierten Rezeptors mit frühen Endosomen und dann mit Lysosomen beobachtet. Die Inhibierung der Rezeptor-Endozytose durch hoch-viskoses Medium oder Chlorpromazin in Gegenwart von UTP weist auf die Internalisierung des Rezeptors durch den Clathrin-vermittelten Signalweg hin. Die Nichtbeteiligung des Caveolin-vermittelten Signalweges wurde bestätigt, da Filipin-III nicht die Kinetik der Endozytose des P2Y₂-GFP Rezeptors beeinflusste. Die Steuerung des Rezeptors von den Endosomen zu den Lysosomen scheint den Proteasom-Signalweg einzuschließen, da die Inhibierung des Proteasomen-Komplexes das Recycling des Rezeptors zur Plasmamembran erhöhte. Ein interessanter Befund der Studie ist die Tatsache, dass ATP und UTP unterschiedliche Transport-Signalwege für den endozytierten Rezeptor auslösen, obwohl sie eine identische Potenz hinsichtlich der

Ca^{2+} -Freisetzung besitzen. Dies ist aus den unterschiedlichen Kinetiken des Wiedererscheinens des endozytierten P2Y_2 -GFP Rezeptors an der Zelloberfläche ersichtlich, je nach Stimulation durch ATP bzw. UTP. Am intrazellulären Transport des endozytierten P2Y_2 Rezeptors sind die Ca^{2+} -Calmodulin abhängige Proteinkinase II (CaMKII), PP2A, Proteinkinase C, RhoA-Kinase, PI3-Kinase und Phospholipase D_2 (PLD₂) beteiligt. Dies konnte mittels Vorbehandlung von P2Y_2 -GFP Rezeptor-exprimierenden Zellen mit spezifischen Inhibitoren dieser Proteine nachgewiesen werden, da diese den Zeitverlauf sowohl von der Endozytose als auch des Wiedererscheinens des Rezeptors an der Zelloberfläche veränderten. Die Diadenosinpolyphosphate haben unterschiedliche Potenz in der Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$, der Induzierung der Endozytose des P2Y_2 Rezeptors, seines intrazellulären Transportes und der P2Y_2 Rezeptor-vermittelten Proliferation. In der Reihenfolge $\text{Ap}_4\text{A} > \text{Ap}_3\text{A} \geq \text{Ap}_5\text{A} >> \text{Ap}_2\text{A}$ nahm die Wirksamkeit am P2Y_2 Rezeptor für die angeführten Prozesse ab.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in dieser Studie zum ersten Mal gezeigt wurde, dass (i) eine starke Korrelation zwischen der Konzentration des Agonisten und der dadurch bedingten Endozytose des P2Y_2 Rezeptors besteht, (ii) ATP und UTP einen unterschiedlichen intrazellulären Transport des endozytierten Rezeptors auslösen, (iii) der Proteasom-Signalweg sehr wahrscheinlich an dem intrazellulären Transport des P2Y_2 Rezeptors beteiligt ist, (iv) dieser intrazelluläre Transport durch eine Reihe von Proteinkinasen und zytosolischen Proteinen kontrolliert wird, die dadurch letztendlich die weiteren Reaktionen der Zelle bestimmen und (v) Diadenosinpolyphosphate den intrazellulären Transport des P2Y_2 Rezeptors und auch die durch den Rezeptor stimulierte Proliferation modulieren.

M.Sc. Mohan Eknath Tulapurkar

“Functional expression of P2Y₂ receptor and trafficking of the receptor”

Abstract

Extracellular nucleotides exert a large number of physiological effects through activation of P2Y receptors. The activity of the metabotropic P2Y receptors, which belong to the family of G protein-coupled receptors (GPCRs), is regulated by endocytosis. Out of the eight P2Y_(1,2,4,6,11,12,13,14) subtypes that have been characterized, the P2Y₂ is unique in that it responds equipotently to adenine and uridine triphosphates in terms of Ca²⁺-release. In addition to purine or pyrimidine nucleoside triphosphates, P2Y receptors can also be activated by diadenosine polyphosphates.

As the proteins which regulate trafficking of the endocytosed P2Y₂ receptor are not known, we investigated this by functional expression of the rat P2Y₂ receptor, tagged with green fluorescent protein (GFP) in HEK-293 cells and visualised receptor translocation in live cells by confocal microscopy. Agonist stimulation revealed a time- and concentration-dependent translocation of the receptor from the plasma membrane to the cytoplasm. Colocalization of the endocytosed P2Y₂ receptor with clathrin, early endosomes and lysosomes in the stated sequence upon stimulation of the cells with UTP reveals internalization through the clathrin-, but not the caveolin-mediated pathway: The proteasome pathway very likely is involved in targeting of the receptor from endosomes to lysosomes, because proteasomal inhibition increased receptor recycling back to the plasma membrane. An interesting finding of the study was that ATP and UTP initiated different trafficking pathways for the endocytosed receptor were equipotent at the P2Y₂ receptor in terms of the Ca²⁺ response. Pharmacological investigation of the trafficking revealed that CaMKII, PP2A, PKCs, RhoA kinase, PI3K and PLD₂ are involved in modulating the trafficking of the endocytosed P2Y₂ receptor. Different potencies in elevating [Ca²⁺]_i, inducing endocytosis or modulating trafficking of the P2Y₂ receptor and proliferation with a potency order of Ap₄A > Ap₃A ≥ Ap₅A >> Ap₂A could be demonstrated.

In conclusion through this study we were able to demonstrate for the first time that (i) there is a strong correlation between the concentration of the agonist and endocytosis of the P2Y₂-GFP receptor; (ii) ATP and UTP induce different trafficking of

the endocytosed receptor; (iii) the proteasomal pathway is involved in trafficking of the P2Y₂ receptor ; (iv) trafficking of the P2Y₂ receptor is controlled by a orchestra of kinases and cytosolic proteins which finally regulate the fate of the cell and (v) diadenosine polyphosphates also modulate the trafficking of the P2Y₂ receptor and also P2Y₂ receptor modulated proliferation.