



Doctoral Thesis

Na⁺,K⁺ ATPase und Polarität der Plasmamembran in Darmepithelzellen der Ratte

Author(s):

Marxer, Adrian Alfred

Publication Date:

1984

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000342807> →

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](#).

6. Zusammenfassung

Nach Immunisierung von Mäusen mit intakten Zellen einer permanenten Zellkulturlinie von intestinalen Kryptepithelzellen der Ratte wurde durch Zellhybridisierung der monoklonale Antikörper IEC 1/48/1/2 produziert. Mit folgenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass dieser Antikörper gegen die Na^+, K^+ -ATPase des Intestinaltraktes der Ratte gerichtet ist:

1. Aus einer Basolateralmembranfraktion von Epithelzellen des Dünndarmes präzipitierte der monoklonale Antikörper unter nicht denaturierenden Bedingungen zwei Proteine mit einem Molekulargewicht von 97'500 Da respektive 47'500 Da. Aehnliche Molekulargewichte wurden für die Na^+, K^+ -ATPase anderer Spezies bestimmt.
2. Mit spezifischen, polyklonalen Antikörpern gegen die Na^+, K^+ -ATPase der Hundeniere konnten die beiden vom monoklonalen Antikörper präzipitierten Proteine auf Western Blots als α - und β -Untereinheit der Na^+, K^+ -ATPase identifiziert werden.
3. Und schliesslich konnte die Na^+, K^+ -ATPase des Dünndarmes der Ratte mit dem monoklonalen Antikörper in enzymatisch aktiver Form präzipitiert werden.

Nachdem die Spezifität des monoklonalen Antikörpers feststand, konnte mit indirekter Immunfluoreszenz an Gefrierschnitten die Lokalisierung der Na^+, K^+ -ATPase im Intestinaltrakt der Ratte untersucht werden. Im Dünndarm, sowie im proximalen Colon, wird die Na^+, K^+ -ATPase ausschliesslich in der Basolateralmembran der Epithelzellen exprimiert. Dies entspricht der Lokalisierung des Enzyms in anderen absorptiven und sekretorischen Epithelien. Na^+, K^+ -ATPase ist somit im Dünndarm und im proximalen Colon der Ratte ein für die Basolateralmembran spezifisches Markerenzym. Ueberraschenderweise markierte der monoklonale Antikörper im distalen

Colon der Ratte zusätzlich zur Basolateralmembran auch den Bürstensaum der Epithelzellen.

Um die Identifizierung dieses kreuzreagierenden Antigens im Bürstensaum der Colonozyten zu ermöglichen, wurde erstmals eine Methode zur Reinigung von Bürstensaummembranen des distalen Rattencolons entwickelt. Ausgehend von isolierten Colonozyten wurden auf einem Percollgradienten intakte Bürstensaumkappen isoliert. Mit diesem Vorgehen war es trotz dem Fehlen eines Markerenzym möglich, die Reinigung der Bürstensäume zu verfolgen und zwar mittels Phasenkontrastmikroskopie. Durch Extraktion der intakten Bürstensäume mit 1.0 M Tris konnte der grösste Teil der Zytoskelettproteine von den Bürstensaummembranen getrennt werden. Die so extrahierten Bürstensaummembranen wurden anschliessend auf einem 20% Ficoll-Kissen isoliert.

Versuche, das kreuzreagierende Antigen aus dieser Membranfraktion mit dem monoklonalen Antikörper zu präzipitieren, führten noch zu keinen abschliessenden Resultaten. Das SDS-Gel des Immunpräzipitates zeigte neben der schweren und der leichten Kette des monoklonalen Antikörpers und des während der Immunisolation verwendeten Albumins nur ein Proteinband, dessen elektrophoretische Mobilität derjenigen der α -Untereinheit der Na^+, K^+ -ATPase entsprach. Auf Grund dieser Resultate und der Beobachtung, dass ein β -Ketten-spezifischer polyklonaler Antikörper die Bürstensaummembran nicht markierte, wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich beim kreuzreagierenden Antigen des Bürstensaumes um ein Protein handelt, das der α -Untereinheit der Na^+, K^+ -ATPase ähnlich ist

Epithelzellen des distalen Colons sind damit ein interessantes Modellsystem, in dem, basierend auf den hier erarbeiteten Grundlagen, die molekularen Mechanismen der polaren Expression von zwei offenbar ähnlichen, weil vom selben monoklonalen Antikörper erkannten, Antigenen studiert werden können.

Summary

A monoclonal antibody designated IEC 1/48/1/2 was produced by the hybridoma technique using an established epithelial cryptcell line of rat small intestine as antigen. With this antibody two proteins with apparent molecular weights of 97'500 and 47'500 could be precipitated from solubilized basolateral membranes of rat small intestinal epithelial cells. The following observations demonstrated that the two proteins were the subunits of Na^+, K^+ -ATPase:

1. Their molecular weights favorably compare with those described for the two subunits of Na^+, K^+ -ATPase of other species.
2. The immunoisolated antigen reacted with polyclonal antisera to purified dog kidney Na^+, K^+ -ATPase on western blots.
3. The immunoisolated antigen displayed Na^+, K^+ -ATPase activity.

With this monoclonal antibody Na^+, K^+ -ATPase was localized on frozen sections of the rat intestinal mucosa by indirect immunofluorescence. In the small intestine and the proximal colon Na^+, K^+ -ATPase was strictly confined to the basolateral membrane of the enterocytes, confirming current concepts. The results demonstrate that Na^+, K^+ -ATPase is indeed a marker for the basolateral membrane of the absorptive columnar cells in these segments of the rat intestinal tract.

Surprisingly, in the distal colon immunoreactivity was also found in the brush borders of the absorptive columnar cells in addition to the basolateral membranes. In order to characterize the crossreacting antigen, a method was developed for the purification of brush border membranes from the distal colon. The main problem of such a purification was the lack of an accepted marker enzyme for this membranes. For this reason isolated colonocytes were homogenized in a way to leave their brush borders intact which

allowed optical monitoring of this organelle by phase-contrast microscopy during purification. Brush borders were isolated by Percoll gradient centrifugation. The purified brush borders were disrupted by 1.0 M Tris which released the brush border membrane in vesicular form with minimal contamination by cytoskeletal proteins. The membrane vesicles were recovered on a 20 % Ficoll cushion.

The identification of the crossreacting antigen was attempted by immunoprecipitation followed by SDS-polyacrylamid gelelectrophoresis. A single protein was precipitated from solubilized colonic brush border membranes having the same electrophoretic mobility as the α -chain of Na^+, K^+ -ATPase. These results in conjunction with the observation that a β -chain-specific polyclonal antibody to Na^+, K^+ -ATPase does not label the colonic brush borders suggest that the crossreacting antigen is a α -chain-like protein. Colonocytes of the distal large intestine might represent an interesting new model to study the molecular mechanism underlying the polarized expression of surface membrane proteins in epithelial cells.