Charakterisierung von Transportsignalen bei Endothelinrezeptoren

vorgelegt von Diplom-Biologin Jana Melzer

Von der Fakultät III – Prozesswissenschaften der Technischen Universität Berlin zur Erlangung des akademischen Grades

> Doktor der Naturwissenschaften – Dr. rer. nat. –

Promotionsausschuss:Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. Ulf Stahl1. Berichter: Prof. Dr. rer. nat. Roland Lauster2. Berichter: PD Dr. med. Alexander Oksche

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 19.12.2007

Berlin 2007 D83

Leopold Emil und Guido

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Walter Rosenthal für die Überlassung des spannenden Themas und die Bereitstellung optimaler Arbeitsbedingungen zur Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Ich danke vielmals meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. Alexander Oksche, für seine herzliche Betreuung während der Zeit meiner Doktorarbeit und für seine hilfreiche Unterstützung trotz der räumlichen Entfernung in der letzten Phase der Fertigstellung. Zudem danke ich allen Mitarbeitern des FMP Berlin und des Instituts für Pharmakologie der FU Berlin für die tolle Zusammenarbeit und für die schöne Zeit des Experimentierens.

Herrn Prof. Dr. Roland Lauster danke ich für seine unkomplizierte und freundliche Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Meinen Eltern und Geschwistern danke ich für ihre stetige Unterstützung und ihr Vertrauen in mich. Mein Dank gilt auch meinen Freunden für die schönen Momente der Ablenkung.

Ich danke meinem Mann Guido, der mich stets in allen erdenklichen Situationen liebevoll unterstützt hat. Ohne ihn wäre die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Und ganz besonders dankbar bin ich für meinen Sohn Leopold Emil, der in allen Lebensumständen ein mich wärmender Sonnenschein ist.

Inhaltsverzeichnis

Zusami	menfassung	1
Summa	ry	2
1 Ein	leitung	3
1.1	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	3
1.2	Rezeptoraktivierung und Signalweiterleitung	5
1.3	Desensitivierung von G-Protein-gekopppelten Rezeptoren	7
1.4	Rezeptor-vermittelte Endozvtose	8
15	Die Endotheline und Endothelin-Rezentoren	10
1.6		14
1.0 2 Ma	terialian und Mathodan	15
		15
2.1 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4 2.1.5 2.1.5.1 2.1.5.2 2.1.6 2.1.6.1 2.1.6.2 2.1.7 2.1.7.1 2.1.7.2 2.1.7.3	Materialien Reagenzien und Verbrauchsmaterialien Enzyme und Antikörper Endothelin-Rezeptor-Liganden Größenstandards und Kits Verwendete Organismen <i>E. coli</i> -Stämme Eukaryontische Zelllinien Klonierungsvektoren und Plasmide Klonierungsvektoren <i>E. coli</i> Plasmide Oligonukleotide Primer zur Sequenzierung Primer zur Klonierung Mutageneseprimer	15 15 18 18 19 20 20 20 21 21 21 21 23 23 23 24 24
2.2	Methoden	26
2.2.1.1 2.2.1.2 2.2.1.3 2.2.2 2.2.2.1 2.2.3 2.2.4 2.2.5 2.2.6 2.2.7 2.2.8 2.2.9 2.2.10 2.2.11 2.2.12 2.2.13 2.2.14 2.2.15 2.2.16 2.2.17 2.2.18 2.2.19 2.2.20 2.2.20 2.2.21	Kultivierung von HEK293- und MEF-Zellen Transfektion Einfrieren und Auftauen von Zellklonen Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen Antibiotika und andere Mediumzusätze Herstellung kompetenter Bakterien Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA Präparation von Plasmid-DNA Spaltung der DNA mit Restriktionsenzymen Generierung von <i>blunt ends</i> bei linearen DNA-Fragmenten Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten Ligation von DNA-Fragmenten Fällung der DNA DNA-Konzentrationsbestimmung Agarosegelelektrophorese Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen Sequenzierung von Plasmid-DNA Polymerasekettenreaktion (PCR) Ortsgerichtete Mutagenese SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese Coomassie-Färbung Immunoblot Bestimmung der Proteinkonzentration Überevoression und Aufreinigung von GST-Eusionsproteinen	26 26 27 28 29 29 30 30 30 30 30 30 30 30 30 30 30 30 30
2.2.21	GST-Pulldown	39 40

2.2.23 2.2.24 2.2.25 2.2.26 2.2.27	Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (Elisa) Immunopräzipitation Bindungsassay Membranpräparation über Percoll-Gradienten Laser-Scanning-Mikroskopie	41 42 43 45 46	
3 E	rgebnisse	47	
3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.4.1 3.1.4.2 3.1.5	Bedeutung des Tyrosin-Motivs im C-Terminus des Endothelin-B- Rezeptors für die Internalisierung ET _B -Rezeptoren mit Aminosäureveränderungen im C-Terminus Klonierung eines Epitops in den N-Terminus des ET _B -Rezeptors Stabil exprimierende HEK293 Zelllinien Einfluss des C-Terminus auf die Internalisierung des ET _B -Rezeptors Untersuchung der Internalisierung mittels ELISA Laser-Scanning-Mikroskopie von HEK293-Zellklonen Untersuchungen zum Iysosomalen Abbau des wildtypischen und des mutierten	47 47 48 49 50 50 52 54	
3.2 3.2.1 3.2.1.1 3.2.1.2 3.2.1.3 3.2.2 3.2.3	Identifizierung von Interaktionspartnern des ET _B -Rezeptors GST-Pulldown Konstruktion von GST-Fusionsproteine Charakterisierung der GST-Fusionsproteine GST-Pulldown und Nachweis der Arrestin3-Interaktion Co-Immunopräzipitation zum Nachweis der Arrestin3-Interaktion Membranpräparation zum Nachweis der Arrestin3-Interaktion	56 56 58 62 63 65	
3.3 3.3.1 3.3.2 3.3.3	Einfluss von Arrestin3 auf die Internalisierung des ET_B-Rezeptors Arrestin-Rekrutierung nach Agoniststimulation des ET _B -Rezeptors Untersuchung des Einflusses von Arrestin3 auf die Internalisierung des ET _B Rezeptors Internalisierung des ET _B -Rezeptors in MEF-Zellen	67 67 70 73	
3.4	Untersuchung weiterer potentieller Signale im C-Terminus des ET _r Rezeptors	в - 74	
4 D	iskussion	81	
4.1	Identifizierung des Internalisierungssignals	81	
4.2	Interaktion des ET _B -Rezeptors mit Arrestin3 und AP-2	83	
4.3 von A	Modulation der ET _B -Rezeptorinternalisierung durch Co-Expressior rrestin und Dynamin	า 85	
4.4	Arrestin-unabhängige Internalisierung	87	
4.5	Intrazelluläre Verteilung des ET _B -Rezeptors bei C-terminalen Veränderungen	89	
5 L	iteraturverzeichnis	90	
6 P	ublikationen	100	
6.1	Publikationen	100	
6.2	Posterpräsentationen	100	
6.3	6.3 Forschungspreis 1		
Abbildungsverzeichnis 10			
Tabellenverzeichnis10			
Abkü	Abkürzungen 10		
Lebenslauf 10			

Zusammenfassung

(ET_A-Endothelinrezeptoren ET_{B} -Rezeptor) die und vermitteln physiologischen Effekte von Endothelin 1 (ET1), welches einer der stärksten Vasokonstriktoren ist. Beide Rezeptoren gehören zur großen Familie der Gprotein-gekoppelten Rezeptoren. Es ist bekannt, dass der ET_A-Rezeptor über den recycling-Weg internalisiert und zurück zur Plasmamembran transportiert wird, wohingegen der ET_B-Rezeptor nach ET1-Stimulation in die Lysosomen transportiert und abgebaut wird und einer down-Regulation unterliegt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass im C-Terminus des ET_B-Rezeptors ein GYXXF-Motiv lokalisiert ist, das für die Internalisierung wichtig ist. Mit Hilfe von ELISA-Experimenten und Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) an stabilen Zellklonen, die den wildtypischen oder eine mutierte Form des ET_B-Rezeptors exprimierten, konnte gezeigt werden, dass Mutationen in diesem Motiv zu einer verzögerten Internalisierung nach ET1-Stimulation führen. Dabei ist der Austausch des Tyrosins ausreichend, um die Internalisierung zu vermindern. Das GYXXF-Motiv ist auch als lysosomales Sortierungsmotiv beschrieben. Es konnte jedoch durch low-temperature-PAGE gezeigt werden, dass der Transport des ET_B-Rezeptors in Lysosomen nicht durch Mutationen in diesem Motiv beeinflusst wird.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Internalisierung des ET_B-Rezeptors Arrestin-unabhängig verläuft. LSM an lebenden HEK293-Zellen, die transient den ET_B-Rezeptor und Arrestin3.GFP co-exprimierten, deutete auf eine schwache Arrestin-Rekrutierung zur Plasmamembran hin. Das Arrestin-Signal war jedoch unter stimulierten Bedingungen nicht erhöht. Jedoch konnte durch LSM an MEF-Zellen, die einen *knock-out* in den Genen für Arrestin2 and Arrestin3 (MEF-arr2^{-/-}/arr3^{-/-}) aufwiesen, eine Arrestinunabhängige Internalisierung des ET_B-Rezeptors nachgewiesen werden. Untersuchungen zu weiteren potentiellen Motiven im C-Terminus des ET_B-

Rezeptors ergaben, dass ein *coiled-coil-*Motiv Einfluss auf den intrazellulären Transport ausübt.

Summary

Endothelin receptors (ET_A and ET_B) mediate the physiological effects of endothelin 1 (ET1) representing one of the most potent vasoconstrictors. Both receptors belong to the large family of G-protein coupled receptors. It is known that the ET_A receptor utilizes the recycling pathway and re-appears on the plasma membrane, whereas the ET_B receptor is transported to lysosomes upon ET1 stimulation and subsequently degraded and downregulated. In this study it was shown that the C-terminus of the ET_B receptor harbours a GYXXF motif which is mainly important for proper internalization. Enzyme-linked immunosorbent assay and laser scanning microscopy (LSM) of cell clones stably expressing wildtype and mutant ET_B receptors with alteration within this motif revealed a delayed sequestration of mutant receptors upon ET1 stimulation. The substitution of a single tyrosine within this motif is sufficient enough reducing the internalization. As the GYXXF motif is described as a lysosomal targeting motif, it was shown by lowtemperature SDS-PAGE that the lysosomal trafficking of the ET_B receptor does not seem to be affected by mutations of this motif.

Furthermore, the ligand induced internalization of the ET_B receptor occurred to be independent of arrestin3. The arrestin3 recruitment was analyzed by LSM of living HEK293 and cells transiently expressing the ET_B receptor and arrestin3.GFP where only weak recruitment could be detected. Interestingly, the arrestin3 signal was not increased under stimulated conditions. Subsequently, live cell imaging with LSM of mouse embryonic fibroblasts carrying a double knockout for arrestin2 and arrestin3 (MEF-arr2^{-/-}/arr3^{-/-}) showed the independence of arrestin3 in the internalization process of the ET_B receptor.

Further analysis of potential sorting motivs within the C-terminus of the ET_B receptor revealed that a coilded-coil motiv may be involved in intracellular trafficking of the receptor.

1 Einleitung

1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bilden die größte Familie der membranständigen Rezeptoren. Seit ca. 20 Jahren werden sie als eine Proteinfamilie angesehen und untersucht. Erst im Jahre 1986 fielen Sequenzhomologien zwischen zwei physiologisch sehr unterschiedlich wirkenden Rezeptoren – dem β 2-adrenergen Rezeptor und dem Rhodopsin - auf. Auf dieser Basis wurde eine große Familie von diesen Rezeptoren postuliert (Dixon et al. 1986). Die Klonierung und Sequenzanalyse weiterer Vertreter dieser Klasse bestärkten diese Theorie (Kubo et al. 1986; Dohlman et al. 1987; Frielle et al. 1987; Masu et al. 1987). Bis heute sind ca. 2000 Mitglieder der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bekannt (Ji et al. 1998), wobei allein mehrere hundert dem olfaktorischen System zugeordnet sind (Buck and Axel 1991). Die Aktivierung dieser Rezeptoren erfolgt durch eine Vielzahl von Stimuli wie Licht, Kalzium, Duftstoffe oder Pheromone, Aminosäuren, Peptide, Nukleotide und Proteine und viele andere mehr (Larhammar et al. 1993; Brown et al. 1996; Rozengurt 1998; Shichida and Imai 1998; Horn et al. 2003; Gaillard et al. 2004; Salazar et al. 2007). Die verschiedenen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wurden aufgrund von Sequenzvergleichen in sechs Rezeptorklassen unterteilt, die untereinander aber keine Seguenzähnlichkeiten aufweisen. Unter dieser großen Vielzahl von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ist das Rhodopsin bis heute der einzige Vertreter, für den die Kristallstruktur und somit die räumliche Struktur bekannt ist (Palczewski et al. 2000). Es ist auch lediglich der inaktive Zustand aufgeklärt, nicht aber der aktivierte Zustand.

Die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wurde ursprünglich aufgrund von Strukturvorhersagen 7-Transmembranrezeptoren genannt (Dohlman et al. 1991; Baldwin 1993). Die Auflösung der Struktur des Rhodopsins bestätigte diese Vorhersagen und ergab, dass sieben

transmembranäre α -Helices im entgegengesetzten Uhrzeigersinn in einem Bündel in der Plasmamembran angeordnet sind, die durch intra- und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Sie besitzen außerdem einen extrazellulären Aminoterminus (N-Terminus) und einen intrazellulären Carboxyterminus (C-Terminus) (siehe Abb. 1).



Abb. 1: Schematische Darstellung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors. Der aktivierte G-Protein-gekoppelte Rezeptor interagiert über den C-Terminus mit einem G-Protein. Nach Aktivierung des G-Proteins erfolgt die Trennung der α -Untereinheit vom $\beta\gamma$ -Komplex und verschiedene Signalwege können aktiviert bzw. reprimiert werden, was Veränderungen in den intrazellulären Konzentrationen verschiedener Metabolite nach sich zieht. AC, Adenylatzyklase; PLC, Phospholipase C; Rho, Rho-Kinase; PI3K, PI3-Kinase.

Während die transmembranären Regionen hoch konserviert sind, zeigt sich eine deutliche Varianz in den intra- und extrazellulären Schleifen sowie in

den N- und C-Termini. Die extrazellulären Schleifen sind meist kurz, wohingegen der N-Terminus sehr stark in seiner Größe variieren und sehr lang sein kann. Diese Varianz kann die unterschiedlichen Ligandspezifitäten der Rezeptoren erklären. Auf intrazellulärer Seite weisen die 3. intrazelluläre Schleife und der C-Terminus sehr starke Variationen hinsichtlich ihrer Länge auf. welche die unterschiedlichsten Wirkungsweisen verschiedener Rezeptoren innerhalb dieser Familie wiederspiegeln können. Der heute hauptsächlich gebräuchlichere Name der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren beschreibt die Tatsache, dass die meisten Mitglieder dieser Rezeptorfamilie heterotrimere G-Proteine aktivieren. Diese G-Proteine sind dann direkt an der Signaltransduktion beteiligt, indem sie Effektorproteine, wie zum Beispiel die Adenylatzyklase oder die Phospholipase C, beeinflussen (Gilman 1987; Conklin and Bourne 1993; Schwindinger and Robishaw 2001). Die heterotrimeren G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten (α , β , γ). Im inaktiven Zustand hat die α -Untereinheit ein Guanosindiphosphat (GDP) gebunden – woher die Bezeichnung G-Protein (Guanylnukleotid-bindendes Protein) herrührt – und ist durch die Assoziation an die $\beta\gamma$ -Untereinheiten in seiner Funktionalität gehemmt (Neer 1995; Hamm and Gilchrist 1996) (siehe Abb. 1).

1.2 Rezeptoraktivierung und Signalweiterleitung

Die Fähigkeit einer Zelle, auf einen äußeren Reiz zu reagieren und diesen in ein intrazelluläres Signal zu übersetzen, beruht auf einen präzisen und doch sehr einfachen Mechanismus der Signaltransduktion. Im Falle der Signaltransduktion, die durch G-Protein-gekopptelte Rezeptoren vermittelt wird, bindet ein Ligand spezifisch an seinen Rezeptor, der die Schnittstelle zwischen außen und innen darstellt. Dieser Rezeptor interagiert mit mehreren G-Proteinen, die ihrerseits eine Vielzahl von Effektormolekülen beeinflussen und als Folge dessen ein Pool an Signalmolekülen gebildet

wird, die sogenannten second messenger. Das ursprüngliche extrazelluläre Signal wird durch die verschiedenen Proteinwechselwirkungen in ein intrazelluläres Signal umgewandelt und während dieses Prozesses amplifiziert.

Die Bindung eines Liganden (Agonisten) an seinen Rezeptor bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch Bindestellen für die Interaktion mit einem G-Protein freigelegt werden (Farrens et al. 1996; Bourne 1997; Gether and Kobilka 1998; Palczewski et al. 2000). An der α -Untereinheit des G-Proteins erfolgt ein schneller Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) durch ein Molekül Guanosintriphosphat (GTP). Dabei wird die Affinität der Untereinheiten zueinander reduziert und es kommt zur Dissoziation des heterotrimeren Komplexes in eine Ga-Untereinheit und einen G $\beta\gamma$ -Komplex (Neer 1995). Sowohl die GTPgebundene $G\alpha$ -Untereinheit als auch der $G\beta\gamma$ -Komplex beeinflussen im Folgenden eine Vielzahl von spezifischen Effektormolekülen (wie z. B. die Adenylatzyklase, die Phospholipase C oder Rezeptorkinasen). Diese Effektormoleküle sind ihrerseits direkt oder indirekt an der Generierung von Signalmolekülen, die second messenger, beteiligt (Berridge 1993; Divecha and Irvine 1995). Die Inaktivierung der G-Proteine erfolgt durch die Hydrolyse des GTP zu GDP durch die intrinsische GTPase-Aktivität der Ga-Untereinheit. Diese dissoziiert von dem Effektor und es wird die Reder drei Untereinheiten (G α und G $\beta\gamma$) Assoziation eingeleitet. Die Signalkaskade ist somit beendet. Der Vorgang der Signalweiterleitung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren über die G-Proteine kann daher als ein sich selbstregulierender, zyklischer Prozess betrachtet werden (siehe Abb. 2). Die Weiterleitung des Signals über den G-Protein-gekoppelten Rezeptor, weiter zum G-Protein und anschließend zur Generierung der Signalmoleküle entspricht einer Amplifikation des ursprünglichen Signals. Über spezifische Regulation auf jeder einzelnen Stufe dieser Amplifikationskaskade kann die Zelle die Feinregulation der gebildeten second messenger vornehmen, und so gezielt auf Signale/Reize reagieren.



Abb. 2: Schematische Darstellung der Wirkungsweise der G-Proteine. Die durch die Ligandbindung (1) induzierte Konformationsänderung des Rezeptors ermöglicht die Bindung eines G-Proteins. Es erfolgt ein Austausch eines GDP gegen ein GTP (2), welches zur Dissoziation der α -Untereinheit und des $\beta\gamma$ -Komplexes und damit zur Aktivierung des G-Proteins führt. Nach der Hydrolyse des GTP zu GDP (3) ist die Re-Assoziation (4) der Untereinheiten möglich und das G-Protein kann den Zyklus erneut durchlaufen.

1.3 Desensitivierung von G-Protein-gekopppelten Rezeptoren

Der Prozess der Anpassung eines Rezeptors an einen langandauernden, äußeren Stimulus wird auch Desensitivierung genannt. Dabei kommt es bei kontinuierlicher Agonistbindung an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor zu einer Abschwächung der durch den Rezeptor vermittelten Signaltransduktion (Hausdorff et al. 1990; Carman and Benovic 1998; Kohout and Lefkowitz 2003). Die Agonistbindung und die damit induzierte Konformationsänderung des Rezeptors ermöglichen die Rekrutierung von spezifischen G-Proteingekoppelten Rezeptorkinasen zum aktivierten Rezeptor, was zur Phosphorylierung von Serin- und/oder Threoninresten in der dritten intrazellulären Schleife und/oder dem C-Terminus führt (Lefkowitz 1993; Ferguson et al. 1996; Krupnick and Benovic 1998). Dieser aktivierte und phosphorylierte Rezeptor weist eine hohe Affinität zum Arrestin auf (Lohse et al. 1990; Lohse et al. 1992). Die Bindung von Arrestin an den aktivierten, phosphorylierten Rezeptor verhindert die Bindung des G-Proteins und unterbricht damit die G-Protein-vermittelte Signalkaskade (Benovic et al. 1987; Lohse et al. 1990). Dies resultiert in einer reduzierten Antwort auf den Agonisten.

Des Weiteren vermittelt Arrestin auch die Kopplung von aktivierten Rezeptoren an Clathrin-umhüllte Bereiche in der Plasmamembran (Goodman et al. 1996; Oakley et al. 1999; Luttrell and Lefkowitz 2002) und leitet somit die ersten Schritte der Rezeptor-vermittelten Endozytose ein.

1.4 Rezeptor-vermittelte Endozytose

Internalisierung ist zum einen wichtig Der Prozess der für die Desensitivierung, um aktivierte Rezeptoren vom Ort der G-Protein vermittelten Signalkaskade – der Plasmamembran – in intrazelluläre Membrankompartimente zu transportieren (Oakley et al. 1999; Trejo and Coughlin 1999). Zum anderen ist die Internalisierung aber auch essentiell für die Re-Sensitivierung der phosphorylierten, mit dem Liganden besetzten Rezeptoren, um diese wieder zu dephosphorylieren und für eine neue Ligandenbindung verfügbar und durch diese aktivierbar zu machen (Zhang et al. 1997; Anborgh et al. 2000; Ferguson 2001). Des Weiteren spielt die Endozytose eine wichtige Rolle beim lysosomalen Abbau von aktivierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, was zum Absinken bzw. zur Herunterregulation der Rezeptorzahl (down-regulation) führt (Bonifacino and Traub 2003; Paing et al. 2004; Ward et al. 2004). Eine vereinfachte schematische Übersicht über die Rezeptor-vermittelte Endozytose ist in Abb. 3 dargestellt.



Abb. 3: Schematische Darstellung der Rezeptor-vermittelten Endozytose (Pierce et al. 2002).

Die Mechanismen der Internalisierung benötigen eine sehr präzise und differenzierte Folge von Sortierungsereignissen, die die Erkennung und den Transport von Proteinen aus der Plasmamembran zu den Endosomen und den weiteren intrazellulären Transport vermitteln. Die korrekte Sortierung basiert auf kleinen Aminosäureabschnitten in den cytosolischen Domänen der transmembranären Proteinen, sogenannte Erkennungsmotive. Die zwei wichtigsten Klassen von Erkennungsmotiven während der Endocytose bilden Di-Leucin-basierten Sortierungssignale, welche als die Tyrosin- und Erkennungsmotive für Adapterproteine, wie dem Plasmamembranassoziierten Adapterprotein-Komplex 2 (AP-2), dienen (Marks et al. 1995; Ohno et al. 1995; Bonifacino et al. 1996; Hirst et al. 1999). AP-2 ist zudem eine der Hauptkomponenten der Clathrin-Vesikel (Jackson et al. 2003). Eine spezielle Form des Tyrosin-basierten Sortierungssignals bildet das

YXX Φ -Motiv. Proteine, wie zum Beispiel der Transferrin-Rezeptor und die lysosomalen Membranproteine LAMP-1 und LAMP-2, benötigen dieses Motiv

zur schnellen Internalisierung aus der Plasmamembran in die Endosomen. Im späteren Verlauf des Internalisierungsprozesses finden sich diese Proteine in den späten Endosomen/Lysosomen wieder (Williams and Fukuda 1990; Harter and Mellman 1992; Gough et al. 1999).

1.5 Die Endotheline und Endothelin-Rezeptoren

Endotheline (ET1, ET2 und ET3) sind Peptide von 21 Aminosäuren. Endothelin-1 (ET1) wurde 1988 entdeckt (Yanagisawa et al. 1988). Es ist ein starker Vasokonstriktor und wird von Endothelzellen aber auch von vaskulären Muskelzellen, Makrophagen, Fibroblasten und Kardiomyozyten gebildet (Miyauchi and Goto 1999). Die Wirkung der Endotheline auf das vaskuläre System wird durch spezielle Rezeptoren vermittelt, dem Endothelin-A-Rezeptor (ET_A-Rezeptor) und dem Endothelin-B-Rezeptor (ET_B-Rezeptor) (Arai et al. 1990; Sakurai et al. 1990; Hosoda et al. 1991; Ogawa et al. 1991). Alle drei Endotheline weisen eine etwa gleich starke Bindungsaffinität zum ET_B-Rezeptor auf, wohingegen ET3 im Vergleich zu ET1 und ET2 eine deutlich schwächere Affinität zum ET_A-Rezeptor aufweist $(ET1 \ge ET2 >> ET3)$ (Spokes et al. 1989). Beide Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Während der ET_A-Rezeptor in glatten Muskelzellen der Blutgefäße exprimiert wird, ist der ET_B-Rezeptor hauptsächlich in Endothelzellen aber auch in glatten Muskelzellen nachweisbar. Obwohl die Ähnlichkeit beider Rezeptoren auf Proteinebene sehr hoch ist (Sakurai et al. 1992), sind die physiologischen Reaktionen und intrazellulären Signalwege nach Agoniststimulation sehr unterschiedlich. So führt die Stimulation mit ET1 zunächst zu einer kurzen Vasodilatation (Minuten) gefolgt von einer lang andauernden Vasokonstriktion (Stunden). In Endothelzellen resultiert die Stimulation des ET_B-Rezeptors in einer

Aktivierung der Phospholipase C über $G_{q/11}$ und führt zu einer schnellen Bildung von Inositoltriphosphat (IP-3) und Diacylglycerol (DAG). IP-3 stimuliert die Freisetzung von Kalziumionen (Ca²⁺) aus intrazellulären

Speichern (sarkoplasmatisches Retikulum), wodurch es durch die Ca²⁺abhängige endotheliale NO-Synthase zur Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) kommt. Dieses diffundiert in die glatten Muskelzellen und bewirkt eine kurze Vasodilatation (Ignarro et al. 1987; Palmer et al. 1987). DAG und Ca²⁺lonen aktivieren ihrerseits die Proteinkinase C, welches die Serin/Threonin-Phosphorylierung einer Vielzahl von Substraten nach sich zieht, was unter anderem die Zellproliferation anregt.

Bei der Stimulation des ET_A -Rezeptors kommt es ebenfalls über $G_{q/11}$ zur Aktivierung der Phospholipase C und somit zum Anstieg der Ca²⁺-Konzentration. Es kommt außerdem zur Aktivierung der Rho-Kinase über $G_{12/13}$, was zusammen mit dem gestiegenen Ca²⁺-Konzentration zu einer lang anhaltenden Vasokonstriktion führt (de Nucci et al. 1988; Seo et al. 1994).

Des Weiteren resultiert die Stimulation des ET_A -Rezeptors zur Aktivierung der Adenylatzyklase über G_s . Es kommt zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels und nach Aktivierung weiterer Signalwege (wie Serin/Threonin-Phosphorylierung verschiedener Substrate durch die A-Kinase) resultiert dies in einer Vasokonstriktion. Diesem Prozess wird durch die G_i -vermittelte Hemmung der Adenylatzyklase nach Stimulation des ET_B -Rezeptors entgegengewirkt.

Auch die Internalisierungskaskaden der beiden Endothelinrezeptoren (ET_{A} und ET_{B} -Rezeptor) unterscheiden sich erheblich voneinander. Der ET_{A} -Rezeptor durchläuft den *recycling*-Weg und wird nach der Internalisierung und dem Transport in die Endosomen wieder zurück an die Zelloberfläche transportiert (Bremnes et al. 2000), wo er einer erneuten Stimulation durch ET1 zur Verfügung steht. Die Tatsache, dass nach kontinuierlicher Stimulation mit ET1 eine lang-anhaltende Vasokonstriktion erfolgt (Goetz et al. 1989; Hinojosa-Laborde et al. 1989) wird durch die Theorie des Recyclingprozesses des ET_A -Rezeptors gestützt.

Im Gegensatz zum ET_A -Rezeptor wird der ET_B -Rezeptor nach ET1-Stimulation und Internalisierung in die Lysosomen transportiert, in denen der Abbau der Rezeptoren erfolgt (Oksche et al. 2000; Oksche et al. 2000). Nach einmaliger Internalisierung des Rezeptors in die Zelle erfolgt kein erneuter

Rücktransport zur Zelloberfläche. Diese Erkenntnisse stimmen mit den Befunden überein, dass eine kontinuierliche Stimulation des ET_B-Rezeptors mit ET1 nur zu einer kurzen Vasodilatation führt.

Erst kürzlich wurde ein Motiv im C-Terminus des ET_A -Rezeptors identifiziert, das für das typische Recycling-Verhalten des Rezeptors verantwortlich ist (Paasche et al. 2005). Bereits in einer vorangegangenen Studie derselben Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus des ET_A -Rezeptors die Information für die Internalisierungskaskade enthält. Ein chimärer ET_B -Rezeptor, der den C-Terminus des ET_A -Rezeptors trägt, zeigt nach ET1-Stimulation das Internalisierungsmuster des wildtypischen ET_A -Rezeptors. Für den ET_B -Rezeptor wurden bisher noch keine Motive für die Internalisierung gefunden.

Durch Sequenzanalysen konnten verschiedene potentielle Motive im ET_B-Rezeptor identifiziert werden, die sehr wahrscheinlich an der Endozytose beteiligt sein können (siehe Abb. 4). Im Bereich des C-Terminus befindet sich ein Tyrosin-haltiges Motiv (GYDNF), welches dem lysosomalen Sortierungs-Motiv des PAR-1 (Protease-aktivierter Rezeptor) ähnlich ist (Paing et al. 2004). Zusätzlich sind drei weitere potentiell regulatorische Motive im C-Terminus des ET_B-Rezeptors vorhanden. Kurz hinter der Palmitylierungs-Sequenz befindet sich ein potentielles *coiled-coil*-Motiv, das teilweise mit einem Di-Leucin-Motiv überlappt, gefolgt von einem Serin-Cluster, das bis zum Ende des C-Terminus reicht.



Abb. 4: Schematische Darstellung des Endothelins und des Endothelin-B-Rezeptors. A: Endothelin-1 (ET1) ist im Einbuchstabencode dargestellt. Zwischen den Aminosäuren C1/C15 und C3/11 sind Disulfidbrücken ausgebildet. B: Der ET_B-Rezeptor ist schematisch dargestellt. Der N-Terminus (NT) sowie die drei extrazellulären Schleifen (ES 1, ES 2 und ES 3) befinden sich extrazellulär. Die drei intrazellulären Schleifen (IS 1, IS 2 und IS 3) und der C-Terminus (CT) sind intrazellulär lokalisiert, wobei der C-Terminus über eine Palmitylierungsstelle in der Plasmamembran verankert ist. C: Darstellung der 7. Transmembrandomäne und des C-Terminus im Einbuchstabencode. Farblich hervorgehoben sind das potentielle *coiledcoil*-Motiv (blau), das Tyrosin-Motiv (orange), das Serin-Cluster (grün) und ein Tyrosin (rot).

1.6 Zielsetzung

Es Internalisierungsverhalten ist bekannt. dass das der beiden Endothelinrezeptoren (ET_A- und ET_B-Rezeptor) nach ET1-Stimulation sehr unterschiedlich ist. Während der ET_B-Rezeptor lysosomal abgebaut wird, folgt der ET_A-Rezeptor einem recycling-Prozess und wird zurück in die Plasmamembran transportiert. Diese sehr unterschiedlichen Internalisierungswege müssen ihre Ursache in spezifischen Proteinmotiven intrazellulärer Rezeptorbereiche haben. Während für den ET_A-Rezeptor ein solches Motiv im C-Terminus identifiziert wurde (Paasche et al. 2005), war für den ET_B-Rezeptor diesbezüglich wenig bekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, Motive bzw. Sequenzbereiche im C-Terminus des ET_B -Rezeptors zu identifizieren und zu analysieren, die für die Internalisierung zuständig sind. Dabei stand zunächst der zeitliche Verlauf der Internalisierung im Vordergrund der Untersuchungen. Des Weiteren sollten Interaktionspartner analysiert werden, die bei anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren für die Internalisierung relevant sind. Außerdem sollten neue Interaktionspartner identifiziert und analysiert werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Tab. 1: Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Reagenz	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Agar-Agar	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Agarose	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
APS (Ammoniumperoxysulfat)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin Natriumsalz	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aprotinin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bacitracin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Benzamidin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cacodylsäure Natriumsalz-3-Hydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Coomassie Brilliant Blau R-250	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cy3.5 monoreaktiver Succinimidylester	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England
Di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMEM (Dulbecco´s modified Eagle´s Medium)	Biochrom, Berlin, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
EGTA (Ethylendiamin-Glykol-bis-(β- Aminoethylether)-Tetraessigsäure)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Ethanol Ethidiumbromid Formamid, deionisiert **FuGENE 6** Geneticin (G418-Sulfat) Glukose Glutathion-Sepharose 4B Glycin Glycerin Hefeextrakt Igepal CA-630 IPTG (Isopropyl-β-Dthiogalaktopyranosid) Isopropanol (2-Propanol) Kalziumchlorid Kaliumchlorid Kaliumdihydrogenphosphat Kanamycin Lipofectamin Kälberserum L-Glutamin Lumi-Light Western Blot-Substrat Magermilchpulver Magnesiumchlorid-Hexahydrat Methanol Natriumacetat Natriumchlorid SDS (Natriumdodecylsulfat) Natriumhydroxid Nitrozellulosemembran (Optitran BA-S 85) Oligonukleotide OptiPrep

J. T. Baker, Deventer, Niederlande Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Roche Diagnostics, Basel, Schweiz Merck, Darmstadt, Deutschland AppliChem, Darmstadt, Deutschland Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England AppliChem, Darmstadt, Deutschland Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland AppliChem, Darmstadt, Deutschland Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

J. T. Baker, Deventer, Niederlande Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland J. T. Baker, Deventer, Niederlande Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland Biochrom, Berlin, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland Roche Diagnostics, Basel, Schweiz Néstle AG, Frankfurt, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland J. T. Baker, Deventer, Niederlande Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland AppliChem, Darmstadt, Deutschland Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland Biotez, Berlin, Deutschland Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Ortho-Phosphorsäure 85 % Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Ovalbumin Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Paraformaldehyd AppliChem, Darmstadt, Deutschland Penicillin G Biochrom, Berlin, Deutschland PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Polyethylenimin Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Propanol (1-Propanol) Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Protein A-Sepharose Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Rotiphorese Gel 30 Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Saccharose (D-Saccharose) Salzsäure AppliChem, Darmstadt, Deutschland Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Schwefelsäure Streptomycin Biochrom, Berlin, Deutschland TEMED Sigma-Aldrich, St. Louis, USA (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan AppliChem, Darmstadt, Deutschland Trypsin PAA Laboratories, Pasching, Österreich Trypsin-Inhibitor Typ I-S aus Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Sojabohnen Trypton Difco, Detroit, USA Tween 20 Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Wasserstoffperoxid Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Zitronensäure-Monohydrat Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.2 Enzyme und Antikörper

Tab. 2: Enzyme

Bezeichnung	Herkunft
Alkalische Phosphatase	New England Biolabs, Beverly, USA
Klenow DNA-Polymerase Fragment	New England Biolabs, Beverly, USA
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Beverly, USA
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Beverly, USA
<i>Taq</i> -Polymerase	New England Biolabs, Beverly, USA

Tab. 3: Antikörper

Bezeichnung	Herkunft
Anti-c-myc monoklonaler Antikörper (9E10)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Anti-FLAG monoklonaler Antikörper (M2)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Anti-GFP monoklonaler Antikörper (JL-8)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Peroxidase-konjugierter Donkey Anti- Mouse-Antikörper (F _{AB} Fragment)	Dianova, Hamburg, Deutschland
Peroxidase-konjugierter Donkey Anti- Rabbit-Antikörper (F _{AB} Fragment)	Dianova, Hamburg, Deutschland

2.1.3 Endothelin-Rezeptor-Liganden

Die Fluoreszenz-Markierung von ET1 erfolgte durch selektive Modifizierung der ε-Aminogruppe von Lysin an der Position 9 mit einem Cy3.5 monoreaktiven Succinimidylester in 0,1 M Natriumhydrogencarbonat (pH 9,3) und anschließender Aufreinigung über die Hochleistungsflüssigkeitschromatography (englisch: *high performance liquid chromatography*, HPLC).

Bezeichnung	Herkunft
AVP (Arginin Vasopressin)	FMP, Berlin
ET1	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden, Deutschland
Cy3.5-ET1	fluoreszenzmarkiertes ET1, FMP Berlin
¹²⁵ I-ET1 (2000 Ci/mmol)	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England

Tab. 4: Rezeptor-Liganden

2.1.4 Größenstandards und Kits

Tab. 5: DNA- und Proteingrößenstandards und kommerziell erhältliche Kits

Bezeichnung	Herkunft
DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England
GeneRuler [™] DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Lumi-Light Western Blot Substrat	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
QIAGEN [®] Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAEX [®] II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QuikChange [®] Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Precision Plus Protein [™] Standard	Bio-Rad, München, Deutschland

2.1.5 Verwendete Organismen

2.1.5.1 *E. coli-*Stämme

Tab. 6: *E. coli*-Stämme

Bezeichnung	Genetische Marker	Herkunft
<i>E. coli</i> BL21	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 lac [F'proAB lacl ^q Z∆M15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene, La Jolla, USA
<i>E. coli</i> XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacl ^q Z∆M15 <i>Tn</i> 10 (Tet ^r)]	Stratagene, La Jolla, USA

2.1.5.2 Eukaryontische Zelllinien

Bezeichnung	Merkmale	Herkunft
HEK 293	Human embryonic kidney cells, immortalisiert durch Adenovirus Typ 5	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
MEF-arr2 ^{-/-} /arr3 ^{-/-}	Mouse embryonic fibroblasts, knockout der Gene <i>arr</i> 2 und <i>arr</i> 3	Lefkowitz, Durham, USA
MEF-arr3 ^{-/-}	Mouse embryonic fibroblasts, knockout des Gens <i>arr3</i>	Lefkowitz, Durham, USA
MEF-WT	Wildtyp für MEF-arr3 ^{-/-} und MEF-arr2 ^{-/-} /arr3 ^{-/-}	Lefkowitz, Durham, USA

2.1.6 Klonierungsvektoren und Plasmide

2.1.6.1 Klonierungsvektoren *E. coli*

Tab. 8: Klonierungsvekto	oren
--------------------------	------

Vektor	Resistenz	Herkunft
pcDNA3.1	Ampicillin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pECFP-N1	Kanamycin	Clontech, Mountain View, USA
pEGFP-N1	Kanamycin	Clontech, Mountain View, USA
pEYFP-N1	Kanamycin	Clontech, Mountain View, USA
pGex-4T-3	Ampicillin	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England

2.1.6.2 Plasmide

Tab.	9: Übersicht	über rekombin	ante Plasmide

Plasmid	Vektor	Funktionelle	Herkunft
		Bereiche	
pcDNA3::ET _B .flag	pcDNA3	ET _B R-flag, Amp ^r	Dr. Alexander Oksche, Institut für Pharmakologie, FU Berlin
pcDNA3::V ₂ .flag	pcDNA3	V ₂ R-flag, Amp ^r	Isabell Schwieger, Institut für Pharmakologie, FU Berlin
pEGFP::Arrestin3	pEGFP	Arrestin3, Kan ^r	Dr. Nigel Bunnet, San Francisco, USA
pEGFP::ET _B .flag	pEGFP-N1	ET _B R-flag, Kan ^r	Dr. Alexander Oksche, Institut für Pharmakologie, FU Berlin
pGEX::IS3.V ₂	pGEX-4T-3	IS 3 V ₂ R	Sabine Kaschner, Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie, Berlin
pGEX::CT.V ₂	pGEX-4T-3	CT V₂R	Sabine Kaschner, Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie, Berlin

pK44A.Dynamin	pBR322	K44A.Dynam in, Amp ^r	Dr. Sandra L. Schmid, La Jolla, USA
pRCDN2.N <i>myc</i>	pcDNA1.Neo	V₂R-c-myc, Kan ^r	Dr. Ricardo Hermosilla, Institut für Pharmakologie, FU Berlin

Tab. 10: Übersicht der in dieser Arbeit konstruierten Plasmide

Plasmid	Vektoranteil	Genprodukt	Herkunft
pEGFP::AAXXA.ET _B .flag	pEGFP-N1	ET _B R.flag	diese Arbeit
pEGFP::V54D.Arrestin3	pEGFP-N1	Arrestin3	diese Arbeit
pEGFP::∆GYF.ET _B .flag	pEGFP-N1	ET _B R.flag	diese Arbeit
pGEX-4-T3::IS3.ET _A	pGEX-4T-3	IS 3 ET _A R	diese Arbeit
pGEX-T-T3::IS3.ET _B	pGEX-4T-3	IS 3 ET _B R	diese Arbeit
pGEX-4-T3::CT.ET _A	pGEX-4T-3	C-Terminus ET_AR	diese Arbeit
pGEX-4-T3::CT.ET _B	pGEX-4T-3	C -Terminus ET_BR	diese Arbeit
pEGFP::GAXXF.ET _B .flag	pEGFP-N1	ET _B R.flag	diese Arbeit
pEGFP::S2A.ET _B .flag	pEGFP-N1	S435,436A.ET _B .flag	diese Arbeit
pEGFP::S2D.ET _B .flag	pEGFP-N1	S435,436D.ET _B .flag	diese Arbeit
pEGFP::S3A.ET _B .flag	pEGFP-N1	S440-442A.ET _B .flag	diese Arbeit
pEGFP::S3D.ET _B .flag	pEGFP-N1	S440-442D.ET _B .flag	diese Arbeit
pEGFP::S5A.ET _B .flag	pEGFP-N1	S435,436,440- 442A.ET _B .flag	diese Arbeit
pEGFP::S5D.ET _B .flag	pEGFP-N1	S435,436,440- 442D.ET _B .flag	diese Arbeit
pEGFP::Y439A.ET _B .flag	pEGFP-N1	Y439A.ET _B .flag	diese Arbeit
pEGFP::Y439D.ET _B .flag	pEGFP-N1	Y439D.ET _B .flag	diese Arbeit

pEGFP::cc1.ET _B .flag	pEGFP-N1	L414/421A.ET _B .flag	diese Arbeit
pEGFP::cc2.ET _B .flag	pEGFP-N1	E410/K411A.ET _B .flag	diese Arbeit

2.1.7 Oligonukleotide

2.1.7.1 Primer zur Sequenzierung

Primer	Sequenz (5' \rightarrow 3')
ETA-S1	GCAACTCTGCTCAGGATC
ETA-S1 rev	GATCCTGAGCAGAGTTGC
ETA-S2	GTAACTGCCATTGAAATT
ETA-S2 rev	AATTTCAATGGCAGTTAC
ETA-S3	GCAGCGTCGAGAAGTGG
ETA-S3 rev	CCACTTCTCGACGCTGC
ETA-S4	GTCTGATGACCTCGGTC
ETA-S4 rev	GACCGAGGTCATCAGAC
ETB-S1	CCGTGCCAAGGACCCATC
ETB-S1 rev	GATGGGTCCTTGGCACGG
ETB-S2	GGAATCACTGTGCTGAG
ETB-S2 rev	CTCAGCACAGTGATTCC
ETB-S3	GACCTGTGAAATGTTGAG
ETB-S3 rev	CTCAACATTTCACAGGTC
ETB-S4	GGTGAGCAAAAGATTCAA
ETB-S4 rev	TTGAATCTTTTGCTCACC
GST for	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
GST rev	CCGGGAGCTGCATGTGCAGAGG
GFP 3'	CTTGTGGCCGTTTACGTCGCCGTCCAG
GFP 5'	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGG
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG

Tab. 11: Sequenzierprimer

TAATACGACTCACTATAGGG

2.1.7.2 Primer zur Klonierung

Tab. 12: Klonierungsprimer	
----------------------------	--

Primer	Sequenz (5' \rightarrow 3')	eingefügte Schnittstelle
ET-Xhol 3'rev	GCTCACCATG <u>CTCGAG</u> ACCCGGTGGAT	Xhol
ETA_IL3_EcoRI F	CACCCTCAT <u>GAATTC</u> TGAGATGTTGAAC	<i>Eco</i> RI
ETA_IL3_Xhol R	GAAAACTGTTTT <u>CTCGAG</u> TTCTCGACG	Xhol
ETB_IL3_EcoRI F	GCATTTTTTTATACACTAAT <u>GAATTC</u> TG AAATGTTGAG	<i>Eco</i> RI
ETB_IL3_Xhol R	CAAAAGACGGTTTT <u>CTCGAG</u> TTCCCG TCTCTG	Xhol

2.1.7.3 Mutageneseprimer

Tab.	13:	Mutagen	eseprimer
------	-----	---------	-----------

Primer	Sequenz (5' \rightarrow 3')	Aminosäureausstausch
ETB_S435,436D for	GACAACTTCCGT <u>GACGAT</u> AA TAAATACAGC	S435,436D im ET_BR
ETB_S435,436D rev	GCTGTATTTATT <u>ATCGTC</u> AC GGAAGTTGTC	S435,436D im ET_BR
ETB_Y(A) for	GATCACGGA <u>GCT</u> GACAAC TTC	Y430A im ET_BR
ETB_Y(A) rev	GAAGTTGTC <u>AGC</u> TCCGTG ATC	Y430A im ET_BR
ETB_S440-442D for	CAGTAATAAATAC <u>GACGAC</u> <u>GAC</u> GATCCACCGGTC	S440-442D im ET_BR
ETB_S440-442D rev	GACCGGTGGATC <u>GTCGTC</u> <u>GTC</u> GTATTTATTACTG	S440-442D im ET_BR

ETB_S435,436,440-	GACAACTTCCGT <u>GACGAT</u>	S435,436,440-442D
442D for	AATAAATAC <u>GACGACGAC</u>	im ET _B R
	GATCCACCGGTC	
ETB_S435,436,440-	GACCGGTGGATC <u>GTCGTC</u>	S435,436,440-442D
442D rev	<u>GTC</u> GTATTTATT <u>ATCGTC</u> A	im ET _B R
	CGGAAGTTGTC	
ETB_Y439D for	CGTTCCAGTAATAAA <u>GAC</u> A	Y439D im ET _B R
	GCTCATCGGATCC	
ETB_Y439D rev	GGATCCGATGAGCT <u>GTC</u> TT	Y439D im ET _B R
	TATTACTGGAACG	
ETB_L414/421A for	GAAAAACAGTCC <u>GCG</u> GAGG	L414/421A im ET_BR
	AAAAGCAGTCGTGC <u>GCA</u> AA	
	GTTCAAAGC	
ETB_L414/421A rev	GCTTTGAACTT <u>TGC</u> GCACG	L414/421A im ET_BR
	ACTGCTTTTCCTC <u>CGC</u> GGA	
	CTGTTTTTC	
ETB_E410/K411A	CAGTCATTTGAA <u>GCAGCA</u> C	E410/K411A im ET_BR
for	AGTCCTTGGAG	
ETB_E410/K411A	CTCCAAGGACTG <u>TGCTGC</u> T	E410/K411A im ET_BR
rev	TCAAATGACTG	
V54D-Arrestin3 for	GGTGTGGTGCTT <u>GTG</u> GATC	V54D im Arrestin3
	CTGACTAC	
V54D-Arrestin3 rev	GTAGTCAGGATC <u>CAC</u> AAGC	V54D im Arrestin3
	ACCACACC	

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur und Transfektion

2.2.1.1 Kultivierung von HEK293- und MEF-Zellen

Die Kultivierung der HEK293- und der MEF-Zellen (MEF, *mouse embryonic fibroblasts*) erfolgte in DMEM-Medium, dem 10 % (v/v) Kälberserum, 10 Units/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycinsulfat zugesetzt wurde. Konfluent gewachsene Zellen wurden mit PBS-Puffer (37°C) gewaschen und mit 2 ml Trypsin-Lösung (37°C) 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in einem entsprechenden Volumen DMEM-Medium (37°C) aufgenommen. Nach Auszählung der Zellen mit einer Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen in der gewünschten Zellzahl ausgesät (1 · 10⁶ Zellen/9cm-Schale, 1 · 10⁵ Zellen/3,5cm-Schale, 0,4 · 10⁵ Zellen/Well einer 96-Well-Platte). Für die Mikroskopie erfolgte die Aussaat der Zellen auf Glasplättchen. Die Inkubation erfolgte in einem CO₂-begasten Brutschrank (5 % (v/v) CO₂) bei 37°C.

PBS-Puffer:

137 mM Natriumchlorid (NaCl), 2,7 mM Kaliumchlorid (KCl), 1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄), 8 mM Di-Natriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄), pH 7,4

2.2.1.2 Transfektion

Transiente Transfektion:

Die transiente Transfektion von HEK293- und MEF-Zellen mit FuGENE 6 erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Plasmid-DNA (0,5 µg pro 3cm-Schale und 3 µg pro 9cm-Schale) wurde in Serum- und Antibiotika-freiem DMEM-Medium verdünnt. FuGENE 6 wurde ebenfalls in Serum- und Antibiotika-freiem DMEM-Medium verdünnt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die DNA-Lösung dazu pipettiert wurde. Das Gemisch aus FuGENE 6 und DNA inkubierte für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur und wurde dann auf die Zellen, die 24 Stunden zuvor ausgesät wurden, getropft. Nach 24–36 Stunden konnten die Zellen analysiert werden.

Stabile Transfektion:

Die stabile Transfektion von HEK293-Zellen erfolgte mit Lipofectamin. Dazu wurden 200.000 Zellen in eine 6cm-Schale ausgesät. Am nächsten Tag wurden 2 µg Plasmid-DNA und 7,5 µl Lipofectamin in jeweils 100 µl Serumund Antibiotika-freiem DMEM-Medium verdünnt und gemischt. Es folgte ein Inkubationsschritt für 20 Minuten bei Raumtemperatur. In der Zwischenzeit wurden die Zellen zweimal mit Serum- und Antibiotika-freiem DMEM gewaschen, bevor das Gemisch aus DNA und Lipofectamin auf die Zellen getropft wurde. Nach 6 Stunden Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEM, das zusätzlich 10 % (v/v) Kälberserum, 10 Units/ml Penicillin und 10 µg/ml Streptomycin enthielt. Nach 2–3 Tagen wurden die Zellen gesplittet und in Selektivmedium (mit 400 µg/ml G418) kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2–3 Tage. Nach 10 Tagen wurden resistente Zellklone mit einem sterilen Wattestäbchen in 24-well-Platten überführt. Die Überprüfung der stabilen Zellklone erfolgte durch Bindungsexperimente und/oder Fluoreszenzmikroskopie.

2.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellklonen

Zellen wurden mit PBS-Puffer gewaschen und trypsiniert (siehe 2.2.1.1). Das Zellpellet wurde nach einer Zentrifugation (1000 x g, 5 Minuten, Raumtemperatur) in DMEM-Medium mit 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid resuspendiert und in Kryo-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden graduell abgekühlt (2 Stunden bei –20°C, über Nacht bei –80°C) und danach in

flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen bei 37°C erwärmt. Die Überführung der Zellsuspension erfolgte direkt in eine Zellkulturflasche mit Zellkulturmedium (DMEM mit 10 % (v/v) Kälberserum).

2.2.2 Kultivierung und Konservierung von E. coli-Stämmen

Die Anzucht von *Escherichia coli (E. coli)* erfolgte in LB-Medium bzw. auf LB-Agarplatten bei 37°C. Zur Stammhaltung wurden 850 µl einer Übernachtkultur mit 150 µl Glycerin versetzt und bei –80°C gelagert. Die Kulturmedien wurden 20 Minuten bei 120°C autoklaviert.

LB-Medium:

1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 170 mM NaCl, pH 7,0

LB-Agarplatten:

1,5 % (w/v) Agar-Agar in LB-Medium

2.2.2.1 Antibiotika und andere Mediumzusätze

Substanz	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml
IPTG	100 mM in H_2O	1 mM
Kanamycin	30 mg/ml in H_2O	30 µg/ml

Tab. 14: Mediumzusätze

2.2.3 Herstellung kompetenter Bakterien

Eine Übernachtkultur wird 1:100 in 100 ml LB-Medium umgesetzt und anschließend bei 37°C im Schüttler inkubiert. Bei einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,4 bis 0,6 wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (5000 x g, 20 Minuten, 4°C). Nach Resuspension des Bakterienpellets in 30 ml einer eiskalten 100 mM CaCl₂-Lösung und anschließender Inkubation für 30 Minuten bei 4°C wurde erneut zentrifugiert (5000 x g, 20 Minuten, 4°C). Das Bakterienpellet wurde in 4 ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert, mit 940 µl Glycerin versetzt und in Aliquots bei –80°C gelagert.

2.2.4 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Ein Aliquot kompetenter Bakterienzellen wurde auf Eis aufgetaut und anschließend mit ca. 1 µg Plasmid-DNA für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Es folgte ein Inkubationsschritt für 2 Minuten bei 42°C. Nach weiteren 5 Minuten bei 4°C wurden 500 µl SOC-Medium zu den Zellen pipettiert und anschließend für 45 Minuten bei 37°C im Schüttler inkubiert. Von dieser Kultur wurden 100 µl auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

SOC-Medium:

2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 20 mM Glukose, 10 mM Magnesiumchlorid-Hexahydrat, 8,5 mM Natriumchlorid, 2,5 mM Kaliumchlorid, pH 7,0

Das Medium wurde sterilfiltriert und in Aliquots bei –20°C gelagert.

2.2.5 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mit dem QIAprep[®] Spin Miniprep Kit oder dem QIAGEN[®] Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen nach den Anweisungen des Herstellers.

2.2.6 Spaltung der DNA mit Restriktionsenzymen

Für die Spaltung von Plasmid-DNA wurden die Anweisungen des Herstellers befolgt. Standardmäßig erfolgte die Spaltung von ca. 1 µg Plasmid-DNA in einem Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 20 µl, der ca. 5 Units Restriktionsenzym enthielt. Die Inkubation erfolgte bei optimaler Temperatur der Enzyme (meist 37°C) für 30 Minuten bis zwei Stunden. Dem Reaktionsansatz wurde 1/10 Volumenteile Stopppuffer zugesetzt und anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt.

Stopppuffer:

10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA , 25 % (w/v) Saccharose, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, pH 8,0

2.2.7 Generierung von *blunt ends* bei linearen DNA-Fragmenten

Zur Generierung kompatibler Enden nach Restriktionsspaltung mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen wurden die Enzymaktivitäten des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I genutzt. Die Reaktion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden überhängende 3'-Enden durch die 3'-5'-Exonukleaseaktiviät entfernt. Für die Auffüllreaktion von 5'-Überhängen wurde die 5'-3'-Polymeraseaktivität dieses Enzyms ausgenutzt. Der Reaktionsansatz enthielt dann zusätzlich 33 µM eines dNTP-Gemisches (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung des Enzyms (20 Minuten bei 85°C) gestoppt. Die DNA-Fragmente wurden nach Auftrennung in einem Agarosegel und anschließender Extraktion einer Ligationsreaktion zugeführt.

2.2.8 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zur Verringerung der Religationsrate eines Vektor-DNA-Fragmentes während einer Ligationsreaktion erfolgte eine Dephosphorylierungsreaktion. Dem Restriktionsansatz wurde 1 Unit Alkalische Phosphatase zugesetzt und nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37°C erfolgte eine DNA-Auftrennung in einem Agarosegel mit anschließender Fragmentisolierung.

2.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Während der Ligationsreaktion wurden zwei lineare DNA-Fragmente durch die T4-DNA-Ligase miteinander verknüpft. Der Reaktionsansatz enthielt 1/10 Volumenteile 10fach-Ligationspuffer, eluierte DNA-Fragmente und Vektor-DNA im abgeschätzten molaren Verhältnis von 2:1 und 1 Unit des Enzyms. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C. Die entstandene ringförmige DNA wurde anschließend in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

2.2.10 Fällung der DNA

Die DNA-Lösung wurde auf ein Volumen von 100 µl mit sterilem bidest. Wasser aufgefüllt und mit 5 µl 5 M Natriumchlorid-Lösung versetzt. Nach Zugabe von 70 µl Isopropanol wurde der Ansatz gut gemischt und
anschließend für 20 Minuten bei $13000 \times g$ in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Es folgte ein Waschschritt durch Zugabe von 400 µl 70-prozentigem Ethanol und nach erneuter Zentrifugation für 5 Minuten bei 13000 x g wurde das DNA-Pellet getrocknet und in einem entsprechenden Volumen bidest. Wasser aufgenommen.

2.2.11 DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Absorption bei 260 nm gemessen. Dabei entsprechen 50 µg DNA einer optischen Dichte von eins. Zur Beurteilung der Reinheit der DNA erfolgte gleichzeitig die Messung der Absorption bei 280 nm. Der Quotient aus 260 nm und 280 nm sollte dann bei 1,8 liegen.

2.2.12 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde mit 0,8- bis 2-prozentigen horizontalen Agarosegelen durchgeführt und diente der Auftrennung von DNA in einem elektrischen Feld. Die Agarose wurde in entsprechender Konzentration in TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Die DNA-Probe wurde mit 1/10 VT Stopppuffer versetzt. Die Gelelektrophorese wurde in TAE-Puffer bei 100 V für ca. 45 Minuten durchgeführt. Anschließend erfolgte die Färbung des Agarosegels für 5 Minuten in einem Ethidiumbromidbad (10 mg/ml Ethidiumbromid-Stammlösung 1:10000 in bidest. Wasser) und anschließend die Visualisierung/Dokumentation unter UV-Licht.

TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0 Stopppuffer:

10 mM Tris-HCI, 1mM EDTA, 25 % (w/v) Saccharose, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, pH 8,0

2.2.13 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach elektrophoretischer Trennung von DNA-Fragmenten in einem Agarosegel und anschließender Färbung in einem Ethidiumbromidbad (siehe 2.2.12) wurde die entsprechende DNA-Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Die Isolierung der DNA aus dem Agarosegel erfolgte mit dem QIAEX[®] II Gel Extraction Kit der Firma Qiagen gemäß den Herstellerangaben.

2.2.14 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte mit dem DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England).

Reaktionsansatz: 2 μl Plasmid-DNA (250 ng/μl) 1 μl Primer (5 μM) 2,5 μl ET-Mix PCR-Programm: 25 Zyklen 20 sek 95°C 15 sek 52°C 60 sek 60°C

Im Anschluss an die PCR erfolgte die Fällung der DNA. Dazu wurde der Reaktionsansatz auf 10 µl mit bidest. Wasser aufgefüllt, mit 1 µl eines Natriumacetatpuffers (1,5 M Natriumacetat, 250 mM EDTA, pH 5,3) und 20 µl Ethanol versetzt und für 15 Minuten bei 13000 x g zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 300 µl 70-prozentigem Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation für 5 Minuten bei 13000 x g getrocknet. Nach Zugabe von 4,5 µl 50 mM EDTA/Formamid (1:5) folgte ein Inkubationsschritt von 2 Minuten bei 90°C und anschließend der Probenauftrag auf ein Sequenziergel.

2.2.15 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion wird eine spezifische Amplifikation einer DNA-Sequenz erzielt. Dabei wird ein Zyklus bestehend aus Denaturierung, Primer-Hybridisierung und schließlich die durch die thermostabile *Taq*-DNA-Polymerase (aus Thermophilus aquaticus) **DNA-Polymerisation** durchlaufen. katalysierte mehrmals Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

PCR-Ansatz : 1 µl Plasmid-DNA (50 ng/µl)

1 μl dNTPs (je 10 μM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
1 μl 5'-Primer (10 μM)
1 μl 3'-Primer (10 μM)
5 μl 10fach-PCR-Puffer
2,5 Units *Taq*-DNA-Polymerase
auf 50 μl mit bidest. Wasser aufgefüllt

Die Reaktion erfolgte in einem PCR-Gerät (Trio-Thermoblock, Biometra, Deutschland). Wenn nicht anders erwähnt, wurde folgendes Standard-Programm benutzt.

Temperatur	Zeit in min Zyklusanzah	
94°C	3	
94°C	0,5	
55°C	0,5	35
72°C	1	
72°C	7	
4°C	Pause	

Tab. 15: PCR-Standardprogramm

2.2.16 Ortsgerichtete Mutagenese

Zur Einführung von Mutationen in Plasmid-DNA wurde mit dem QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, USA) gearbeit. Dazu wurden komplementäre Primer genutzt, die die entsprechende Mutation tragen. Die Mutation wurde über die Primer während einer PCR in die amplifizierte DNA eingebaut. Anschließend erfolgte eine Restriktionsspaltung mit Enzym *Dpn*I für 1 Stunde bei 37°C, bei der die methylierte, eingesetzte Plasmid-DNA gespalten wurde. Die während der PCR polymerisierte, nichtmethylierte DNA wurde in kompetente *E. coli* XL-1 Blue Zellen transformiert. Dafür wurden 100 µl kompetente Zellen mit 4 µl PCR-Ansatz versetzt und für 30 Minuten bei 4°C, anschließend für 90 Sekunden bei 42°C inkubiert und dann wieder auf 4°C abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium (siehe 2.2.4) und Inkubation für 45 Minuten bei 37°C im Schüttler wurde die Zellsuspension auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert.

PCR-Ansatz: 1 μl Plasmid-DNA (30 ng/μl) 5 μl 10fach-PCR-Puffer 1 μl 5'-Primer (10 μM) 1 μl 3'-Primer (10 μM) 1 μl dNTP-Gemisch 40,5 μl H₂O 0,5 μl *Pfu*-Turbo DNA-Polymerase

-	Temperatur	Zeit in min	Anzahl der Zyklen
	95°C	1	
	95°C	0,5)	
	55°C	1	≻ 18
	68°C	20 🚽	
	4°C	Pause	

PCR-Programm:

Tab. 16: PCR-Programm für Mutagenese

*Dpn*I-Verdau: Zugabe von 4 μl H₂O, 0,5 μl 10fach-PCR-Puffer, 0,5 μl *Dpn*I zum PCR-Ansatz

2.2.17 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden denaturierte Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel nach ihrer molekularen Masse im elektrischen Feld getrennt. Es wurde das Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis System der Firma Biorad verwendet. Die Proteinproben wurden in 4fach-Lämmlipuffer aufgenommen und anschließend für 3 Minuten bei 95°C inkubiert, um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu gewährleisten. Eine Ausnahme stellen Proben des ET_B-Rezeptors dar. Da der Rezeptor bei 95°C Komplexe bildet, erfolgte für diese Proben ein Inkubationsschritt für 30 Minuten bei 42°C. Die Elektrophorese erfolgte in Laufpuffer bei 20 mA pro Gel, bis die Bromphenolblaubande die untere Gelkante erreichte (ca. 1 h 15 Minuten). Das Gel wurde dann entweder einer Coomassie-Färbung (siehe 2.2.18) unterzogen oder auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend in einem Immunoblot analysiert (siehe 2.2.19).

	Sammelgel (4-prozentig)	Trenngel (10-prozentig)
Acrylamid/Bisacrylamid	0,66 ml	3,3 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,0	-	2,5 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,26 ml	-
20 % (w/v) SDS	25 µl	50 µl
10 % (w/v) APS	25 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl
bidest. Wasser	3 ml	4 ml

Tab. 17: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele

Acrylamid/Bisacrylamid:

Rotiphorese Gel 30

4fach-Lämmlipuffer:

250 mM Tris, 20 % (v/v) Glycerin, 4 % (w/v) SDS, 2% (w/v) Bromphenolblau, 10 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, pH 6,8

Laufpuffer:

25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS

2.2.18 Coomassie-Färbung

Zum Anfärben von Proteinbanden in einem Proteingel wurde dieses nach der Gelelektrophorese 20 Minuten in einer Coomassie-Färbelösung und anschließend in Entfärbelösung inkubiert, wobei die Entfärbelösung solange gewechselt wurde, bis die Proteinbanden die gewünschte Intensität aufwiesen.

Coomassie-Färbelösung:

1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250, 10 % (v/v) Essigsäure, 45 % (v/v) Methanol Entfärbelösung:

10 % (v/v) Essigsäure, 45 % (v/v) Methanol

2.2.19 Immunoblot

Die Proteine in einem Proteingel wurden nach der Gelelekrophorese unter Verwendung einer Nassblot-Apparatur (Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad, München, Deutschland) auf eine Nitrozellulosemembran (Optitran BA-S 85, Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland) transferiert. Dabei wurden die Angaben des Herstellers beachtet. Der Transfer erfolgte in Transferpuffer bei 100 mA pro Gel für 90 Minuten (Netzteil: PowerPac 200, Bio-Rad, München). Die Nitrozellulosemembran wurde dann für 60 Minuten in Magermilchpuffer auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation des in Magermilchpuffer verdünnten primären Antikörpers für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder ü. N. bei 4°C. Nach drei Waschschritten von jeweils 10 Minuten mit TBST-Puffer wurde die Membran mit dem sekundären Peroxidase-gekoppelten Antiköper (1:2000 in Magermilchpuffer verdünnt) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten mit TBST-Puffer erfolgte die Inkubation mit dem Peroxidasesubstrat (Lumi-Light Western Blot-Substrat) für 1 Minute und anschließend wurde die Detektion der Signale mit einem Röntgenfilm oder mit dem Lumi-Imager F1 (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz) vorgenommen.

Magermilchpuffer:

4 % (w/v) Magermilch in TBST-Puffer

TBST-Puffer (tris buffered saline tween): 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20, pH 7,5

Transferpuffer:

24 mM Tris, 190 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,015 % (w/v) SDS

2.2.20 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Kalibrierkurve wurden 50 µl Ansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ovalbumin hergestellt (20, 40, 100, 200 400 und 800 µg/ml). Als Leerwert dienten 50 µl bidest. Wasser. Je 5 µl der zu untersuchenden Proteinprobe wurden mit 45 µl bidest. Wasser verdünnt. Nach Zugabe von 50 µl einer 2 N NaOH-Lösung folgte ein Inkubationsschritt für 10 Minuten bei 60°C. Es folgten die Zugabe von 1 ml CBB-Lösung und die photometrische Bestimmung der Absorbtion bei 595 nm (Photometer, Pharmacia, Freiburg).

CBB-Lösung (Coomassie Brilliant Blau-Lösung):

0,001 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G-250, 4,25 % (v/v) Ethanol 95 %, 8,5 % (v/v) Ortho-Phosphorsäure 85 %

2.2.21 Überexpression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Die Überexpression von GST-Fusionsproteinen erfolgte in dem *E. coli*-Stamm BL21, da die Expression von Proteinen unter Kontrolle eines *lac*-Promotors durch Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG) gezielt induziert werden kann. Eine ÜN-Kultur wurde 1:100 in 25 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin verdünnt und für ca. 3 Stunden im Schüttler bei 37°C inkubiert. Bei einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,5 bis 0,7 erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG die Induktion der Expression. Nach 30 Minuten wurden die Zellen sofort auf Eis abgekühlt und bei 4000 x g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 2 ml PBS-I (PBS-Puffer mit Zusatz von Proteaseinhibitoren) resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit Ultraschall (Sonopuls HD 2070, Bandelin Electronics, Berlin). Es folgte eine Zentrifugation bei 13000 x g für 20 Minuten bei 4°C, um Zelltrümmer und noch intakte Zellen zu pelletieren. Der Überstand, der die lösliche Fraktion des Bakterienlysats darstellte, wurde mit 100 µl einer 50prozentigen Glutathion-Sepharoselösung versetzt und für 30 Minuten bei 4°C auf dem Rotator inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Bindung der GST-Fusionsproteine an die Glutathion-Sepharose. Es folgten drei Waschschritte. Dafür wurde die Sepharose-Suspension jeweils für 60 Sekunden bei 13000 x g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml PBS-Puffer resuspendiert. Das gewaschene Sepharosepellet wurde entweder in einem GST-Pulldown-Experiment eingesetzt oder mit 2fach-Lämmlipuffer versetzt, um direkt in einer SDS-PAGE (siehe 2.2.17) analysiert zu werden.

PBS-Puffer:

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,0 mM Na₂HPO₄, pH 7,4

2fach-Lämmlipuffer:

62,5 mM Tris-HCl, 2 % (w/v) SDS, 25 % (w/v) Glycerin, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8

2.2.22 GST-Pulldown

Es wurde ein Zelllysat aus HEK293-Zellen hergestellt. Nachdem die Zellen zweimal mit kaltem PBS-Puffer gewaschen wurden, erfolgte die Zugabe von 1,2 ml Lysispuffer pro Zellkulturschale (Durchmesser 9 cm) und anschließend ein Inkubationsschritt von 30 Minuten bei 4°C auf einem Horizontalschüttler. Das Zelllysat wurde danach für 30 Minuten bei 13000 x g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit aufgereinigtem, immobilisiertem GST-Fusionsprotein (siehe 2.2.21) für vier Stunden oder ü. N. bei 4°C auf dem Rotator inkubiert. Zum Waschen erfolgte eine Zentrifugation bei 13000 x g für 60 Sekunden, der Überstand wurde verworfen und das Sepharosepellet in 1 ml Lysispuffer resuspendiert. Dieser Waschschritt wurde zweimal wiederholt. Nach dem letzten Waschschritt wurde das Sepharosepellet mit einer Laborspritze (Hamilton Bonaduz, Bonaduz. Schweiz) trocken gesaugt 2fach-Lämmlipuffer und in

aufgenommen. Anschließend erfolgte eine SDS-PAGE (siehe 2.2.17) und die Detektion spezifischer Proteine im Immunoblot (siehe 2.2.19).

2fach-Lämmlipuffer:

62,5 mM Tris-HCl, 2 % (w/v) SDS, 25 % (w/v) Glycerin, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8

Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren:

50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 % (v/v) Igepal CA-630, 1 mM EDTA, Proteaseinhibitoren (0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 0,5 mM Benzamidin, 3,2 μg/ml Trypsininhibitor, 1,4 μg/ml Aprotinin), pH 7,4

PBS-Puffer:

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,0 mM Na₂HPO₄, pH 7,4

2.2.23 Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (Elisa)

Die Zellaussaat transient oder stabil transfizierter HEK293-Zellen erfolgte in Zellkultur-Platten (96-well, 40000 Zellen pro well). Am nächsten Tag wurden die Zellen für verschiedene Zeiten mit 50 nM ET1 in Serum- und Antibiotikafreiem DMEM stimuliert, anschließend mit kaltem PBS-Puffer gewaschen und mit Fixierpuffer für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-Puffer erfolgte die Inkubation des PODgekoppelten M2-Anti-flag-Antikörpers (1:2000 verdünnt, Sigma-Aldrich) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden erneut zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Dann wurden 5 µl Substratlösung mit 95 µl Substratpuffer verdünnt und auf die Zellen pipettiert. Nach 10–15 Minuten Inkubation erfolgte das Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 100 µl Stopplösung. Anschließend wurde die Adsorption bei 450 nm in einem Mikroplatten-Photometer (BioTek Instruments, Winooski, USA) vermessen.

Fixierpuffer:

4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS-Puffer

PBS-Puffer:

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,0 mM Na₂HPO₄, pH 7,4

Substrat:

13,38 M Propanol, 20 mM 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)

Substratpuffer:

200 mM Zitronensäure-Monohydrat, 200 mM Di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, 0,003 % (v/v) Wasserstoffperoxid

Stopplösung:

1,5 M Schwefelsäure

2.2.24 Immunopräzipitation

HEK 293-Zellen wurden in 9cm-Zellkulturschalen ausgesät und nach 24 h transient transfiziert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS-Puffer gewaschen. Es folgte die Zugabe von 1,2 ml Lysispuffer und eine Inkubation für 30 Minuten bei 4°C auf dem Horizontal-Schüttler schloss sich an. Nach einem Zentrifugationsschritt für 30 Minuten bei 13000 x g bei 4°C wurde ein Aliquot von 50 µl mit gleichem Volumen 2fach-Lämmlipuffer versetzt und diente als Expressionskontrolle in einem Immunoblot. Das restliche Zelllysat inkubierte mit 5 mg in Lysispuffer vorgequellter Protein A-Sepharose und ca. 3–5 µg primärem Antikörper ü. N. bei 4°C im Rotator. Es folgten drei Waschschritte. Dazu wurde der Überstand nach 1-minütiger Zentrifugation bei 13000 x g verworfen, mit 1 ml Lysispuffer gewaschen und nach dem letzten Zentrifugationsschritt das Sepharosepellet mit der Laborspritze (Hamilton Bonaduz, Bonaduz, Schweiz) trocken

gesaugt. Das Pellet wurde in 2fach-Lämmlipuffer aufgenommen Es folgten die Auftrennung in einer SDS-PAGE (siehe 2.2.17) und die Analyse in einem anschließenden Immunoblot (siehe 2.2.19).

2fach-Lämmlipuffer:

62,5 mM Tris-HCl, 2 % (w/v) SDS, 25 % (w/v) Glycerin, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8

Lysispuffer:

50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 % (v/v) Igepal CA-630, 1 mM EDTA, Proteaseinhibitoren (0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 0,5 mM Benzamidin, 3,2 μg/ml Trypsininhibitor, 1,4 μg/ml Aprotinin), pH 7,4

PBS-Puffer:

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,0 mM Na₂HPO₄, pH 7,4

2.2.25 Bindungsassay

Die Bindungsexperimente zur Bestimmung der Bindungskonstanten (K_D) und der maximalen Bindungskapazität (B_{max}) von ET1 gegenüber dem ET_B-Rezeptor erfolgten mit Membranpräparationen transient transfizierter HEK293-Zellen. Die Puffer waren vorgekühlt und alle Schritte der Membranpräparation erfolgten bei 4°C. Zellen einer 9cm-Zellkulturschale wurden 36 Stunden nach der Transfektion mit zweimal 10 ml PBS-Puffer gewaschen, anschließend in 1,5 ml PBS-Puffer mit einem Zellschaber abgelöst. Nach einem Zentrifugationsschritt (400 x g, 5 Minuten, 4°C) erfolgte die Resuspension des Zellpellets in 2 ml Tris-BAME-Puffer. Der Zellaufschluss wurde mit einem Homogenisator (B. Braun Biotech, Mesungen, Deutschland) mit 16 Hüben bei 800 rpm durchgeführt. Nach erneuter Zentrifugation (26000 x g, 30 Minuten, 4°C) wurde das Pellet in 200 µl Tris-BAME-Puffer resuspendiert. Aliquots dieser Membranlösung wurden einer Proteinbestimmung unterzogen.

Für den Bindungsassay wurden verschiedene ¹²⁵I-ET1-Konzentrationen verwendet. Hierzu wurden zwei Verdünnungreihen, eine für die spezifische und eine für die nicht-spezifische Bindung, mit jeweils 100 µl einer ¹²⁵I-ET1-Lösung vorbereitet. Die Konzentrationen betrugen 1000, 500, 250, 125 und 62.5 pM. Die Verdünnungsreihe für die Bestimmung der nicht-spezifischen 2 µM nicht-radioaktiv Bindung erhielt zusätzlich markiertes ET1. Darauffolgend wurden jeweils 100 µl der Membranlösung mit einer Konzentration von 10 µg/ml und 100 µl einer ET1-Lösung (Tris-BAME-Puffer mit ¹²⁵I-ET1 mit/ohne ET1) gemischt. Die Reaktionsansätze wurden für 2 Stunden bei 25°C im Schüttel-Wasserbad inkubiert. Die Versuche wurden in Duplikationen durchgeführt.

Die Reaktionsansätze wurden mit einem Harvester (Brandel, Gaithersburg, USA) über einen mit 0,1 % (w/v) Polyethylenimin äquilibrierten GF/C-Filter (Whatman, Brentford, England) gesaugt und anschließend dreimal mit PBS-Puffer gewaschen. Die Radioaktivität wurde in einem γ -Counter in cpm *(counts per minute)* bestimmt. Mit den Programmen Radlig 4.0 (Cambridge, England) und Prism 2.01 (GraphPad, San Diego, USA) erfolgte die Auswertung der cpm-Daten, die Berechnung der Bindungskonstante K_D sowie der maximalen Bindungskapazität B_{max} und die graphische Auswertung.

Tris-BAME-Puffer:

50 mM Tris, 2 mM EGTA,10 mM MgCl₂, 0,15 mM Bacitracin, 0,0015 % (w/v) Aprotinin, pH 7,4

PBS-Puffer:

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,0 mM Na₂HPO₄, pH 7,4

2.2.26 Membranpräparation über Percoll-Gradienten

Transient transfizierte HEK293-Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS-Puffer gewaschen und mit einem Zellschaber in 1,5 ml kaltem Saccharose-Puffer abgelöst. Der Zellaufschluss erfolgte mit einem Homogenisator (B. Braun Biotech, Mesungen, Deutschland) mit 20 Hüben bei 1450 rpm *(rotations per minute)*. Anschließend wurde dieses Zelllysat nochmals durch 10-maliges Aufziehen in eine 2ml-Spritze mit 27G-Kanüle homogenisiert. Ein 30-prozentiger Optiprep-Gradient wurde mit der homogenisierten Probe überschichtet. In einer Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Galway, Irland) erfolgte die Auftrennung der Probe bei 84000 x g für 30 Minuten bei 4°C. Die Membranbande wurde in Saccharose-Puffer verdünnt und erneut bei 84000 x g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die Membranbande wurde dann abgenommen und bei –80°C gelagert oder direkt in einem Immunoblot (siehe 2.2.19) analysiert.

Saccharose-Puffer:

20 mM Tris, 0,25 M Saccharose, 1 mM EDTA, Proteaseinhibitoren (0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 0,5 mM Benzamidin, 3,2 μg/ml Trypsininhibitor, 1,4 μg/ml Aprotinin), pH 7,8

PBS-Puffer:

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,0 mM Na₂HPO₄, pH 7,4

2.2.27 Laser-Scanning-Mikroskopie

Die mikroskopische Analyse lebender oder mit Paraformaldehyd fixierter Zellen (siehe 2.2.23) erfolgte mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 Meta (Carls Zeiss GmbH, Jena, Deutschland), ausgestattet mit einem Plan-Apochromat Objektiv (63x/1.4 oil). Das GFP wurde mit einem Argon-Ionen-Laser und das Cy3.5 mit einem Helium-Neon-Laser angeregt. Die Analyse der Zellen erfolgte bei λ_{exc} = 488 nm und λ_{em} > 515 nm für GFP und bei λ_{exc} = 543 nm und λ_{em} > 570 nm für Cy3.5.

3 Ergebnisse

3.1 Bedeutung des Tyrosin-Motivs im C-Terminus des Endothelin-B-Rezeptors für die Internalisierung

3.1.1 ET_B-Rezeptoren mit Aminosäureveränderungen im C-Terminus

Der C-Terminus des ET_B-Rezeptors enthält ein Tyrosin-Motiv (GYXXF), welches in ähnlicher Form auch bei verschiedenen lysosomalen Proteinen vorliegt. Um zu prüfen, ob dieses Tyrosin-Motiv zur Internalisierung oder zum intrazellulären Transport beiträgt, wurden Plasmide verwendet, die für ET_B-Rezeptoren kodieren, in denen a) die Aminosäuren dieses Motivs gegen Alanine ausgetauscht wurden (GYXXF \rightarrow AAXXA), und b) das Motiv inklusive des distalen C-Terminus deletiert wurde (AGYF). Die entsprechenden Plasmide pEGFP::AAXXA.ET_B und pEGFP:: Δ GYF.ET_B lagen zu Beginn dieser Arbeit vor (Boese 2002). Zusätzlich wurde durch gerichtete Mutagenese auch ein Plasmid hergestellt, das für einen ET_B-Rezeptor mit einem isolierten Austausch des Tyrosins durch Alanin kodiert (pEGFP::GAXXF.ET_B.flag). In Abb. 5 sind die verschiedenen Veränderungen der Aminosäuresequenz im C-Terminus des ET_B-Rezeptors dargestellt.



Abb. 5: Schematische Darstellung des C-Terminus der wildtypischen und mutierten ET_B -Rezeptoren. Dargestellt sind die Aminosäuren des C-Terminus beginnend mit dem Ende der 7. Transmembrandomäne, der über eine Palmitoylierung von zwei Cysteinresten (C403/C405) in die Plasmamembran verankert vorliegt. Die Darstellung der Aminosäuren erfolgt im Einbuchstabencode. Die Aminosäuren des GYXXF-Motivs im Wildtyp und in den mutierten ET_B -Rezeptoren sind mit orangefarbenen Kreisen dargestellt.

3.1.2 Klonierung eines Epitops in den N-Terminus des ET_B-Rezeptors

Für die Detektion des wildtypischen ET_B-Rezeptors und der ET_B-Rezeptoren mit verändertem C-Terminus in ELISA-Experimenten sollte der spezifisch gegen das FLAG-Epitop gerichtete anti-FLAG-Antikörper (M2) eingesetzt werden. Zu Beginn dieser Arbeit lag jedoch nur ein Plasmid vor, das für den wildtypischen ET_B-Rezeptor mit einem N-terminalen FLAG-Epitop kodiert. Durch Umklonierung sollten auch solche Plasmide hergestellt werden, die für mutierte ET_B-Rezeptoren mit einem N-terminalen FLAG-Epitop kodieren. Ausgehend von dem Plasmid pEGFP::ET_B.flag, welches für den ET_B -Rezeptor ET_B .flag.GFP wildtypischen kodiert, wurde mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *EcoRV* ein DNA-Fragment isoliert, das den für den N-Terminus mit dem FLAG-Epitop kodierenden Bereich umfasst. Dieses Fragment wurde nun mit den korrespondierenden Fragmenten der pEGFP::AAXXA.ET_B *Hind*III/*EcoR*V-gespattenen Plasmide und

pEGFP:: Δ GYF.ET_B kloniert, die für die Rezeptoren AAXXA.ET_B.GFP bzw. Δ GYF.ET_B.GFP kodieren. Alle weiteren Mutationen des ET_B-Rezeptorplasmides wurden durch gerichtete Mutagenese auf Basis des Plasmides pEGFP::ET_B.flag hergestellt. Alle Plasmidkonstrukte wurden durch DNA-Sequenzierung überprüft.

3.1.3 Stabil exprimierende HEK293 Zelllinien

Zunächst sollte untersucht werden, inwieweit das Tyrosin-Motiv GYXXF an der Internalisierung des ET_B -Rezeptors beteiligt ist. Dazu wurden HEK293-Zellen stabil mit Plasmiden transfiziert, die für den Wildtyp und verschiedene ET_B -Rezeptormutanten (GAXXF.ET_B.flag.GFP, AAXXA.ET_B.flag.GFP und Δ GYF.ET_B.flag.GFP) kodieren. Diese stabilen Klone wurden in Bindungsanalysen mit ¹²⁵I-ET1 und mittels LSM charakterisiert.

In Abb. 6 sind mikroskopische Aufnahmen der stabil exprimierenden HEK293-Klone zu sehen. Sowohl der wildtypische als auch die mutierten ET_B-Rezeptoren sind hauptsächlich in der Plasmamembran lokalisiert. Die intrazelluläre Fluoreszenz stellt vermutlich neusynthetisierte oder spontan internalisierte Rezeptoren dar.



Abb. 6: LSM-Aufnahmen der stabilen HEK293-Klone. Die Zellen exprimieren stabil den wildtypischen oder mutierte Formen des ET_B .flag.GFP-Rezeptors. Die ET_B -GFP-Rezeptoren sind vor allem in der Plasmamembran, z. T. auch intrazellulär zu erkennen. Maßstab: 10 µm.

Diese stabilen Zellklone wurden anschließend in einem Bindungsexperiment

Bindungskonstanten zur Bestimmung der KD und der maximalen Bindungskapazität B_{max} eingesetzt (Tab. 18). Die K_D-Werte der mutierten Rezeptoren unterschieden sich nicht wesentlich von denen des wildtypischen Rezeptors. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Veränderungen, die im C-Terminus des ET_B-Rezeptors vorgenommen wurden, keinen Einfluss auf die Affinität des Rezeptors zu ET1 haben. Der intrazelluläre Transport scheint auch unbeeinflusst zu sein (siehe Abb. 9). Die annähernd gleichen Werte für die maximale Bindungskapazität lassen den Schluss zu, dass diese stabil exprimierenden HEK293-Klone für die unterschiedlichen Versuche genutzt werden können.

Tab. 18: Bestimmung der maximalen Bindungskapazität B_{max} und der Bindungskonstante K_D . Für die Versuche wurden Zellmembranen der stabil exprimierenden HEK293-Klone untersucht. Die Werte stellen Mittelwerte aus drei Experimenten dar.

Rezeptor	B _{max} in pmol · I⁻¹	K_D in pmol
ET _B .flag.GFP	1,4 ± 0,24	14 ± 4
AAXXA.ET _B .flag.GFP	$\textbf{1,5}\pm\textbf{0,74}$	12 ± 3
$\Delta GYF.ET_B.flag.GFP$	$1,2\pm0,54$	10 ± 3

3.1.4 Einfluss des C-Terminus auf die Internalisierung des ET_B-Rezeptors

3.1.4.1 Untersuchung der Internalisierung mittels ELISA

Um die Bedeutung des tyrosinhaltigen Motivs GYXXF im C-Terminus des ET_B-Rezeptors für die Agonist-induzierte Internalisierung zu untersuchen, wurde die Internalisierung des Wildtyps und der mutierten ET_B-Rezeptoren im ELISA-Experiment *(enzyme linked immunosorbent assay)* bestimmt. HEK293-Zellen, die stabil den FLAG-fusionierten ET_B-Rezeptor exprimieren, wurden in 96er-well-Platten ausgesät und für bis zu 120 Minuten mit ET1

(50 nM) stimuliert. Nach Fixierung der Zellen mit Formaldehyd erfolgte mit dem Peroxidase-(POD)-gekoppelten Anti-FLAG M2 Antikörper die Detektion der noch in der Zellmembran verbliebenen ET_B-Rezeptoren, die in dieser Zeit ET1-Stimulation noch nicht sequestriert wurden. der Es erfolgte anschließend die Umsetzung eines Enzymsubstrates durch die Peroxidase. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von Schwefelsäure beendet. Gleichzeitig vollzog sich durch diese Ansäuerung ein Farbumschlag von gelb nach blau. Die Intensität der Enzymreaktion diente als Maß für die Zahl der der Zelloberfläche nachweisbaren Rezeptoren. Der Wert von an unstimulierten Zellen wurde als Bezugswert herangezogen und mit 100 % festgelegt.

Die Agoniststimulation des wildtypischen ET_B -Rezeptors für 120 Minuten führte zu einer Verminderung der ET_B -Rezeptoren an der Zelloberfläche um ca. 60 %. Dabei zeigte sich der größte Effekt innerhalb der ersten 10 Minuten der Stimulation: ca. 35 % des wildtypischen Rezeptors wurden zu diesem Zeitpunkt sequestriert. Die drei verschiedenen Rezeptormutanten hingegen internalisierten nur zu ca. 10 % nach 10 Minuten und zu ca. 35 % nach 120 Minuten Agoniststimulation (siehe Abb. 7). Das Ausmaß der Reduktion war bei allen drei Rezeptormutanten annähernd gleich (siehe Abb. 7). Bereits der Einzelaustausch des Tyrosins gegen Alanin (GAXXF) ist ausreichend für die vollständige Verminderung der Internalisierungsgeschwindigkeit.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass das im C-Terminus lokalisierte, tyrosinhaltige Motiv GYXXF einen Einfluss auf die Internalisierungsgeschwindigkeit hat.



Abb. 7: Verlauf der Internalisierung von wildtypischen und mutierten ET_B -Rezeptoren. HEK293-Zellen, die stabil den FLAG-fusionierten ET_B -Rezeptor exprimieren, wurden für bis zu 120 Minuten mit 50 nM ET1 bei 37°C stimuliert. Die Rezeptoren an der Zelloberfläche wurden anschließend mit einem POD-gekoppelten M2-anti-FLAG Antikörper detektiert. Nach Zugabe eines POD-Substrates erfolgte eine Enzymreaktion. Als Maß der Enzymmenge und somit als Maß für die Zahl der Rezeptoren an der Zelloberfläche wurde die optische Dichte anschließend photometrisch bei 450 nm ermittelt. Die Anzahl der Rezeptoren unstimulierter Zellen (B₀) wurde mit 100 % festgelegt.

3.1.4.2 Laser-Scanning-Mikroskopie von HEK293-Zellklonen

In Ergänzung zu den ELISA-Untersuchungen wurden die stabilen Zellklone auch in der Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) untersucht. Die LSM erlaubt zudem die Analyse möglicher Unterschiede in der subzellulären Rezeptorverteilung zwischen dem wildtypischen ET_B-Rezeptor und den ET_B-Rezeptormutanten nach ET1-Stimulation.

Die Zellen wurden für 20 Minuten mit 25 nM Cy3.5-ET1 bei 37°C stimuliert und anschließend im Laser-Scanning-Mikroskop untersucht. Da ET1 bzw. auch das fluoreszierende Cy3.5-ET1 quasi irreversibel an den ET_B -Rezeptor bindet, kann der Rezeptor sowohl über das GFP als auch durch seinen Liganden nachgewiesen werden. Gleichzeitig ist der Rezeptor auf Grund seiner GFP-Fusion nachweisbar. In Abb. 8 ist zu sehen, dass der wildtypische ET_B -Rezeptor nach 20 Minuten ET1-Stimulation hauptsächlich in intrazellulären Kompartimenten nachweisbar ist, wohingegen die mutierten Formen des ET_B -Rezeptors noch deutlich an der Zelloberfläche lokalisiert sind.



Abb. 8: Laser-Scanning-Mikroskopie lebender HEK293-Zellen, die den wildtypischen ET_B-Rezeptor oder ET_B-Rezeptormutanten exprimieren. HEK293-Zellen, die stabil den GFP-fusionierten ET_B-Rezeptor exprimieren, wurden für 20 Minuten mit 25 nM Cy3.5-ET1 stimuliert und anschließend mit einem Laser-Scanning-Mikroskop mikroskopiert. In grün ist die GFP-Fluoreszens des ET_B-Rezeptors und in rot ist der fluoreszierende Ligand Cy3.5-ET1 dargestellt. Maßstab: 10 μ m.

Mit Hilfe der Laser-Scanning-Mikroskopie konnten die Daten des ELISA-Experiments bestätigt werden. Bei Veränderungen im GYXXF-Motiv ist die Internalisierung des ET_B-Rezeptors deutlich beeinträchtigt.

3.1.5 Untersuchungen zum lysosomalen Abbau des wildtypischen und des mutierten ET_B-Rezeptors

Wie die Ergebnisse des ELISA und der Mikroskopie zeigen, war das Ausmaß der Internalisierung des ET_B -Rezeptors mit Mutationen im GYXXF-Motiv im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert. Da dieses Motiv ursprünglich als lysosomales Sortierungsmotiv beschrieben wurde, sollte nun untersucht werden, ob das GYXXF-Motiv einen Einfluss auf die lysosomale Sortierung des ET_B -Rezeptors hat bzw. die verminderte Endozytose mit einem eventuell veränderten lysosomalen Abbau in Zusammenhang steht.

Zur Analyse des lysosomalen Abbaus des ET_B -Rezeptors wurde die Methode des LT-PAGE (low-temperature-Polyacrylamidgelelektrophorese) genutzt (Grantcharova et al. 2002). Dabei erfolgt der Nachweis des ET_B -Rezeptors durch radioaktiv markiertes ¹²⁵I-ET1, das quasi irreversibel an den ET_B -Rezeptor bindet. Nach Inkubation des radioaktiven Liganden an ganzen Zellen und anschließender Zelllyse erfolgt eine elektrophoretische Auftrennung der Proteinprobe. Der Ligand-Rezeptor-Komplex, der auch unter denaturierenden Bedingungen während einer SDS-PAGE stabil ist, wird autoradiographisch nachgewiesen.

HEK293-Zellen, die stabil den wildtypischen ET_B -Rezeptor (ET_B .flag.GFP) oder eine Rezeptormutante (AAXXA.ET_B.flag.GFP) exprimieren, wurden bei 4°C mit ¹²⁵I-ET1 inkubiert. Ein anschließender Inkubationsschritt bei 37°C erlaubte die Internalisierung und die anschließende Degradation des Rezeptors. In Abb. 9 ist eine Autoradiographie dargestellt. Die mit einem Stern markierte Bande bei ca. 75 kDa (Spur a und d) stellte den ungespaltenen ET_B -Rezeptor dar. Nach Inkubation für 60 bzw. 90 Minuten bei 37°C tauchte eine Bande auf, die den N-terminal verkürzten Rezeptor

darstellte (mit einem Dreieck markiert, Spur b, c, e und f). Gleichzeitig waren kleinere Rezeptorfragmente nachweisbar (mit einem Pfeil markiert, Spur c und f), welche Abbauprodukte des ET_B -Rezeptors darstellten. Es war jedoch kein Unterschied im Bandenmuster beider Rezeptoren nachweisbar.

Diese Daten lassen den Schluss zu, dass die Mutation des GYXXF-Motivs keinen Einfluss auf die lysosomale Sortierung des ET_B-Rezeptors nach der ET1-stimulierten Internalisierung ausübt.





3.2 Identifizierung von Interaktionspartnern des ET_B-Rezeptors

3.2.1 GST-Pulldown

3.2.1.1 Konstruktion von GST-Fusionsproteinen

Eine weit verbreitete Methode zur Identifizierung von Interaktionspartnern stellt der GST-Pulldown dar. Hierzu werden DNA-Abschnitte, die für bestimmte Bereiche von Proteinen kodieren, in den Leserahmen des Gens für die Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* kloniert. Die Plasmide werden in *E. coli* BL21 transformiert, und die Fusionsproteine können durch Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Im Anschluss erfolgt die Inkubation mit dem potentiellen Interaktionspartner und dessen Nachweis in einem Immunoblot.

Für die Klonierung von Bereichen des ET_A-Rezeptors wurde das Plasmid pEGFP::ET_A.myc genutzt. Die Amplifizierung der DNA-Fragmente für die Klonierung von ET_B-Rezeptorbereichen erfolgte auf Grundlage des Plasmides pEGFP::ET_B.flag. Die Bereiche, die für die 3. intrazelluläre Schleife und den C-Terminus des ET_A- und ET_B-Rezeptors kodieren, wurden mit spezifischen Primern durch PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pGEX-4-T3 kloniert. In Tab. 19 sind die verwendeten Primer sowie die klonierten Bereiche aufgeführt. Für die Klonierung der DNA-Bereiche, die für die 3. intrazelluläre Schleife der beiden Endothelin-Rezeptoren A und B kodieren, wurde ein ca. 200 bp-Fragment durch PCR amplifiziert. Dabei wurden die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme EcoRI und Xhol eingeführt. Die DNA-Fragmente wurden dann mit den beiden Enzymen nachgeschnitten und anschließend erfolgte die Ligation dieser Fragmente mit dem EcoRI/Xhol-gespaltenen Vektor pGEX-4-T3. Die erhaltenen Plasmide wurden pGEX-4-T3::IS3.ET_A bzw. pGEX-T-T3::IS3.ET_B genannt.

Die C-Termini beider Endothelin-Rezeptoren werden durch ein ca. 150 bp

großes DNA-Fragment kodiert und wurden nach der PCR-Amplifikation mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI/*Xho*I nachgeschnitten. Erkennungssequenzen für diese Restriktionsenzyme sind schon ursprünglich auf den Plasmiden enthalten, die für die PCR genutzt wurden. Es folgte dann die Klonierung in den *Eco*RI/*Xho*I-gespaltenen Vektor pGEX-4-T3. Die resultierenden Plasmide wurden als pGEX-4-T3::CT.ET_A bzw. pGEX-4-T3::CT.ET_B bezeichnet.

Die Kontrolle der Plasmide, die für die GST-Fusionsproteine kodieren, erfolgte durch DNA-Sequenzierung.

Tab. 19: Klonierungsstrategie zur Konstruktion der GST-Fusionsproteine. Aufgelistet sind die beiden Plasmide, die jeweils für den GFP- und FLAG-fusionierten ET_B -Rezeptor bzw. den GFP- und myc-fusionierten ET_A -Rezeptor kodieren.

Ausgangsplasmid	Rezeptorbereich	Primer	GST-Fusionsplasmid
pEGFP::ET _B .flag	3. intrazelluläre	ETB_IL3_EcoRI F	pGEX-4-T3::IS3.ET _B
	Schleife	ETB_IL3_Xhol R	
	C-Terminus	BS2	pGEX-4-T3::CT.ET _B
	komplett	ET_Xhol_rev	
pEYFP::ET _A .myc	3. intrazelluläre	ETA_IL3_EcoRI F	pGEX-4-T3::IS3.ET _A
	Schleife	ETA_IL3_Xhol R	
	C-Terminus	AS2	pGEX-4-T3::CT.ET _A
	komplett	ET_Xhol_rev	

Die Plasmide, die für GST-Fusionsproteine des C-Terminus und der 2. und 3. intrazellulären Schleife des humanen Vasopressinrezeptors (V₂R) kodieren, lagen zu Beginn dieser Arbeit schon vor (Kaschner, Sabine, unpubliziert). In Tab. 20 sind die Aminosäuresequenzen der einzelnen Rezeptorbereiche, die als GST-Fusionsproteine kodiert vorliegen, aufgelistet. Die theoretischen Molekulargewichte dieser Bereiche wurden mit Hilfe des frei zugänglichen Programms Peptide-Mass errechnet.

Rezeptorbereich	Bezeichnung	Aminosäuresequenz (Einbuchstabencode)	Mr in kDa
2. intrazelluläre Schleife des V ₂ - Rezeptors	IS2.V2R	MTLDRHRAICRPMLAYRHGSGAH WNRPV	3,3
3. intrazelluläre Schleife des V ₂ - Rezeptors	IS3.V2R	IFREIHASLVPGPSERPGGRRRGR RTGSPGEGAHVSAAVAKTVRMT	4,87
C-Terminus des V ₂ -Rezeptors	CT.V2R	IYASFSSSVSSELRSLLCCARGRT PPSLGPQDESCTTASSSLAKDTSS	4,94
3. intrazelluläre Schleife des ET _A - Rezeptors	IS3.ETA	EMLNRRNGSLRIALSEHLKQRRE	2,81
C-Terminus des ET _A -Rezeptors	CT.ETA	CINPIALYFVSKKFKNCFQSCLCCC CYQSKSLMTSVPMNGTSIQWKNH DQNNHNTDRSSHKDSMN	7,48
3. intrazelluläre Schleife des ET _B - Rezeptors	IS3.ETB	EMLRKKSGMQIALNDHLKQRRE	2,68
C-Terminus des ET _B -Rezeptors	CT.ETB	CINPIALYLVSKRFKNCFKSCLCC WCQSFEEKQSLEEKQSCLKFKAN DHGYDNFRSSNKYSSS	7,39

Tab. 20: Aminosäuresequenzen und theoretisch ermittelte Molekulargewichte der klonierten Rezeptorbereiche, die an GST fusioniert wurden.

3.2.1.2 Charakterisierung der GST-Fusionsproteine

Die Plasmide, die für die in dieser Arbeit verwendeten GST-Fusionsproteine kodieren, enthalten als Basis einen pGEX-Vektor und enthalten somit den durch Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG) induzierbaren *taq*-Promotor. Die Genexpression wird durch Bindung des *lacl*-Genproduktes an den Promotor reprimiert, der ebenfalls auf dem Plasmid kodiert vorliegt. Erst nach Induktion mit IPTG erfolgt die Anschaltung der Genexpression.

Die Überexpression der GST-Fusionsproteine erfolgte in *E. coli* BL21 Zellen. Die Induktionszeit betrug 30 Minuten. Nach dem Zellaufschluss konnten die GST-Fusionsproteine an einer GSH-Sepharosematrix affinitätschromatographisch immobilisiert werden. Die aufgereinigten Fusionsproteine wurden direkt in einem SDS-Polyacrylamidgel gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend einer Coomassie-Färbung unterzogen.

Das in Abb. 10 dargestellte SDS-Gel zeigt die Bakterienlysate nach IPTG-Induktion. Mit einem Stern wurden die Banden der exprimierten GST-Fusionsproteine markiert. In Spur 2 ist das Zelllysat von E. coli BL21 Zellen zu sehen, die nicht mit einem pGEX-Vektor transformiert wurden. Nach Aufschluss von Zellen, die mit dem Leervektor pGEX-4T-3 transformiert wurden, taucht eine Proteinbande auf, die einem Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 26 kDa entspricht. Diese mit einem Stern markierten Banden in Spur 3 und Spur 9 stellen das reine GST-Protein dar. In den Spuren 4 bis 7 wurden die Banden der GST-Fusionsproteine verschiedener intrazellulärer Schleifen (IS) des ET_A-, ET_B- und V₂-Rezeptors markiert. Mit einem Molekulargewicht von ca. 29 kDa für die Fusionsproteine mit dem IS3.ET_A und dem IS3.ET_B stimmten die theoretischen Größen mit den experimentell erhaltenen Daten überein. Auch die Molekulargewichte der Fusionsproteine IS2.V₂ (Spur 6) und IS3.V₂ (Spur 7) entsprachen mit ca. 29 bzw. 30 kDa den theoretisch bestimmten Werten. Es tauchten jedoch jeweils für beide Fusionsproteine kleinere Proteine auf, die genau wie die GST eine Größe von ca. 26 kDa aufwiesen. Diese Abbauprodukte sind wahrscheinlich durch Proteolyse entstanden. In den Spuren 10 bis 12 sind die Bakterienlysate zu sehen, die überexprimierte GST-Fusionsproteine der C Termini des ET_A-, ET_B- und V₂-Rezeptors enthalten. Auch hier deckten sich die theoretischen Molekulargewichte von ca. 33 kDa für den ET_A- und ET_B-Rezeptor und ca. 31 kDa für den V₂-Rezeptor mit den experimentell erhaltenen Größen.





Abb. 10: SDS-PAGE des Bakterien-Zelllysats nach IPTG-Induktion. Die Induktion der heterologen Überexpression von verschiedenen GST-Fusionsproteinen in *E. coli* BL21 Zellen erfolgte durch Inkubation der Bakterienkultur in Gegenwart von 1 μ M IPTG für 30 Minuten während der logarithmischen Wachstumsphase. Anschließend wurden die Zelllysate in einem denaturierendem Polyacrylamidgel aufgetrennt und einer Coomassiefärbung unterzogen. Die entsprechenden Proteinbanden des GST-Proteins bzw. der GST-Fusionsproteine sind mit einem Stern markiert. Als Kontrolle dienten *E. coli* BL21 Zellen, die nicht transformiert wurden (-).



SDS-PAGE heterolog überexprimierten GST-Abb. 11: der Fusionsproteine nach affinitätschromatographischer Aufreinigung. E. coli BL21 Zellen wurden mit verschiedenen pGEX-Plasmiden transformiert. Die Induktion der Überpression der GST-Fusionsproteine erfolgte in Gegenwart von 1 µM IPTG für 30 Minuten während der logarithmischen Wachstumsphase. Nach dem anschließenden Zellaufschluss und der affinitätschromatographischen Aufreinigung mittels Glutathion-S-Sepharose wurden die Proben in einem SDS-Polyacrylamidgel gelelektrophoretisch Anschließend aufgetrennt. erfolge die Coomassiefärbung des Gels.

Abb. 11 zeigt ein Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel nach affinitätschromatographischer Aufreinigung des GST-Proteins bzw. der GST-Fusionsproteine und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung. Alle Proteinbanden, die in Abb. 10 mit einem Stern markiert wurden, konnten in aufgereinigter Form wieder nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass alle GST-Fusionsproteine heterolog in *E. coli* BL21 überexprimiert werden konnten, und durch affinitätschromatographische Aufreinigung eine für weitere Untersuchungen geeignete Anreicherung erzielt wurde.

3.2.1.3 GST-Pulldown und Nachweis der Arrestin3-Interaktion

Für den direkten Nachweis der Interaktion der GST-Fusionsproteine mit Arrestin3 wurden HEK293-Zellen transient mit Plasmid pEGFP::Arrestin3 transfiziert und 24 h nach Transfektion lysiert. Das HEK-Zellysat wurde dann mit den aufgereinigten und an der Glutathion-Sepharose immobilisierten GST-Fusionsproteinen inkubiert. Der qualitative Nachweis von Arrestin3 einen monoklonalen Anti-GFP-Antikörper in erfolgte durch einem Immunoblot. Für verschiedene GST-Fusionsproteine konnte eine Interaktion mit Arrestin3 nachgewiesen werden (Abb. 12). So zeigt die 3. intrazelluläre Schleife des V₂-Rezeptors die stärkste Interaktion mit Arrestin3.GFP. Eine schwache Interaktion ist auch mit der 2. intrazellulären Schleife des V2-Rezeptors und mit den C Termini des V₂-, des ET_A- und des ET_B-Rezeptors nachweisbar. Im Vergleich zur Kontrolle (GST-Protein) ist sowohl für die 3. intrazelluläre Schleife des ET_A- als auch des ET_B-Rezeptors keine Interaktion mit Arrestin3 nachweisbar.



Abb. 12: Immunoblot nach GST-Pulldown – Interaktion mit Arrestin3. Aufgereinigte GST-Fusionsproteine wurden mit einem Zelllysat von HEK293-Zellen, die Arrestin3.GFP überexprimieren, über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteinprobe erfolgte der Nachweis von Arrestin3.GFP durch einen monoklonalen Antikörper gegen das GFP in einem Immunoblot (Anti-GFP 1:5000).

Diese Daten deuten daraufhin, dass der ET_B -Rezeptor über seinen C-Terminus mit Arrestin3 interagieren könnte. Im Vergleich zu dem C-Terminus des ET_A -Rezeptors und des V₂-Rezeptors weist der C-Terminus des ET_B -Rezeptors jedoch die schwächste Arrestinbindung auf. Welche funktionelle Bedeutung dies hinsichtlich der Rezeptorinternalisierung hat, sollte in anschließenden Experimenten untersucht werden.

3.2.2 Co-Immunopräzipitation zum Nachweis der Arrestin3-Interaktion

Die im GST-Pulldown gezeigte Wechselwirkung des C-Terminus des ET_B -Rezeptors mit Arrestin3, sollte durch Co-Immunopräzipitation bestätigt werden. Hierzu sollte an HEK293-Zellen, die den ET_B -Rezeptor und das Arrestin3.GFP co-exprimieren, geprüft werden, ob nach Immunopräzipitation des ET_B -Rezeptors eine Interaktion mit Arrestin3 nachweisbar ist. Mit diesem Experiment kann geprüft werden, ob die Stimulation des Rezeptors Einfluss auf die Interaktion hat. Es sollte zunächst die Frage geklärt werden, ob eine Interaktion des ET_B -Rezeptors mit Arrestin3 in Abwesenheit und in Gegenwart von ET1 nachweisbar ist. Hierzu wurden HEK293-Zellen transient

mit dem Plasmid pcDNA3::ET_B.flag, welches für nativen FLAG-fusionierten ET_B -Rezeptor (ET_B .flag.cDNA) ohne GFP-Anteil kodiert, und dem Plasmid pEGFP::Arrestin3 co-transfiziert. Die Zellen wurden entweder 5 Minuten mit 50 nM ET1 stimuliert oder blieben unstimuliert. Nach Herstellung eines Zelllysats erfolgte die Präzipitation des ET_B -Rezeptors mit dem polyklonalen Anti- ET_B -Antikörper, der gegen den N Terminus des Rezeptors gerichtet ist (Gregan et al. 2004). Mögliches co-präzipitiertes Arrestin3 wurde anschließend durch einen monoklonalen Anti-GFP-Antikörper im Immunoblot nachgewiesen.

In Abb. 13 ist ein Immunoblot dargestellt, auf dem zu sehen ist, dass bereits unter unstimulierten Bedingungen eine Arrestin3-Interaktion mit dem ET_{B} -Rezeptor nachzuweisen ist (Spur 2). Diese basale Interaktion mit Arrestin3 konnte jedoch nicht durch ET1-Stimulation gesteigert werden (Spur 3). Die Immunopräzipitaton des myc-fusionierten V₂-Rezeptors, der als Positivkontrolle dienen sollte, erfolgte mit einem Anti-myc-Antikörper, war jedoch nicht erfolgreich.

Mit der Methode der Co-Immunopräzipitation war es zunächst möglich, die Befunde aus dem GST-Pulldown hinsichtlich der Interaktion von Arrestin3.GFP mit dem C-Terminus des ET_B -Rezeptors zu bestätigen. Es ließ sich jedoch nicht zeigen, inwieweit die Interaktion des ET_B -Rezeptors mit Arrestin3 für die Internalisierung des ET_B -Rezeptors von Bedeutung sein könnte.



Abb. 13: Immunopräzipitation zum Nachweis der Arrestin3-Interaktion. Transient transfizierte HEK293-Zellen, die den FLAG-fusionierten ET_{B^-} Rezeptor und das Arrestin3.GFP co-exprimieren, wurden entweder für 5 Minuten mit 50 nM ET1 stimuliert oder blieben unstimuliert. Mit einem M2-anti-FLAG-Antikörper erfolgte die Immunopräzipitation des ET_{B^-} Rezeptors. Der anschließende Nachweis des co-präzipitierten Arrestin3.GFP in einem Immunoblot wurde mit dem polyklonalen GFP01-Antikörper durchgeführt. Als Kontrolle diente Zelllysat von untransfizierten HEK293-Zellen, das in gleicher Weise einer Immunopräzipitation und anschließendem Immunoblot unterzogen wurde.

3.2.3 Membranpräparation zum Nachweis der Arrestin3-Interaktion

Eine weitere Möglichkeit zum Interaktionsnachweis von Proteinen mit dem ET_B-Rezeptor liegt im Nachweis der Rekrutierung von Arrestin3 aus dem Cytosol an die Plasmamembran. Dabei erfolgt durch differenzierte Zentrifugation die Separation von Cytosol und Plasmamembran. Der Zellaufschluss erfolgt durch Ultraschall. Detergenzien, die sonst für die Solubilisierung der hydrophoben, membranären Rezeptoren benötigt werden und die Proteininteraktionen negativ beeinflussen, wurden hierzu nicht eingesetzt.

HEK293-Zellen wurden wieder transient mit dem Plasmiden pEGFP::Arrestin3 und pcDNA3::ET_B.flag oder pcDNA3::V₂.flag co-transfiziert. Die Zellen wurden dann zum einen mit Puffer und zum anderen

mit 50 nM ET1 (ET_BR/Arrestin3) oder 50 nM AVP (V₂R/Arrestin3) für 5 Minuten bei 37°C stimuliert. Für den V₂-Rezeptor konnte nach AVP-Stimulation eine deutliche Rekrutierung von Arrestin3 zur Membran und somit zum Rezeptor nachgewiesen werden (Abb. 14). Die Stimulation des ET_B-Rezeptors hingegen führte zu keiner vermehrten Rekrutierung von Arrestin3 an die Plasmamembran.



Abb. 14: Immunoblot nach Membranpräparation zum Arrestin3-Nachweis. HEK293-Zellen, die transient das Arrestin3.GFP und den ET_B -Rezeptor oder den V_2 -Rezeptor co-exprimieren, wurden entweder mit dem Agonisten (50 nM ET1 oder AVP) für 5 Minuten bei 37°C stimuliert oder blieben unstimuliert. Nach einer Membranpräparation (Mem) durch Ultrazentrifugation und anschließender Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgel erfolgte die Detektion des Arrestin3.GFP mit einem monoklonalen anti-GFP Antikörper. Als Kontrolle der Arrestin-Expression diente das für die Membranpräparation eingesetzte Zelllysat (Lys) von stimulierten Zellen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die durch GST-Pulldown und Co-Immunopräzipitation gezeigte Interaktion von Arrestin3 mit dem ET_B -Rezeptor keine Relevanz für die erste Phase der Rezeptorinternalisierung zu haben scheint. Für die weitere Prüfung der physiologischen Bedeutung soll der Einfluss des Arrestin3 auf die ET_B -Internalisierung durch ELISA analysiert werden.

3.3 Einfluss von Arrestin3 auf die Internalisierung des ET_B-Rezeptors

3.3.1 Arrestin-Rekrutierung nach Agoniststimulation des ET_B-Rezeptors

Inwieweit das Arrestin an der Internalisierung des ET_B-Rezeptors beteiligt ist, sollte zunächst mit der Laser-Scanning-Mikroskopie lebender Zellen untersucht werden. Bei dieser Methode können die Zellen während der Mikroskopie verschiedenen Puffern ausgesetzt und hinsichtlich der Arrestin-Rekrutierung analysiert werden. Hierzu wurden HEK293-Zellen transient mit Plasmiden transfiziert, die für eine Form des ET_B-Rezeptors (ET_B.flag, AAXXA.ET_B.flag, Δ GYF.ET_B.flag) und für das Arrestin3.GFP kodieren. Die Zellen wurden für 3 Min mit 25 nM Cy3.5-ET1 stimuliert und anschließend erfolgte die Detektion der Arrestinrekrutierung. In Abb. 15 ist zu sehen, dass die GFP-Fluoreszenz des Arrestin3.GFP in unstimulierten Zellen gleichmäßig im Cytoplasma lokalisiert ist (Bilder 1A, 2A und 3A). Die Detektion des ET_B-Rezeptors erfolgte indirekt durch den Liganden Cv3.5-ET1 als Ligand/Rezeptor-Komplex und ist somit erst nach der Stimulation möglich (Bilder 1B, 2B und 3B, roter Kanal). Nach Inkubation der Zellen mit Cy3.5-ET1 zeigte sich eine deutliche Cy3.5-Fluoreszenz an der Plasmamembran, was die ET_B-Rezeptoren an der Zelloberfläche darstellt. Vereinzelt ist auch eine Rekrutierung von Arrestin3.GFP nachweisbar, was sich durch die GFP-Fluoreszenz Plasmamembran punktuelle an der zeiat. Nach computergestützter Verrechnung beider Fluoreszenzsignale, der GFP- und Cy3.5-Fluoreszenz, wird die Co-Lokalisation durch eine Gelbfärbung angezeigt. Für alle drei ET_B-Rezeptorformen ist an der Zelloberfläche eine Co-Lokalisation von GFPund vereinzelt Cy3.5-Fluoreszenz nachweisbar (Pfeile mit offenem Pfeilkopf). Es tauchen zusätzlich Cy3.5fluoreszierende, intrazelluläre Vesikel auf, die bereits internalisierte ET_B-Rezeptoren darstellen (Pfeile mit geschlossenem Pfeilkopf). Diese Vesikel
weisen jedoch keine GFP-Fluoreszenz, also kein Arrestin3.GFP, auf. Es konnte gezeigt werden, dass es nach Stimulation des ET_B-Rezeptors zu einer Rektrutierung von Arrestin3.GFP zur Plasmamembran kommt. Diese Rektrutierung ist jedoch auf kleine Bereiche der Plasmamembran beschränkt, obwohl die Cy3.5-Fluoreszenz und somit der Ligand/Rezeptor-Komplex in der gesamten Plasmamembran nachweisbar ist. Internalisierte Vesikel, die den ET_B-Rezeptor enthalten, weisen hingegen keine GFP-Fluoreszenz auf und enthalten somit kein Arrestin3. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass Arrestin3.GFP möglicherweise mit dem ET_B-Rezeptor interagiert, aber keine stabilen Komplexe, bestehend aus Rezeptor und Arrestin3, während des Internalisierungsprozesses entstehen. Welchen Einfluss das Arrestin3 auf die Internalisierung hat, soll durch anschließende ELISA-Experimente untersucht werden.



Abb. 15: Laser-Scanning-Mikroskopie zur Lokalisation von Arrestin nach Stimulation des ET_B-Rezeptors. HEK293-Zellen, die transient den ET_B-Rezeptor und das Arrestin3.GFP exprimieren, wurden für 3 Minuten mit 25 nM Cy3.5-ET1 stimuliert und anschließend mit einem Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Dabei wurden der wildtypische ET_B.flag-Rezeptor (1A, 1B) und zwei mutierte ET_B-Rezeptoren [AAXXA.flag.ET_B (2A, 2B) und ∆GYF.flag.ET_B (3A, 3B)] untersucht. Die GFP-Fluoreszenz des Arrestin3.GFP ist in grün und die Cy3.5-Fluoreszenz, die dem Ligand/Rezeptor-Komplex entspricht, in rot dargestellt. Die computergestützte Überlagerung beider Fluoreszenzen ergibt ein gelbes Signal. Eine Co-Lokalisation von Arrestin3.GFP und dem Ligand/Rezeptor-Komplex wurde mit einen Pfeil mit einem offenen Pfeilkopf markiert (\rightarrow). Internalisierte Vesikel erhielten eine Markierung durch einen Pfeil mit geschlossenem Pfeilkopf (\rightarrow). Maßstab: 10 µm.

3.3.2 Untersuchung des Einflusses von Arrestin3 auf die Internalisierung des ET_B-Rezeptors

Für die weitere Analyse des Einflusses von Arrestin3 auf die Internalisierung des ET_B -Rezeptors wurden Zellklone, die stabil den ET_B -Rezeptor exprimierten, mit den Plasmiden pEGFP::Arrestin3 oder pEGFP::V54D.Arrestin3 transfiziert. Es wurde dann mittels ELISA die Internalisierungskinetik bestimmt. Die transiente Transfektion mit dem Plasmid pK44A.Dynamin, das für ein dominant-negatives Dynamin (K44A.Dynamin) kodiert und die Internalisierung des ET_B -Rezeptors blockiert, wurde als positive Kontrolle genutzt. In Abb. 16 sind die Ergebnisse der ELISA dargestellt.



Abb. 16: ELISA zur Bestimmung des Einflusses von Arrestin3.GFP, V54D.Arrestin3.GFP und K44A.Dynamin auf die Internalisierung des ET_B-Rezeptors. HEK293-Zellen, die stabil den GFP- und FLAGfusionierten ET_B-Rezeptor exprimierten, wurden transient mit Plasmiden die für Arrestin3.GFP, V54D.Arrestin3.GFP co-transfiziert. und K44A.Dynamin kodieren. Es erfolgte die Stimulation der Zellen für bis zu 120 Minuten mit 50 nM ET1 bei 37°C, und anschließend wurden die ET_B-Rezeptoren an der Zelloberfläche mit einem POD-gekoppelten M2anti-FLAG Antikörper detektiert. Nach Zugabe eines POD-Substrates kam es zu einer Enzymreaktion. Anschließend wurde die optische Dichte photometrisch bei 450 nm ermittelt, die als Maß der Enzymmenge und somit als Maß für die Zahl der Rezeptoren an der Zelloberfläche diente. Die Anzahl der Rezeptoren unstimulierter Zellen (t = 0 Minuten) wurde mit 100 % festgelegt.

In Gegenwart von Arrestin3.GFP bzw. V54D.Arrestin3.GFP war kein Unterschied im Internalisierungsverhalten des ET_B -Rezeptors festzustellen. Die gleichzeitige Expression von K44A.Dynamin hingegen führt zu einer deutlichen, wenn auch nicht kompletten Inhibierung der Internalisierung. Das lässt sich sehr wahrscheinlich dadurch erklären, dass als Grundlage der transienten Transfektion eine HEK293-Zelllinie genutzt wurde, die stabil den ET_B -Rezeptor exprimiert und bei der transienten Transfektion nicht alle Zellen transfiziert wurden. Somit sind auch Zellen vorhanden, die nur den ET_B -Rezeptor alleine exprimieren. Zur Klärung dieser Annahme wurden für

einen anschließenden ELISA HEK293-Zellen transient mit den Plasmiden pEGFP::ET_B.flag und pEGFP::Arrestin3, pEGFP::V54D.Arrestin3 oder pK44A.Dynamin transfiziert. Die Daten aus diesem Experiment sind in Abb. 17 dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass weder ein positiver Effekt durch das wildtypische Arrestin3 noch ein negativer Effekt durch die Mutante V54D.Arrestin3 auf die Rezeptorinternalisierung nachgewiesen werden kann.



Abb. 17: ELISA nach transienter Co-Transfektion von HEK293-Zellen. Die Zellen wurden mit Plasmiden co-tranfiziert, die zum einen für den ET_B-Rezeptor (ET_B-flag.GFP) und zum anderen für Arrestin3.GFP, V54D.Arrestin3.GFP oder K44A.Dynamin kodieren. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit 50 nM ET1 für bis zu 120 Minuten bei 37°C. Nach anschließender Detektion der an der Zelloberfläche befindlichen ET_B-Rezeptoren durch einen POD-gekoppelten M2-anti-flag-Antikörper wurde die optische Dichte der durch die Peroxidase umgesetzten Produktmenge bei 450 nm bestimmt. Das so ermittelte Maß der Enzymmenge diente gleichzeitig als Maß der Anzahl der Rezeptoren an der Zelloberfläche. Die Anzahl der Rezeptoren unstimulierter Zellen (t = 0 Minuten) wurde mit 100 % festgelegt.

Diese Ergebnisse unterstützen die Daten aus der Membranpräparation (siehe 3.2.3) und lassen den Schluss zu, dass die Aufnahme des ET_{B} -Rezeptors nach Agoniststimulation unabhängig von Arrestin3 abzulaufen scheint. Zur weiteren Analyse und zur Untermauerung dieses Befundes

wurden Internalisierungsstudien an embryonalen Fibroblastenzellen aus der Maus vorgenommen, die weder Arrestin2 noch Arrestin3 exprimieren.

3.3.3 Internalisierung des ET_B-Rezeptors in MEF-Zellen

Für die abschließende Beurteilung der Bedeutung von Arrestin3 für die Internalisierung des ET_B -Rezeptors wurden MEF-Zellen (*mouse embryonic fibroblasts*) genutzt (Kohout et al. 2001), die einen *knock-out* im Gen für das Arrestin3 (*arr3^{-/-}*) oder einen Doppel-*knock-out* in den Genen für das Arrestin2 und das Arrestin3 aufweisen (*arr2^{-/-}/arr3^{-/-}*). Es sollte untersucht werden, ob die Rezeptorinternalisierung in diesen Zellen überhaupt möglich ist.

Die wildtypischen MEF-Zellen und die *knock-out*-Zellen MEF-arr3^{-/-} bzw. MEF-arr2^{-/-}/arr3^{-/-} wurden transient mit dem Plasmid pEGFP::ET_B.flag transfiziert. Anschließend wurde die Fähigkeit der Rezeptorinternalisierung an lebenden Zellen mit einem Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Nach Einstellung der Zellen wurde die Zeitserie gestartet und nach Zugabe von 25 nM Cy3.5-ET1 die Internalisierung des Cy3.5-ET1/ET_BR-Komplexes beoachtet. In Abb. 18 sind mikroskopische Aufnahmen der MEF-Zellen zu sehen. Es wurde die GFP-Fluoreszenz des ET_B-Rezeptors aufgenommen und in grün dargestellt. Die anschließende Aufnahme der Cyan-Fluoreszenz des Cy3.5-ET1 ist in rot dargestellt. Nach computergestützter Überlagerung beider Signale zeigt die gelbe Färbung eine Co-Lokalisation, in diesem Fall von Rezeptor und Ligand, an.



Abb. 18: Internalisierung des ET_B -Rezeptors in MEF-Zellen. Die Zellen, die transient den Rezeptor ET_B -flag.GFP (grün) exprimieren, wurden mit 25 nM Cy3.5-ET1 (rot) stimuliert. Die computergestützte Überlagerung beider Signale ist in gelb dargestellt. Maßstab: 10 µm.

3.4 Untersuchung weiterer potentieller Signale im C-Terminus des ET_B-Rezeptors

Der C-Terminus des ET_B-Rezeptors weist neben dem tyrosinhaltigen Motiv GYXXF noch weitere potentielle Motive auf. Zum einen sind mehrere Serine (S435, 436, 440, 441, 442) und ein weiteres Tyrosin (Y439) vorhanden, die über ihren Phosphorylierungsstatus regulatorisch wirksam werden könnten (siehe Abb. 19). Außerdem findet sich ein potentielles *coiled-coil*-Motiv im proximalen Teil des C-Terminus.



Abb. 19: Weitere potentielle regulatorische Motive im C-Terminus des ET_B -Rezeptors. Schematische Abbildung des ET_B -Rezeptors mit sieben Transmembranregionen, dem extrazellulären N-Terminus und dem intrazellulären C-Terminus, wobei der C-Terminus im Einbuchstabencode dargestellt ist. Das potentielle *coiled-coil*-Motiv ist blau, die Serine sind orange und das Tyrosin ist grün unterlegt.

In Zusammenarbeit mit G. Krause (FMP Berlin) wurde durch computergestützte Voraussagen ein 3D-Strukturmodell berechnet, welches eine Homodimerisierung des ET_B-Rezeptors unterstützt. Dieses in Abb. 20 dargestellte Modell lässt theoretisch auch Interaktionen mit anderen Proteinpartnern mit entsprechendem *coiled-coil*-Motiv zu.



Abb. 20: 3D-Strukturmodell des ET_B -Rezeptors. A: Das Bild zeigt eine mögliche Homodimerisierung des ET_B -Rezeptors (gelb) über seinen C-Terminus (rot). B: In dieser Darstellung ist nur der C-Terminus zu sehen (weiß), wobei einzelne Aminosäuren des *coiled-coil*-Motivs (orange) detailliert dargestellt sind.

Für die nähere Charakterisierung der potentiellen Motive im C-Terminus des ET_B-Rezeptors wurden einzelne Aminosäureaustausche vorgenommen. Es erfolgte ein Austausch der fünf Serinreste an den Positionen S435, 436, 440, 441 und 442 gegen Alanin oder Glutamat. Das Tyrosin an der Positon Y439 wurde ebenfalls gegen Alanin oder Glutamat ausgetauscht. Für die Untersuchungen des *coiled-coil*-Motivs sollten die Aminosäuren E410, K411,

L414 und L421, die vermutlich sehr stark die Funktionalität dieses Motivs ausmachen, gegen Alanin ausgetauscht werden. Es wurde davon ausgegangen, dass die Mutationen dieser Aminosäuren eine Zerstörung des potentiellen *coiled-coil*-Motivs nach sich zieht. Alle Aminosäureaustausche wurden durch ortsgerichtete Mutagenese (QuikChange[®] Site-directed Mutagenesis Kit, Stratagene) auf der Basis des Plasmides pEGFP::ET_B.flag vorgenommen, welches für den flag-fusionierten ET_B-Rezeptor kodiert. Die eingefügten Mutationen wurden anschließend durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Eine Übersicht über die erhaltenen Plasmide und die verschiedenen Mutationen, die vorgenommen wurden, gibt die Tab. 21 wieder.

Tab. 21: Übersicht verschiedener ET_B -Rezeptoren mit verändertem C-Terminus. Die durch Mutagenese erhaltenen Plasmide (linke Spalte) und die dazugehörigen Rezeptoren mit entsprechenden Veränderungen in der Aminosäuresequenz (mittlere Spalte) sind im Vergleich zum wildtypischen ET_B -Rezeptor (unterstrichen) aufgelistet. Die Darstellung des C-Terminus des wildtypischen ET_B -Rezeptors erfolgte ab der Palmitoylierungsstelle (C403/C405) im Einbuchstabencode. Bei den mutierten ET_B -Rezeptoren wurden jeweils nur die ausgetauschten Aminosäuren fett gedruckt dargestellt.

		<u>403</u>	<u>410</u>	<u>421</u>	<u>435</u>	<u>440</u>
pEGFP::ET _B .flag	_ <u>ET_B Wildtyp:</u>	-ċwcrs	FE ÉK QSLEE	EKQSCLKFKAND	HGYDNFR SS NK	<u>rsss</u>
pEGFP::Y439A.ET _B .flag	Y439A.ET _B				/	۹
pEGFP::Y439D.ET _B .flag	Y439D.ET _B				I	—
pEGFP::S2A.ET _B .flag	S435,436A.ET _B				—— AA —	
pEGFP::S2D.ET _B .flag	S435,436D.ET _B				DD	
pEGFP::S3A.ET _B .flag	S440-442A.ET _B					AAA
pEGFP::S3D.ET _B .flag	S440-442D.ET _B					-DDD
pEGFP::S5A.ET _B .flag	S435,436,440-442A.ET _B				—— AA—	AAA
pEGFP::S5D.ET _B .flag	S435,436,440-442D.ET _B				DD	-DDD
pEGFP::E410/K411A.ET _B .flag	E410A/K411A.ET _B		— AA——			
pEGFP::L414/421A.ET _B .flag	L414/421A.ET _B		——A—	—— A———		

Es erfolgte die Untersuchung der mutierten Rezeptoren hinsichtlich ihrer Oberflächenexpression mittels Laser-Scanning-Mikroskopie. Dabei wurden HEK293-Zellen mit den Plasmiden transfiziert, die für verschiedene Formen des C-terminal GFP-fusionierten ET_B-Rezeptors kodieren (S435,436A.ET_B.flag, S435,436D.ET_B.flag, S440-442A.ET_B.flag, S440- $442 D. \text{ET}_{\text{B}}. \text{flag}, \hspace{0.2cm} \text{S435}, 436, 440-442 A. \text{ET}_{\text{B}}. \text{Flag}, \hspace{0.2cm} \text{S435}, 4$ Y439A.ET_B.flag, Y439D.ET_B.flag, E410/K411A.ET_B.flag, L414/421A.ET_B.flag). Nach 24 h erfolgte die Mikroskopie unstimulierter lebender Zellen. Die mikroskopischen Aufnahmen sind in Abb. 21 dargestellt.



Abb. 21: Oberflächenexpression des ET_B -Rezeptors mit Veränderungen im C-Terminus. Laser-Scanning-Mikroskopie von HEK293-Zellen, die transient verschiedene Formen des ET_B -Rezeptors exprimieren. Maßstab: 10 µm.

Der wildtypische ET_B -Rezeptor ist hauptsächlich in der Plasmamembran lokalisiert. Nur wenig intrazelluläre Fluoreszenz ist nachweisbar. Sobald der C-Terminus durch Aminosäureaustausche verändert wurde, war eine deutliche intrazelluläre Fluoreszenz vorhanden, die z. T. vesikuläre Strukturen aufwies. Diese Strukturen sind entweder als kleine Vesikel mit diffusem Hintergrund, wie im Falle des ET_B -Rezeptors mit einer Mutation des Tyrosins an Position 439 zu Alanin oder Glutamat, oder die Vesikel sind intensiver in der Fluoreszenz, wie bei den ET_B -Rezeptoren mit Mutationen in den Serinen an den Positionen 435, 436, 440, 441 und 442. Dabei ist es unerheblich, ob die Serine gegen Alanin oder Glutamat ausgetauscht wurden. Es war jedoch bei allen mutierten ET_B -Rezeptoren eine deutliche Membranständigkeit nachweisbar. Bei Mutationen des *coiled-coil*-Motivs ist der ET_B -Rezeptor sehr stark in intrazellulären Strukturen im Cytoplasma nachweisbar. Hier zeigt sich das stärkste intrazelluläre Fluoreszenzsignal im Vergleich zu ET_B -Rezeptoren mit Veränderungen in den Serinen oder dem Tyrosin.

4 Diskussion

4.1 Identifizierung des Internalisierungssignals

Der ET_B-Rezeptor internalisiert Ligand-induziert über Clathrin-haltige Vesikel. Dabei bilden der Rezeptor und sein Ligand ET1 einen sehr stabilen Komplex, der während des intrazellulären Transportes durch die verschiedenen Kompartimente bis in die Lysosomen/späten Endosomen weitestgehend intakt bleibt. Die Visualisierung der Internalisierung des ET_B-Rezeptors kann somit sowohl über den GFP-fusionierten Rezeptor als auch über einen Fluorophor-markierten Liganden erfolgen (Oksche et al. 2000). Dabei verändern die GFP-Fusion an den ET_B-Rezeptor bzw. die Fluorophor-Markierung des ET1 weder die Rezeptoreigenschaften noch die Ligandspezifitäten. Der Komplex aus ET1 und ET_B-Rezeptor wird nach Internalisierung in die späten Endosomen/Lysosomen transportiert und dort abgebaut. Im Gegensatz dazu durchläuft der ET_A-Rezeptor, ein weiterer Vertreter der Familie der Endothelinrezeptoren, das sogenannte recycling. wieder Nach Internalisierung wird der ET_A-Rezeptor zurück zur Zelloberfläche transportiert. Das Motiv, welches für das recycling des ET_A-Rezeptors verantwortlich ist, wurde im C-Terminus identifiziert (Bremnes et al. 2000). Der ET_B-Rezeptor trägt kein solches Motiv in seinem C-Terminus und es sind bisher noch keine Motive identifiziert worden, die für die Regulation der Internalisierung zuständig sind. Eine Analyse des C-Terminus erbrachte, dass ein Tyrosin-haltiges Motiv, ein Serin-Cluster und ein coiledcoil-Motiv vorliegen könnte, die als potentielle Regulationsbereiche fungieren könnten.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, ein im C-Terminus des ET_B -Rezeptors lokalisiertes, Tyrosin-haltiges Motiv vom Typ GYXX Φ (wobei X für eine beliebige und Φ für eine hydrophobe Aminosäure steht) zu identifizieren, dem eine große Rolle in der Agonist-induzierten Internalisierung

zugeschrieben werden konnte. Mutierte Formen der ET_B -Rezeptoren, bei denen verschiedene Veränderungen des GYXXF-Motivs vorgenommen wurden, zeigten ein deutlich verzögertes Internalisierungsverhalten nach Agonist-Stimulation. Dabei war es unerheblich, ob ein Austausch aller drei Aminosäuren des Motivs gegen Alanin erfolgte (GYF \rightarrow AAA) oder nur ein Aminosäureaustausch des Tyrosinrestes (GYF \rightarrow GAF) vorgenommen wurde. Auch die Deletion des distalen Bereiches des C-Terminus inklusive des GYXXF-Motivs (Δ GYF) ergab keine Veränderungen hinsichtlich des Ausmaßes der Einschränkung der Internalisierung.

Dieses Tyrosin-haltige Motiv ist erstmals bei den lysosomal-assoziierten Membranproteinen Lamp1 und Lamp2 beschrieben und untersucht worden. In diesem Fall ist dieses Motiv essentiell für die korrekte Sortierung in die Lysosomen. Mutationen in diesem Motiv führten zu einer Akkumulation der Lamp-Proteine an der Zelloberfläche (Williams and Fukuda 1990). Charakteristisch für den ET_B-Rezeptor ist der lysosomale Transport nach ET1-Stimulation (Oksche et al. 2000; Paasche et al. 2001). Mit Hilfe der LT-PAGE (low-temperature-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) lässt sich die lysosomale Degradation des ET_B-Rezeptors analysieren (Grantcharova et al. 2002). Untersuchungen des wildtypischen und einer mutierten Form des ET_B -Rezeptors (GYF \rightarrow AAA) führten zu dem Ergebnis, dass sich das Bandenmuster im Westernblot bei beiden Rezeptorvarianten nicht unterschied. Dies spricht dafür, dass der Transport des Komplexes aus ET1 und ET_B-Rezeptor in die Lysosomen durch die Veränderung im C-Terminus unbeeinträchtigt ist.

Sehr interessant ist dieses als lysosomales Sortierungssignal beschriebene Motiv im Zusammenhang mit der Internalisierung. Es ist nachgewiesen, dass Proteine und synthetisierte Peptide, die verschiedene Formen des YXX Φ -Motivs enthalten, mit dem Adaptorprotein-Komplex 2 (AP-2), insbesondere der µ2-Untereinheit, interagieren (Ohno et al. 1995; Boll et al. 1996; Ohno et al. 1998; Aguilar et al. 2001). AP-2 stellt einen heterotetrameren Proteinkomplex dar, bestehend aus den Untereinheiten α , β 2, µ2 und σ 2, und wird als eine Schlüsselkomponente der Internalisierung von

Transmembranrezeptoren angesehen (Owen et al. 2004). Dabei erfolgt die Interaktion der YXX Φ -Peptidsequenz mit dem AP-2 über eine hydrophobe Bindungstasche in der µ2-Untereinheit (Owen and Evans 1998). Es wird postuliert, dass nach Phosphorylierung der µ2-Untereinheit durch die AAK1 (AP-2 assoziierte Kinase 1) eine Konformationsänderung induziert wird, die zur Freilegung dieser hydrophoben Bindungstasche führt (Collins et al. 2002; Conner et al. 2002; Ricotta et al. 2002). Es wurde außerdem gezeigt, dass die β2-Untereinheit an Clathrin, eine Hauptkomponente der Vesikel bei der Endozytose von Rezeptoren, bindet, während die α -Untereinheit von AP-2 mit verschiedenen Hilfsproteinen interagiert, die an der Assemblierung der Vesikelhülle und/oder der Formierung von Clathrin-Vesikeln beteiligt sind, (Gallusser and Kirchhausen 1993; Owen and Luzio 2000). Somit spielt der Proteinkomplex AP-2 eine entscheidende Rolle bei der Internalisierung des Thrombinrezeptors und des Transferrinrezeptors (Nesterov et al. 1999; Paing et al. 2006).

4.2 Interaktion des ET_B-Rezeptors mit Arrestin3 und AP-2

Arrestine (Arrestin2 und Arrestin3) sind ubiquitär exprimierte, cytosolische Proteine, die an der Desensitivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren beteiligt sind (Ferguson 2001). Agonist-Stimulation führt zur Phosphorylierung intrazellulärer Rezeptorbereiche, was die Bindung der Arrestine an den aktivierten Rezeptor erleichtert. Die Bindung von Arrestin wiederum verhindert die Kopplung der Rezeptoren an G-Proteine und unterbricht damit die Signalkaskade. Arrestine spielen außerdem eine große Rolle in der Rezeptor-vermittelten Endozytose, indem sie direkt mit Clathrin und mit AP-2 interagieren können. Obwohl viele Agonist-stimulierte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren Arrestin zur Plasmamembran rekrutieren, gibt es große Unterschiede in der Stabilität des Arrestin-Rezeptor-Komplexes. Im Fall des AT1-Rezeptors dissoziieren Arrestin und Rezeptor noch auf dem Weg in die Endosomen, während der V₂-Rezeptor einen stabilen Komplex mit Arrestin bildet, der entlang des intrazellulären Transports stabil ist (Oakley et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurden zum einen die Rolle von Arrestin3 hinsichtlich einer möglichen Interaktion und zum anderen die sich daraus ableitende Rolle bei der Internalisierung des ET_B-Rezeptors untersucht. In GST-Pulldown-Analysen mit Fusionsproteinen bestehend aus dem GST-Protein und verschiedenen cytoplasmatischen Bereichen des ET_B-Rezeptors und des V₂-Rezeptors wurde die Interaktion mit Arrestin3 untersucht. Der V₂-Rezeptor diente in diesen Experimenten als Positivkontrolle, da dieser eine langanhaltende Assoziation mit Arrestin3 aufweist (Minuten). Während in GST-Pulldown-Experimenten mit der dritten intrazellulären Schleife des V₂-Rezeptors und Lysaten von Arrestin3-exprimierenden Zellen eine Interaktion nachgewiesen werden konnte, war für den ET_B-Rezeptor keine Interaktion von Arrestin3 mit der dritten intrazellulären Schleife nachweisbar. Im Fall des ET_A-Rezeptors war für GST-Fragmente der dritten intrazellulären Schleife nur eine geringe Interaktion mit Arrestin3 nachweisbar (siehe Abb. 12).

Um die im GST-Pulldown nachgewiesene Interaktion von heterolog exprimierten ET_B -Fusionsproteinen im humanen Zellsystem zu bestätigen, erfolgte ein Co-Immunopräzipitationsexperiment. Hierbei war zusätzlich die Untersuchung des Einflusses von ET1 auf die Interaktion von Arrestin3 und ET_B -Rezeptor möglich. Nach Immunopräzipation des ET_B -Rezeptors war Arrestin im Westernblot nachweisbar. Dabei war es jedoch unerheblich, ob der Rezeptor durch ET1 stimuliert wurde. Die Stimulation des ET_B -Rezeptors mit ET1 unmittelbar vor dem Zellaufschluss führte zu keiner Zunahme von ET_B -Rezeptor-assoziiertem Arrestin3. Um zu prüfen, ob Detergenzien beim Zellaufschluss die Interaktion des ET_B -Rezeptors mit Arrestin3 stören, wurde zusätzlich mit einem Detergenz-freien, experimentellen Ansatz die ET1abhängige Rekrutierung von Arrestin3 an den ET_B -Rezeptor untersucht. Die Membranpräparation von HEK293-Zellen, die transient den ET_B -Rezeptor und Arrestin3.GFP co-exprimierten, erfolgte über einen Optiprep-Gradienten. Es war wieder ein schwaches Signal von Arrestin3 unter unstimulierten

Bedingungen nachweisbar. Die ET1-Stimulation führte auch hier zu keiner Erhöhung des Arrestin3-Signals. Für HEK-Zellen, die den V₂-Rezeptor und Arrestin3 co-exprimierten, konnte eine AVP-induzierte Arrestin3-Rekrutierung an die Plasmamembran nachgewiesen werden.

Die Bindung von Arrestin unter unstimulierten Bedingungen wurde schon für andere Rezeptoren nachgewiesen, unter anderem für den ET_A -Rezeptor (Imamura et al. 2001), den β_2 -Adrenergen Rezeptor (Luttrell et al. 1999; Shenoy et al. 2001) und den Angiotensin-Rezeptor AT_{1a} (Luttrell et al. 2001). Allerdings war nach Agoniststimulation für diese Rezeptoren eine deutlich gesteigerte Arrestinrekrutierung nachweisbar, wie auch im Falle des V2-Rezeptors.

4.3 Modulation der ET_B-Rezeptorinternalisierung durch Co-Expression von Arrestin und Dynamin

Zur Klärung der Frage, welchen Einfluss Arrestin auf die Internalisierung des ET_B-Rezeptors hat, wurden HEK293-Zellen, die zum einen den ET_B-Rezeptor und zum anderen das Arrestin3 oder V54D.Arrestin3 coexprimieren, in einem ELISA-Experiment untersucht. Die Arrestin3-Variante mit einer Veränderung in der Aminosäure Valin an der Position 54 ist als dominant-negative Form beschrieben. So hemmt V54D.Arrestin3 die Internalisierung des Chemokinrezeptors CXCR4 (Cheng et al. 2000). Auch beim β 2-adrenergen Rezeptor (β 2-AR) führt die Überexpression der mutierten Form V54D.Arrestin3 zu einer vollständigen Blockierung der Internalisierung (Lee et al. 1998). Die Analyse der Internalisierung des ET_B-Rezeptors in Gegenwart von V54D.Arrestin3 ergab jedoch keinen negativen Einfluss auf die Internalisierung. Ebenfalls ohne Einfluss war die Gegenwart von überexprimiertem, wildtypischem Arrestin3. Dies steht im Einklang mit den Befunden für die mACh-Rezeptoren (muscarinerge Acetylcholin-Rezeptoren). Die Subtypen m1, m3 und m4 zeigten ebenfalls keinen Einfluss des überexprimierten Arrestin3 auf die Internalisierung (Lee et al. 1998).

Hingegen führte wildtypisches Arrestin3 unter gleichen Bedingungen zu einer gesteigerten Internalisierung beim β 2-AR (Ferguson et al. 1996).

Als Kontrolle, dass die Internalisierung des ET_B-Rezeptors beeinflussbar ist und dies durch ELISA-Untersuchungen nachgewiesen werden kann, wurde die bereits bekannte Dynamin-Abhängigkeit (Paasche et al. 2001) der Internalisierung des ET_B-Rezeptors untersucht. Dazu wurden HEK293-Zellen analysiert, die den ET_B-Rezeptor und die dominant-negative Mutante des (K44A.Dynamin) co-exprimieren. In Dynamins Gegenwart von K44A.Dynamin war die Internalisierung des ET_B-Rezeptors fast vollständig inhibiert. Die Dynamin-Abhängigkeit der Internalisierung des ET_B-Rezeptors konnte hiermit bestätigt werden. Mikroskopische Analysen lebender HEK293-Zellen, die transient den ET_B-Rezeptor und die dominant-negative Mutante des Dynamins (K44A.Dynamin) und/oder eine Form des Arrestin3.GFP (wildtypische oder mutierte Form) exprimierten, bestätigten die Befunde der ELISA-Untersuchungen. HEK293-Zellen, die transient den ET_B-Rezeptor, das Arrestin3.GFP und das K44A.Dynamin co-exprimierten, zeigten nach ET1-Stimulation eine Akkumulation von Arrestin.3 an der Plasmamembran. Dies ist vermutlich auf die Interaktion von Arrestin3 mit dem Dynamin zurückzuführen, denn bekanntermaßen besitzt Arrestin3 eine Dynamin-Bindedomäne (Krupnick et al. 1997; Kim and Benovic 2002).

Um aus den vorangegangenen Versuchen den Schluss einer Arrestinunabhängigen Internalisierung des ET_B-Rezeptors zulassen zu können, erfolgten schließlich Versuche mit embryonalen Fibroblasten aus der Maus (MEF-Zellen), die entweder einen knock-out in dem Gen für Arrestin3 (MEFarr3^{-/-}) oder einen knock-out der beiden Gene für Arrestin2 und Arrestin3 (MEF-arr2-/-/arr3-/-) aufwiesen. Die mit Hilfe der Laser-Scanning-Mikroskopie analysierten, lebenden MEF-Zellen, die transient den GFP-fusionierten ET_B-Rezeptor exprimierten, zeigten eine Internalisierung des ET_B-Rezeptors nach ET1-Stimulation. Damit ist die Internalisierung des ET_B-Rezeptors Arrestinunabhängig. Ähnliche Befunde sind auch für den metabotropen Glutamatrezeptor 1, dem 5-Hydroxytryptamin-2A-Rezeptor, Formylpeptid-Rezeptor, dem Thrombin-Rezeptor und dem Urotensin-Rezeptor gezeigt

worden (Paing et al. 2002; Gray et al. 2003; Vines et al. 2003; Dhami et al. 2004; Giebing et al. 2005).

Anhand der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente kann beurteilt werden, inwieweit Arrestin für jedoch nicht andere extracellular Signalwegaktivierungen signal-regulated (ERK-Kaskade, kinases) oder die Desensitivierung des ET_B-Rezeptors essentiell ist. So ist für den PAR1-Rezeptor gezeigt, dass die Internalisierung zwar Dynaminabhängig iedoch unabhängig von Arrestin verläuft, während die Desensitivierung Arrestin-abhängig ist (Paing et al. 2002). Es ist möglich, dass Arrestin an der Desensitivierung des ET_B-Rezeptors beteiligt ist, die Interaktion von Arrestin mit dem aktivierten Rezeptor jedoch transient ist und unter der Nachweisgrenze der hier durchgeführten Experimente liegt.

4.4 Arrestin-unabhängige Internalisierung

Wenn Arrestin nicht für die Interaktion von Rezeptor und Internalisierungsmaschinerie verantwortlich ist, so kann möglicherweise der Adapterproteinkomplex 2 (AP-2) diese Rolle übernehmen. AP-2 ist mittels seiner µ2-Untereinheit in der Lage, mit Proteinen eine Wechselwirkung einzugehen, die ein Tyrosin-haltiges Motiv des Typs GYXXF enthalten. vermittelt werden. Somit wäre auch ohne Arrestin die Rekrutierung aktivierter Rezeptoren zu Clathrinvesikeln möglich. Da der ET_B-Rezeptor solch ein Tyrosin-haltiges Motiv im C-Terminus trägt, welches zudem nach Mutation zu einer verzögerten Internalisierung führt, sollte zunächst mit Hilfe der GST-Pulldown-Analyse eine Interaktion mit der µ2-Untereinheit des AP-2-Komplexes nachgewiesen werden. Das Signal für den ET_B-Rezeptor war jedoch im Vergleich zum V_2 -Rezeptor recht schwach, sodass andere Versuche dieses Ergebnis bestätigen sollten. Der Nachweis der direkten Interaktion zwischen dem C-Terminus des ET_B-Rezeptors und der µ2-Untereinheit des AP-2 über das Yeast-2-Hybrid-System war jedoch nicht möglich. Dieses Ergebnis ist durch die Tatsache erklärbar, dass die hydrophobe Bindetasche innerhalb der μ 2-Untereinheit, die für die Interaktion mit GYXXF-haltigen Peptiden verantwortlich ist, erst nach Phosphorylierung freigelegt wird (Owen et al. 2004). Es ist außerdem möglich, dass der Nachweis einer potentiellen Interaktion nur unter stimulierten Bedingungen und unter Einbeziehung des Signalsystems der Zelle möglich ist. Co-Immunopräzipitationen an HEK293-Zellen, die transient den ET_B-Rezeptor exprimerten, führten allerdings auch zu keinem positiven Interaktionsnachweis.

Bislang ist nur für wenige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren eine direkte Interaktion mit der µ2-Untereinheit nachgewiesen worden. Der erste Rezeptor war der α_{1b} -AR (adrenerger Rezeptor) (Diviani et al. 2003), der über ein Polyarginin-Motiv in seinem C-Terminus mit der µ2-Untereinheit interagiert. Ein Motiv dieser Art ist in dem ET_B-Rezeptor nicht vorhanden. Ein weiterer Rezeptor, für den die Interaktion mit µ2 nachgewiesen wurde, ist der PAR1-Rezeptor (Protease-aktivierter Rezeptor 1). Dieser enthält wie der ET_B-Rezeptor ein Tyrosin-haltiges Motiv in seinem C-Terminus. Der inaktive PAR1-Rezeptor internalisiert konstitutiv, durchläuft den Recycling-Weg und wird wieder zurück zur Zelloberfläche transportiert. Es wurde gezeigt, dass AP-2 direkt mit dem Tyrosin-haltigen Motiv interagiert und essentiell für die konstitutive Internalisierung ist (Paing et al. 2006). Der Nachweis der Interaktion erfolgte in einem GST-Pulldown mit 20 µg der aufgereinigten, His₆-Tag-fusionierten µ2-Untereinheit und anschließender Detektion in einem Immunoblot mit einem Antikörper gegen den His₆-Tag. In den GST-Pulldown-Experimenten in dieser Arbeit erfolgte der Nachweis der Interaktion mit der in HEK293-Zellen endogen exprimierten µ2-Untereinheit. Die Menge an µ2-Protein in dem Zelllysat ist vermutlich unter der Nachweisgrenze gewesen. Ein GST-Pulldown mit überexprimierten µ2-Proteinen könnte Aufschluss über eine Interaktion mit dem C-Terminus des ET_B-Rezeptors geben.

4.5 Intrazelluläre Verteilung des ET_B-Rezeptors bei C-terminalen Veränderungen

Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Godovac-Zimmermann, bei denen phosphorylierte Serine im C-Terminus des bovinen ET_B-Rezeptors identifiziert wurden, lieferten Anhaltspunkte dafür, dass die Serine im C-Terminus des ET_B-Rezeptors regulatorische Funktion besitzen könnten (Roos et al. 1998). Diese Serine sind nicht im C-Terminus des ET_A-Rezeptors vorhanden. Zusätzlich zu den Serinen enthält der C-Terminus des ET_B-Rezeptors ein *coiled-coil*-Motiv und ein Tyrosin an der Position 439, welches phosphoryliert werden könnte. Die experimentellen Daten der LSM zeigen, dass alle Rezeptorformen, die Mutationen im Serincluster, dem coiled-coil-Motiv und dem Tyrosin 439 aufweisen, effektiv an die Zelloberfläche transportiert werden. Es ist jedoch ersichtlich, dass die Veränderungen der potentiellen Motive (S435, 436, 440-442, Y439, coiledcoil-Motiv) durch Aminosäureaustausche zu einer starken Veränderung in der zellulären Verteilung des ET_B-Rezeptors führte. Es sind gegenüber dem wildtypischen ET_B-Rezeptor deutliche intrazelluläre Ansammlungen von Fluoreszenzsignalen nachweisbar. Es spielte dabei keine Rolle, ob durch die Mutation eine Phosphorylierung der Serine bzw. des Tyrosins nachgeahmt (Glutamataustausch) oder die Motive in einen wurde nichtphosphorylierbaren Zustand (Alaninaustausch) versetzt wurden. Der größte Effekt hinsichtlich der Stärke der intrazellulären Ansammlung trat bei coiled-coil-Motivs Mutationen des auf. Diese vorläufigen Untersuchungsbefunde zeigen, dass Veränderungen in diesem Bereich des C-Terminus einen Einfluss auf den intrazellulären Transport haben. Es ist denkbar, dass bei ET_B-Rezeptoren mit mutiertem *coiled-coil*-Motiv eventuelle Motive für den intrazellulären Transport nicht zugänglich sind.

5 Literaturverzeichnis

Aguilar, R. C., Boehm, M., Gorshkova, I., Crouch, R. J., Tomita, K., Saito, T., Ohno, H. and Bonifacino, J. S. (2001). Signal-binding specificity of the μ 4 subunit of the adaptor protein complex AP-4. *J Biol Chem* **276**: 13145-13152.

Anborgh, P. H., Seachrist, J. L., Dale, L. B. and Ferguson, S. S. G. (2000). Receptor/ β -arrestin complex formation and the differential trafficking and resensitization of β 2-adrenergic and angiotensin II type 1A receptors. *Mol Endocrinol* **14**: 2040-2053.

Arai, H., Hori, S., Aramori, I., Ohkubo, H. and Nakanishi, S. (1990). Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* **348**: 730-732.

Baldwin, J. M. (1993). The probable arrangement of the helices in G proteincoupled receptors. *Embo J* **12**: 1693-1703.

Benovic, J. L., Kuhn, H., Weyand, I., Codina, J., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1987). Functional desensitization of the isolated β -adrenergic receptor by the β -adrenergic receptor kinase: Potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proc Natl Acad Sci* **84**: 8879-8882.

Berridge, M. J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**: 315-325.

Boese, G. (2002). Internalisierung, Desensitisierung und polarisierte Oberflächenexpression des Endothelin-B-Rezeptors. <u>Doktorarbeit</u>, Freie Universität Berlin.

Boll, W., Ohno, H., Songyang, Z., Rapoport, I., Cantley, L. C., Bonifacino, J. S. and Kirchhausen, T. (1996). Sequence requirements for the recognition of tyrosine-based endocytic signals by clathrin AP-2 complexes. *Embo J* **15**: 5789-5795.

Bonifacino, J. S., Marks, M. S., Ohno, H. and Kirchhausen, T. (1996). Mechanisms of signal-mediated protein sorting in the endocytic and secretory pathways. *Proc Assoc Am Physicians* **108**: 285-295.

Bonifacino, J. S. and Traub, L. M. (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* **72**: 395-447.

Bourne, H. R. (1997). How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 134-142.

Bremnes, T., Paasche, J. D., Mehlum, A., Sandberg, C., Bremnes, B. and Attramadal, H. (2000). Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. *J. Biol. Chem.* **275**: 17596-17604.

Brown, E. M., Segre, G. V. and Goldring, S. R. (1996). Serpentine receptors for parathyroid hormone, calcitonin and extracellular calcium ions. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **10**: 123-161.

Buck, L. and Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell* **65**: 175-187.

Carman, C. V. and Benovic, J. L. (1998). G-protein-coupled receptors: Turnons and turn-offs. *Curr Opin Neurobiol* **8**: 335-344.

Cheng, Z. J., Zhao, J., Sun, Y., Hu, W., Wu, Y. L., Cen, B., Wu, G. X. and Pei, G. (2000). β -arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between β -arrestin and CXCR4. *J Biol Chem* **275**: 2479-2485.

Collins, B. M., Mccoy, A. J., Kent, H. M., Evans, P. R. and Owen, D. J. (2002). Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell* **109**: 523-535.

Conklin, B. R. and Bourne, H. R. (1993). Structural elements of $G\alpha$ subunits that interact with $G\beta\gamma$, receptors and effectors. *Cell* **73**: 631-641.

Conner, S. D., Schmid, S. L., Ricotta, D., Von Figura, K. and Honing, S. (2002). Identification of an adaptor-associated kinase, AAK1, as a regulator of clathrin-mediated endocytosis. Phosphorylation of the AP2 μ subunit by AAK1 mediates high affinity binding to membrane protein sorting signals. *J Cell Biol* **156**: 921-929.

de Nucci, G., Thomas, R., D'Orleans-Juste, P., Antunes, E., Walder, C., Warner, T. D. and Vane, J. R. (1988). Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci* **85**: 9797-9800.

Dhami, G. K., Dale, L. B., Anborgh, P. H., O'connor-Halligan, K. E., Sterne-Marr, R. and Ferguson, S. S. (2004). G protein-coupled receptor kinase 2 regulator of G protein signaling homology domain binds to both metabotropic glutamate receptor 1a and $G_{\alpha q}$ to attenuate signaling. *J Biol Chem* **279**: 16614-16620.

Divecha, N. and Irvine, R. F. (1995). Phospholipid signaling. *Cell* **80**: 269-278.

Diviani, D., Lattion, A.-L., Abuin, L., Staub, O. and Cotecchia, S. (2003). The adaptor complex 2 directly interacts with the α_{1b} -adrenergic receptor and plays a role in receptor endocytosis. *J. Biol. Chem.* **278**: 19331-19340.

Dixon, R. A., Kobilka, B. K., Strader, D. J., Benovic, J. L., Dohlman, H. G., Frielle, T., Bolanowski, M. A., Bennett, C. D., Rands, E., Diehl, R. E. and Et Al. (1986). Cloning of the gene and cDNA for mammalian β -adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* **321**: 75-79.

Dohlman, H. G., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1987). Structure and function of the β 2-adrenergic receptor--homology with rhodopsin. *Kidney Int Suppl* **23**: S2-13.

Dohlman, H. G., Thorner, J., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1991). Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem* **60**: 653-688.

Farrens, D. L., Altenbach, C., Yang, K., Hubbell, W. L. and Khorana, H. G. (1996). Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science* **274**: 768-770.

Ferguson, S. S. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: The role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* **53**: 1-24.

Ferguson, S. S., Barak, L. S., Zhang, J. and Caron, M. G. (1996). G-proteincoupled receptor regulation: Role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Can J Physiol Pharmacol* **74**: 1095-1110.

Ferguson, S. S., Downey, W. E., 3rd, Colapietro, A. M., Barak, L. S., Menard, L. and Caron, M. G. (1996). Role of β -arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* **271**: 363-366.

Frielle, T., Collins, S., Daniel, K. W., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. and Kobilka, B. K. (1987). Cloning of the cDNA for the human β 1-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci* **84**: 7920-7924.

Gaillard, I., Rouquier, S. and Giorgi, D. (2004). Olfactory receptors. *Cell Mol Life Sci* **61**: 456-469.

Gallusser, A. and Kirchhausen, T. (1993). The β 1 and β 2 subunits of the AP complexes are the clathrin coat assembly components. *Embo J* **12**: 5237-5244.

Gether, U. and Kobilka, B. K. (1998). G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem* **273**: 17979-17982.

Giebing, G., Tölle, M., Jürgensen, J., Eichhorst, J., Furkert, J., Beyermann, M., Neuschafer-Rube, F., Rosenthal, W., Zidek, W., Van Der Giet, M. and Oksche, A. (2005). Arrestin-independent internalization and recycling of the urotensin receptor contribute to long-lasting urotensin II-mediated vasoconstriction. *Circ Res* **97**: 707-715.

Gilman, A. G. (1987). G proteins: Transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* **56**: 615-649.

Goetz, K., Wang, B. C., Leadley, R., Jr., Zhu, J. L., Madwed, J. and Bie, P. (1989). Endothelin and sarafotoxin produce dissimilar effects on renal blood flow, but both block the antidiuretic effects of vasopressin. *Proc Soc Exp Biol Med* **191**: 425-427.

Goodman, O. B., Jr., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H. and Benovic, J. L. (1996). β -arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β -adrenergic receptor. *Nature* **383**: 447-450.

Gough, N. R., Zweifel, M. E., Martinez-Augustin, O., Aguilar, R. C., Bonifacino, J. S. and Fambrough, D. M. (1999). Utilization of the indirect lysosome targeting pathway by lysosome-associated membrane proteins (LAMPs) is influenced largely by the C-terminal residue of their GYXXΦ targeting signals. *J Cell Sci* **112**: 4257-4269.

Grantcharova, E., Furkert, J., Reusch, H. P., Krell, H.-W., Papsdorf, G., Beyermann, M., Schülein, R., Rosenthal, W. and Oksche, A. (2002). The extracellular N terminus of the endothelin B (ET_B) receptor is cleaved by a metalloprotease in an agonist-dependent process. *J Biol Chem* **277**: 43933-43941.

Gray, J. A., Compton-Toth, B. A. and Roth, B. L. (2003). Identification of two serine residues essential for agonist-induced 5-HT_{2A} receptor desensitization. *Biochemistry* **42**: 10853-10862.

Gregan, B., Jürgensen, J., Papsdorf, G., Furkert, J., Schaefer, M., Beyermann, M., Rosenthal, W. and Oksche, A. (2004). Ligand-dependent differences in the internalization of endothelin A and endothelin B receptor heterodimers. *J Biol Chem* **279**: 27679-27687.

Hamm, H. E. and Gilchrist, A. (1996). Heterotrimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* **8**: 189-196.

Harter, C. and Mellman, I. (1992). Transport of the lysosomal membrane glycoprotein lgp120 (lgp-a) to lysosomes does not require appearance on the plasma membrane. *J Cell Biol* **117**: 311-325.

Hausdorff, W. P., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1990). Turning off the signal: Desensitization of β -adrenergic receptor function. *FASEB J* **4**: 2881-2889.

Hinojosa-Laborde, C., Osborn, J. W., Jr. and Cowley, A. W., Jr. (1989). Hemodynamic effects of endothelin in conscious rats. *Am J Physiol* **256**: H1742-1746.

Hirst, J., Bright, N. A., Rous, B. and Robinson, M. S. (1999). Characterization of a fourth adaptor-related protein complex. *Mol Biol Cell* **10**: 2787-2802.

Horn, F., Bettler, E., Oliveira, L., Campagne, F., Cohen, F. E. and Vriend, G. (2003). GPCRDB information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res* **31**: 294-297.

Hosoda, K., Nakao, K., Hiroshi-Arai, Suga, S., Ogawa, Y., Mukoyama, M., Shirakami, G., Saito, Y., Nakanishi, S. and Imura, H. (1991). Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett* **287**: 23-26.

Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. and Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci* **84**: 9265-9269.

Imamura, T., Huang, J., Dalle, S., Ugi, S., Usui, I., Luttrell, L. M., Miller, W. E., Lefkowitz, R. J. and Olefsky, J. M. (2001). β-arrestin-mediated recruitment of the src family kinase yes mediates endothelin-1-stimulated glucose transport. *J Biol Chem* **276**: 43663-43667.

Jackson, A. P., Flett, A., Smythe, C., Hufton, L., Wettey, F. R. and Smythe, E. (2003). Clathrin promotes incorporation of cargo into coated pits by activation of the AP2 adaptor μ 2 kinase. *J Cell Biol* **163**: 231-236.

Ji, T. H., Grossmann, M. and Ji, I. (1998). G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem* **273**: 17299-17302.

Kim, Y.-M. and Benovic, J. L. (2002). Differential roles of arrestin-2 interaction with clathrin and adaptor protein 2 in G protein-coupled receptor trafficking. *J Biol Chem* **277**: 30760-30768.

Kohout, T. A. and Lefkowitz, R. J. (2003). Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol Pharmacol* **63**: 9-18.

Kohout, T. A., Lin, F. S., Perry, S. J., Conner, D. A. and Lefkowitz, R. J. (2001). β -arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking. *Proc Natl Acad Sci* **98**: 1601-1606.

Krupnick, J. G. and Benovic, J. L. (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**: 289-319.

Krupnick, J. G., Goodman, O. B., Jr., Keen, J. H. and Benovic, J. L. (1997). Arrestin/clathrin interaction. Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxy terminus. *J Biol Chem* **272**: 15011-15016.

Kubo, T., Fukuda, K., Mikami, A., Maeda, A., Takahashi, H., Mishina, M., Haga, T., Haga, K., Ichiyama, A., Kangawa, K. et al. (1986). Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **323**: 411-416.

Larhammar, D., Blomqvist, A. G. and Wahlestedt, C. (1993). The receptor revolution--multiplicity of G-protein-coupled receptors. *Drug Des Discov* **9**: 179-188.

Lee, K. B., Pals-Rylaarsdam, R., Benovic, J. L. and Hosey, M. M. (1998). Arrestin-independent internalization of the m1, m3, and m4 subtypes of muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem* **273**: 12967-12972.

Lefkowitz, R. J. (1993). G protein-coupled receptor kinases. Cell 74: 409-412.

Lohse, M. J., Andexinger, S., Pitcher, J., Trukawinski, S., Codina, J., Faure, J. P., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1992). Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of β -arrestin and arrestin in the β 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *J Biol Chem* **267**: 8558-8564.

Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1990). β -arrestin: A protein that regulates β -adrenergic receptor function. *Science* **248**: 1547-1550.

Luttrell, L. M., Ferguson, S. S., Daaka, Y., Miller, W. E., Maudsley, S., Della Rocca, G. J., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D. K., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1999). β -arrestin-dependent formation of β 2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* **283**: 655-661.

Luttrell, L. M. and Lefkowitz, R. J. (2002). The role of β -arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* **115**: 455-465.

Luttrell, L. M., Roudabush, F. L., Choy, E. W., Miller, W. E., Field, M. E., Pierce, K. L. and Lefkowitz, R. J. (2001). Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by β -arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci* **98**: 2449-2454.

Marks, M. S., Roche, P. A., Van Donselaar, E., Woodruff, L., Peters, P. J. and Bonifacino, J. S. (1995). A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the β chain directs HLA-DM to MHC class II compartments. *J Cell Biol* **131**: 351-369.

Masu, Y., Nakayama, K., Tamaki, H., Harada, Y., Kuno, M. and Nakanishi, S. (1987). cDNA cloning of bovine substance-K receptor through oocyte expression system. *Nature* **329**: 836-838.

Miyauchi, T. and Goto, K. (1999). Heart failure and endothelin receptor antagonists. *Trends Pharmacol Sci* **20**: 210-217.

Neer, E. J. (1995). Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**: 249-257.

Nesterov, A., Carter, R. E., Sorkina, T., Gill, G. N. and Sorkin, A. (1999). Inhibition of the receptor-binding function of clathrin adaptor protein AP-2 by dominant-negative mutant μ 2 subunit and its effects on endocytosis. *EMBO J* **18**: 2489-2499.

Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S. and Caron, M. G. (1999). Association of β -arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem* **274**: 32248-32257.

Ogawa, Y., Nakao, K., Arai, H., Nakagawa, O., Hosoda, K., Suga, S., Nakanishi, S. and Imura, H. (1991). Molecular cloning of a non-isopeptideselective human endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **178**: 248-255.

Ohno, H., Aguilar, R. C., Yeh, D., Taura, D., Saito, T. and Bonifacino, J. S. (1998). The medium subunits of adaptor complexes recognize distinct but overlapping sets of tyrosine-based sorting signals. *J Biol Chem* **273**: 25915-25921.

Ohno, H., Stewart, J., Fournier, M. C., Bosshart, H., Rhee, I., Miyatake, S., Saito, T., Gallusser, A., Kirchhausen, T. and Bonifacino, J. S. (1995). Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* **269**: 1872-1875.

Oksche, A., Boese, G., Horstmeyer, A., Furkert, J., Beyermann, M., Bienert, M. and Rosenthal, W. (2000). Late endosomal/lysosomal targeting and lack of recycling of the ligand-occupied endothelin B receptor. *Mol Pharmacol* **57**: 1104-1113.

Oksche, A., Boese, G., Horstmeyer, A., Papsdorf, G., Furkert, J., Beyermann, M., Bienert, M. and Rosenthal, W. (2000). Evidence for downregulation of the endothelin-B-receptor by the use of fluorescent endothelin-1 and a fusion protein consisting of the endothelin-b-receptor and the green fluorescent protein. *J Cardiovasc Pharmacol* **36**: S44-47.

Owen, D. J., Collins, B. M. and Evans, P. R. (2004). Adaptors for clathrin coats: Structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 153-191.

Owen, D. J. and Evans, P. R. (1998). A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytotic signals. *Science* **282**: 1327-1332.

Owen, D. J. and Luzio, J. P. (2000). Structural insights into clathrin-mediated endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 467-474.

Paasche, J. D., Attramadal, T., Kristiansen, K., Oksvold, M. P., Johansen, H. K., Huitfeldt, H. S., Dahl, S. G. and Attramadal, H. (2005). Subtype-specific sorting of the ET_A endothelin receptor by a novel endocytic recycling signal for G protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol* **67**: 1581-1590.

Paasche, J. D., Attramadal, T., Sandberg, C., Johansen, H. K. and Attramadal, H. (2001). Mechanisms of endothelin receptor subtype-specific targeting to distinct intracellular trafficking pathways. *J Biol Chem* **276**: 34041-34050.

Paing, M. M., Stutts, A. B., Kohout, T. A., Lefkowitz, R. J. and Trejo, J. (2002). β -arrestins regulate protease-activated receptor-1 desensitization but not internalization or down-regulation. *J Biol Chem* **277**: 1292-1300.

Paing, M. M., Temple, B. R. S. and Trejo, J. (2004). A tyrosine-based sorting signal regulates intracellular trafficking of protease-activated receptor-1: Multiple regulatory mechanisms for agonist-induced G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem* **279**: 21938-21947.

Paing, M. M., Johnston, C. A., Siderovski, D. P. and Trejo, J. (2006). Clathrin adaptor AP2 regulates thrombin receptor constitutive internalization and endothelial cell resensitization. *Mol. Cell. Biol.* **26**: 3231-3242.

Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Trong, I. L., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M. and Miyano, M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**: 739-745.

Palmer, R. M., Ferrige, A. G. and Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**: 524-526.

Pierce, K. L., Premont, R. T. and Lefkowitz, R. J. (2002). Seventransmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 639-650.

Ricotta, D., Conner, S. D., Schmid, S. L., Von Figura, K. and Honing, S. (2002). Phosphorylation of the AP2 μ subunit by AAK1 mediates high affinity binding to membrane protein sorting signals. *J Cell Biol* **156**: 791-795.

Roos, M., Soskic, V., Poznanovic, S. and Godovac-Zimmermann, J. (1998). Post-translational modifications of endothelin receptor B from bovine lungs analyzed by mass spectrometry. *J Biol Chem* **273**: 924-931.

Rozengurt, E. (1998). Signal transduction pathways in the mitogenic response to G protein-coupled neuropeptide receptor agonists. *J Cell Physiol* **177**: 507-517.

Sakurai, T., Yanagisawa, M. and Masaki, T. (1992). Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol Sci* **13**: 103-108.

Sakurai, T., Yanagisawa, M., Takuwa, Y., Miyazaki, H., Kimura, S., Goto, K. and Masaki, T. (1990). Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* **348**: 732-735.

Salazar, N. C., Chen, J. and Rockman, H. A. (2007). Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts. *Biochim Biophys Acta* **1768**: 1006-1018.

Schwindinger, W. F. and Robishaw, J. D. (2001). Heterotrimeric G-protein $\beta\gamma$ -dimers in growth and differentiation. *Oncogene* **20**: 1653-1660.

Seo, B., Oemar, B. S., Siebenmann, R., Von Segesser, L. and Luscher, T. F. (1994). Both ET_A and ET_B receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels. *Circulation* **89**: 1203-1208.

Shenoy, S. K., Mcdonald, P. H., Kohout, T. A. and Lefkowitz, R. J. (2001). Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated β 2-adrenergic receptor and β -arrestin. *Science* **294**: 1307-1313.

Shichida, Y. and Imai, H. (1998). Visual pigment: G-protein-coupled receptor for light signals. *Cell Mol Life Sci* **54**: 1299-1315.

Spokes, R. A., Ghatei, M. A. and Bloom, S. R. (1989). Studies with endothelin-3 and endothelin-1 on rat blood pressure and isolated tissues: Evidence for multiple endothelin receptor subtypes. *J Cardiovasc Pharmacol* **13**: S191-192. Trejo, J. and Coughlin, S. R. (1999). The cytoplasmic tails of proteaseactivated receptor-1 and substance P receptor specify sorting to lysosomes versus recycling. *J Biol Chem* **274**: 2216-2224.

Vines, C. M., Revankar, C. M., Maestas, D. C., Larusch, L. L., Cimino, D. F., Kohout, T. A., Lefkowitz, R. J. and Prossnitz, E. R. (2003). N-formyl peptide receptors internalize but do not recycle in the absence of arrestins. *J Biol Chem* **278**: 41581-41584.

Wang, Y., Y. Zhou, K. Szabo, C. R. Haft und Trejo, J. (2002). "Downregulation of protease-activated receptor-1 is regulated by sorting nexin 1." *Mol Biol Cell* **13**: 1965-1976.

Williams, M. A. and Fukuda, M. (1990). Accumulation of membrane glycoproteins in lysosomes requires a tyrosine residue at a particular position in the cytoplasmic tail. *J Cell Biol* **111**: 955-966.

Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. and Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**: 411-415.

Zhang, J., Barak, L. S., Winkler, K. E., Caron, M. G. and Ferguson, S. S. (1997). A central role for β -arrestins and clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis in β 2-adrenergic receptor resensitization. Differential regulation of receptor resensitization in two distinct cell types. *J Biol Chem* **272**: 27005-27014.

6 Publikationen

6.1 Publikationen

Giebing, G., M. Tölle, <u>J. Jürgensen</u>, J. Eichhorst, J. Furkert, M. Beyermann, F. Neuschafer-Rube, W. Rosenthal, W. Zidek, M. van der Giet und A. Oksche (2005). "Arrestin-independent internalization and recycling of the urotensin receptor contribute to long-lasting urotensin II-mediated vasoconstriction." <u>Circ Res</u> **97**(7): 707-715.

Gregan, B., <u>J. Jürgensen</u>, G. Papsdorf, J. Furkert, M. Schaefer, M. Beyermann, W. Rosenthal und A. Oksche (2004). "Ligand-dependent Differences in the Internalization of Endothelin A and Endothelin B Receptor Heterodimers." <u>J Biol Chem</u> **279**(26): 27679-27687.

Petruschka, L., K. Adolf, G. Burchhardt, J. Dernedde, <u>J. Jürgensen</u> und H. Herrmann (2002). "Analysis of the zwf-pgl-eda-operon in Pseudomonas putida strains H and KT2440." <u>FEMS Microbiol Lett</u> **215**(1): 89-95.

6.2 Posterpräsentationen

Jandke, M., <u>J. Jürgensen</u>, G. Boese, R. Schülein, W. Rosenthal und O. Oksche "Influence of epitope-tags within the extracellular N terminus of endothelin receptors on cell surface delivery." ET-7 7th International Conference on Endothelin (2001 Edinburgh, Scotland).

<u>Jürgensen, J.</u>, G. Papsdorf, W. Rosenthal und A. Oksche "Analysis of sequence motifs in the C terminus of the endothelin B receptor involved in agonist-induced internalization." ELSO/GBM Meeting (2003, Dresden).

6.3 Forschungspreis

Grantcharova, E., <u>J. Jürgensen</u>, M. Jandke, G. Boese, W. Rosenthal und A. Oksche "Mechanisms regulating the down regulation of the endothelin B receptor." 1. Preis, Forschungspreis des Fachbereichs Humanmedizin, Universitätsklinikum Benjamin Franklin (2002, Berlin)

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors 4
Abb. 2: Schematische Darstellung der Wirkungsweise der G-Proteine 7
Abb. 3: Schematische Darstellung der Rezeptor-vermittelten Endozytose
(nach Pierce et al. 2002 modifiziert)
Abb. 4: Schematische Darstellung des Endothelins und des Endothelin- B-
Rezeptors
Abb. 5: Schematische Darstellung des C-Terminus der wildtypischen und
mutierten ET _B -Rezeptoren
Abb. 6: LSM-Aufnahmen der stabilen HEK293-Klone
Abb. 7: Verlauf der Internalisierung von wildtypischen und mutierten $ET_{B^{\text{-}}}$
Rezeptoren
Abb. 8: Laser-Scanning-Mikroskopie lebender HEK293-Zellen, die den
wildtypischen ET_B -Rezeptor oder ET_B -Rezeptormutanten exprimieren 53
Abb. 9: Nachweis von 125 I-ET1/ET _B -Rezeptorkomplexen durch LT-PAGE 55
Abb. 10: SDS-PAGE des Bakterien-Zelllysats nach IPTG-Induktion 60
Abb. 11: SDS-PAGE der heterolog überexprimierten GST-Fusionsproteine
nach affinitätschromatographischer Aufreinigung
Abb. 12: Immunoblot nach GST-Pulldown – Interaktion mit Arrestin3 63
Abb. 13: Immunopräzipitation zum Nachweis der Arrestin3-Interaktion 65
Abb. 14: Immunoblot nach Membranpräparation zum Arrestin3-Nachweis. 66
Abb. 15: Laser-Scanning-Mikroskopie zur Lokalisation von Arrestin nach
Stimulation des ET _B -Rezeptors
Abb. 16: ELISA zur Bestimmung des Einflusses von Arrestin3.GFP,
V54D.Arrestin3.GFP und K44A.Dynamin auf die Internalisierung des ${\sf ET}_{{\sf B}}\text{-}$
Rezeptors
Abb. 17: ELISA nach transienter Co-Transfektion von HEK293-Zellen 72
Abb. 18: Internalisierung des ET _B -Rezeptors in MEF-Zellen
Abb. 19: Weitere potentielle regulatorische Motive im C-Terminus des ET_{B} -
Rezeptors

Abb. 20: 3D-Strukturmodell des ET _B -Rezeptors.	76
Abb. 21: Oberflächenexpression des ET _B -Rezeptors mit Veränderungen	im
C-Terminus.	79

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	. 15
Tab. 2: Enzyme	. 18
Tab. 3: Antikörper	. 18
Tab. 4: Rezeptor-Liganden	. 19
Tab. 5: DNA- und Proteingrößenstandards und kommerziell erhältliche Kit	is19
Tab. 6: <i>E. coli</i> -Stämme	. 20
Tab. 7: Eukaryontische Zelllinien	. 20
Tab. 8: Klonierungsvektoren	. 21
Tab. 9: Übersicht über rekombinante Plasmide	. 21
Tab. 10: Übersicht der in dieser Arbeit konstruierten Plasmide	. 22
Tab. 11: Sequenzierprimer	. 23
Tab. 12: Klonierungsprimer	. 24
Tab. 13: Mutageneseprimer	. 24
Tab. 14: Mediumzusätze	. 28
Tab. 15: PCR-Standardprogramm	. 35
Tab. 16: PCR-Programm für Mutagenese	. 36
Tab. 17: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele	. 37
Tab. 18: Bestimmung der maximalen Bindungskapazität B _{max} und	der
Bindungskonstante K _D	. 50
Tab. 19: Klonierungsstrategie zur Konstruktion der GST-Fusionsproteine.	57
Tab. 20: Aminosäuresequenzen und theoretisch ermittelte Molekulargewie	chte
der klonierten Rezeptorbereiche, die an GST fusioniert wurden	. 58
Tab. 21: Übersicht verschiedener ET _B -Rezeptoren mit verändertem	C-
Terminus	. 77
Abkürzungen

A	Ampere		
Abb.	Abbildung		
ADP	Adenosyldiphosphat		
arr2	Arrestin 2		
arr3	Arrestin 3		
ATP	Adenosyltriphosphat		
AVP	Arginin Vasopressin		
bp	Basenpaare		
bidest.	bidestilliert		
ca.	circa		
CBB	Coomassie Brilliant Blau G250		
CO ₂	Kohlenstoffdioxid		
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)		
cpm	Zerfall pro Minute (counts per minute)		
CT	Carboxyl-Terminus		
Cy3.5	Cyanin 3.5		
dATP	Desoxyadenosintriphosphat		
dCTP	Desoxycytidintriphosphat		
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat		
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium		
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)		
dTTP	Desoxythymidintriphosphat		
EC	extrazelluläre Schleife		
em	Emission		
exc	Excitation		
ELISA	Enzymgekoppelter Immunabsorbtionstest (enzyme linked		
	immunosorbent assay)		
ES	Extrazelluläre Schleife		
ET1	Endothelin 1		
$ET_{A}R$	Endothelin-A-Rezeptor		
$ET_{B}R$	Endothelin-B-Rezeptor		
FMP	Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie		
g	G-Wert (Zentrifugalkraft)		

g	Gramm	
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)	
GST	Glutathion-S-Transferase	
h	Stunde	
His ₆	Hexa-Histidin-Tag	
IS	intrazelluläre Schleife	
kb	Kilobasen	
kDa	Kilodalton	
I	Liter	
lac	Laktose	
μ	micro	
m	milli	
Μ	Molar	
Mr	relatives Molekulargewicht	
min	Minute	
n	nano	
NT	Amino-Terminus <i>(N terminus)</i>	
OD	optische Dichte	
PBS	Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)	
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)	
POD	Peroxidase	
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)	
sek	Sekunde	
ТМ	Transmembrandomäne	
ü. N.	über Nacht	
ÜN-Kultur	Übernachtkultur	
UV	ultraviolett	
V	Volt	
VT	Volumenteile	
v/v	Volumen/Volumen	
w/v	Gewicht/Volumen (weight/volume)	
z. B.	zum Beispiel	

Lebenslauf

Jana Melzer (geborene Jürgensen) geboren am 09. Januar 1976 in Rostock verheiratet, 1 Kind

Berufliche Erfahrung:

09/2006–05/2007	Wissenschaftliche Mitarbeiterin,
	Technische Universität Braunschweig

05/2000–09/2000 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Universitätsklinikum Münster

Dissertation:

12/2000–12/2004 Doktorandin am Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie (FMP) in Berlin, später der Umzug der Arbeitsgruppe an das Institut für Pharmakologie, Charite Berlin

Studium:

10/1996–08/1999 Hauptstudium der Biologie an der Universität Greifswald Diplomarbeit: "Analyse des Glukose-Katabolismus von *Pseudomonas putida*" (Prof. Dr. H. Herrmann)
10/1994–09/1996 Grundstudium der Biologie an der Universität Rostock

Praktikum:

07/1997–08/1997 Industriepraktikum am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin (Prof. Dr. E. Lanka)

Auslandserfahrung:

09/1999–03/2000 Aupair-Aufenthalt in England