

1 Einleitung

1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Hormone, Neurotransmitter, Wachstumsfaktoren und andere Botenstoffe dienen als Signalmoleküle und vermitteln ihre Effekte über integrale Membranproteine, den sogenannten Rezeptoren, in das Zellinnere. Die Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) bildet die größte Rezeptorfamilie. Sie weisen eine gemeinsame Sekundärstruktur mit 7 transmembranären α -Helices, einen extrazellulären N-Terminus und einen intrazellulären C-Terminus auf. Für einen Vertreter aus der Familie, das Rhodopsin, konnte mittlerweile auch die 3D Struktur aufgeklärt werden (Luecke et al., 2001). Sie sind in unterschiedlichsten Geweben weit verbreitet und an allen wichtigen physiologischen Vorgängen, wie z.B. der Kreislauf- und der Stoffwechselregulation, an Neurotransmitterprozessen, der Embryo- und Ontogenese sowie der Funktion des Immunsystems beteiligt. Ihre Aktivierung erfolgt über unterschiedlichste Liganden, deren chemische Strukturen von aromatischen und nichtaromatischen Mono- und Polyaminen über Nucleotide, Aminosäuren, Peptide, Protein bis zu Eikosanoiden reichen (Strader et al., 1994). Auch Lichtreize werden über GPCRs wahrgenommen. Die Bindung des Liganden führt durch Konformationsänderung des Rezeptors intrazellulär zur Aktivierung von Guaninnucleotid-bindenden Proteinen, die aus den drei Untereinheiten (α , β , und γ) bestehen (heterotrimere G-Proteine). Bis heute konnten ca. 20 verschiedene α - und 8 $\beta\gamma$ -Untereinheiten, die mit unterschiedlichen Effektorsystemen interagieren, beschrieben werden (Neer, 1995; Tirindelli, 1995). Durch den Wechsel von GDP zu GTP an der α -Untereinheit wird diese aktiviert und dissoziiert vom $\beta\gamma$ -Dimer ab. Über die α -Untereinheit als auch das $\beta\gamma$ -Dimer können mehr als 20 verschiedene Effektorsysteme moduliert werden. Es werden

eine Reihe weiterer membrangebundener Proteine (Phospholipasen, Adenylatzyklen) veranlaßt, kleine Botenmoleküle, sogenannte „Second-Messenger“ (cAMP, cGMP, IP₃ und Ca²⁺), ins Cytoplasma freizusetzen, die eine Serie weitere enzymatischer Reaktionen auslösen. Auf jeder einzelnen Stufe dieser Amplifikationskaskaden kann im Bedarfsfall der Zelle, beispielsweise über „Feedback“-Mechanismen, regulierend eingegriffen werden. So bewerkstelligt die Zelle eine Feinabstimmung ihrer „Second-Messenger“-Moleküle, über welche sie zelluläre Prozesse steuert.

1.2 Die Endotheline und ihre Rezeptoren

Endotheline (ET1, ET2, ET3) sind Peptide aus jeweils 21 Aminosäuren, einem hydrophoben C-Terminus und zwei Disulfidbrücken im N-terminalen Ende (Abb. 1.1). Sie sind in den verschiedensten Zellen und Organsystemen weit verbreitet und vermitteln dort sehr unterschiedliche, physiologische Effekte. ET2 und ET3 werden in Nieren, Nebennieren und im Darmtrakt gebildet. ET3 findet sich in hoher Konzentration im Gehirn und scheint spezifisch für neuronales Gewebe zu sein, während ET1 die einzige Isoform in menschlichen Endothelzellen ist. Weiterhin wird ET1 vor allem in Gefäßmuskelzellen, aber auch in nichtvaskulärem Gewebe wie Gehirn, Nieren und Lunge synthetisiert. Peptide ähnlicher Struktur, die Sarafotoxine, finden sich auch in dem Schlangengift von *Atractaspis engaddensis* (Takasaki et al., 1988)

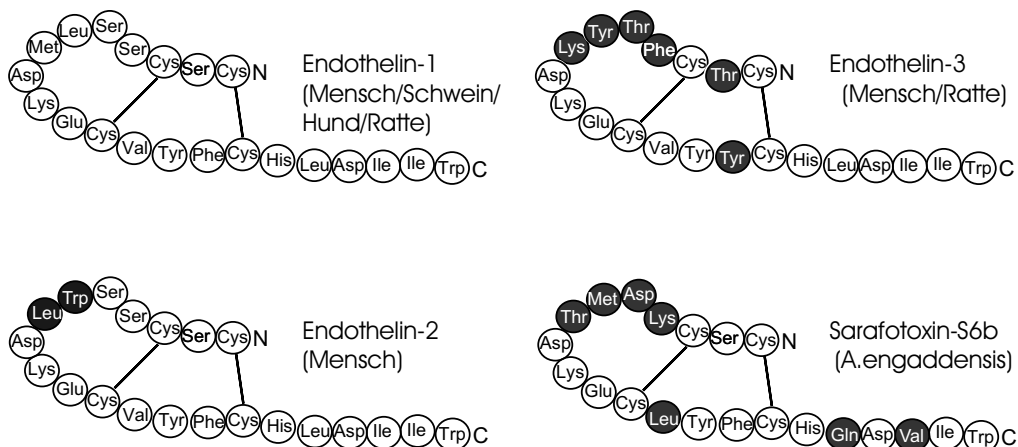


Abbildung 1.1: Struktur der Endotheline und des Sarafotoxin-S6b: Die schwarzen Kreise zeigen Unterschiede in der Aminosäuresequenz zum Endothelin-1.

ET1 ist der potenteste heute bekannte Vasokonstriktor. Er wird in Endothelzellen gebildet und zeigt auf die umliegenden Gefäßmuskelzellen stark kontrahierende Eigenschaften (Vanhouste, 1985). Erst 1988 konnte dieses Peptid aus den Überständen von kultivierten Gefäßendothelzellen der Schweineaorta isoliert und schließlich auch sequenziert werden (Yanagisawa et al., 1988). Durch Endopeptidasen entsteht aus dem Prä-pro-ET1 mit 212 Aminosäuren das Big-ET1 mit 39 Aminosäuren (Abb. 1.2). Big-ET1 wird durch eine membrangebundene Zink-Metallopeptidase, dem Endothelin-Conversions-Enzym (ECE-1), erst kurz vor seiner Sekretion in das aktive ET1 umgewandelt (Harrison et al. (1995). Zelluläre

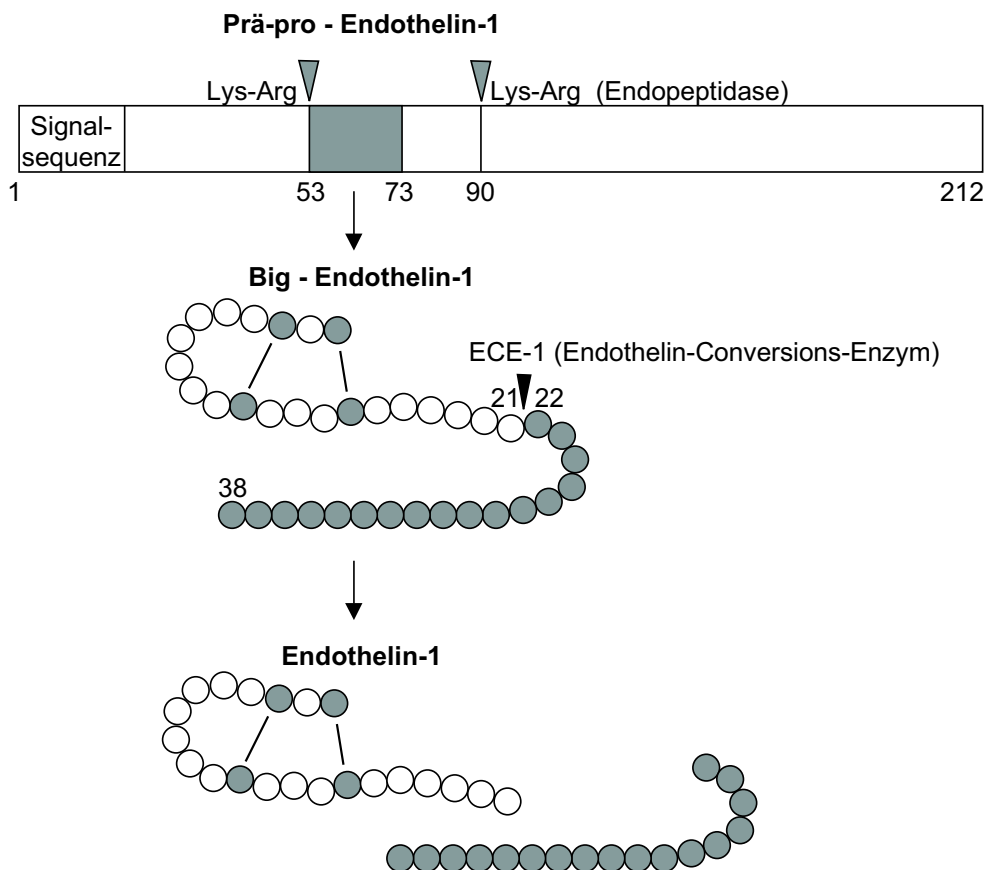


Abbildung 1.2: Enzymatische Prozessierung von Endothelin-1. Endothelin-1 ist etwa 100mal stärker wirksam als Big-ET1. Nur ein kleiner Teil des in der Endothelzelle gebildeten Endothelin-1 wird in das Gefäßlumen sezerniert, der größte Teil gelangt zu den glatten Gefäßmuskelzellen und wird dort an Endothelin-Rezeptoren gebunden.

Effekte der Endotheline werden durch spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) vermittelt. Es wurden zwei humane Endothelin-Rezeptorisoformen

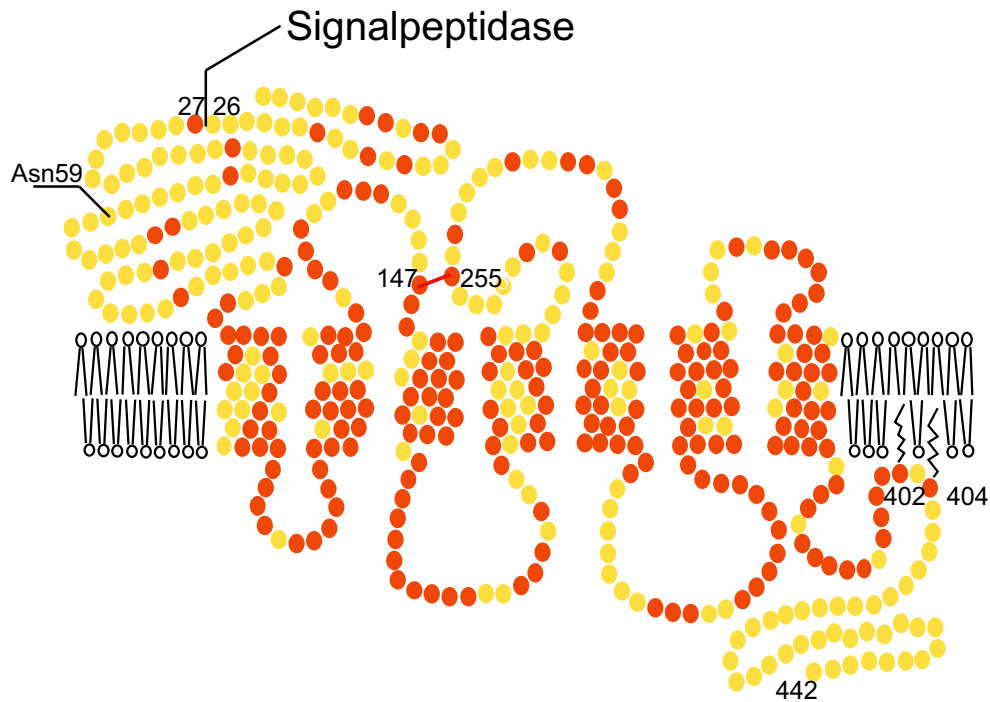


Abbildung 1.3: Struktur des humanen ET_B -Rezeptors : Homologe Bereiche zum ET_A -Rezeptor sind mit dunklen Kreisen hervorgehoben. Die ersten 26 Aminosäuren können von einer Signalpeptidase abgespalten werden und dienen möglicherweise als Signalsequenz. Das Asparagin 59 kann glykosiliert werden. Der lange, prolinreiche N-Terminus sowie der C-Terminus des ET_B -Rezeptors haben eine geringe Homologie zum ET_A -Rezeptor .

A (ET_A -Rezeptor) und B (ET_B -Rezeptor) kloniert, die auf den Chromosomen 4 und 13 lokalisiert sind (Arai et al., 1990; Sakurai et al., 1990; Hosoda et al., 1992). Ein weiterer Rezeptorsubtyp, der ET_C -Rezeptor, wurde bisher nur im Krallenfrosch *Xenopus laevis* nachgewiesen (Karne et al., 1993). Für den ET_B -Rezeptor konnten zwei mRNA-Spleißvarianten identifiziert werden, die für veränderte cytoplasmatische Domänen kodieren (Shyamala et al., 1994; Elschourbagy et al., 1996); diese zeigen trotz unveränderter Ligandbindungseigenschaften keine Aktivierung der G-Proteine mehr. Zwischen den Isoformen A und B besteht eine hohe Identität in der Aminosäuresequenz verschiedener Spezies. So ist der humane ET_A -Rezeptor zu dem ET_A -Rezeptor der Ratte zu 93% und zu dem des Rindes zu 94% identisch (Adachi et al., 1991), der humane ET_B -Rezeptor stimmt mit dem ET_B -Rezeptor der Ratte zu 88% überein (Sakamoto et al., 1991). Hin-

gegen besteht zwischen dem humanen ET_A -Rezeptor und ET_B -Rezeptor eine Sequenzhomologie von nur 64% (Adachi et al., 1991) (Abb. 1.3).

Diese strukturellen Unterschiede zwischen den humanen Endothelin-Rezeptoren sind Ursache für die verschiedenartigen Bindungsprofile und Signalkaskaden. Der ET_A -Rezeptor ist Isopeptid-selektiv, d.h. er bindet ET1 und ET2 mit gleicher, ET3 jedoch mit 1000-fach geringerer Affinität, während der ET_B -Rezeptor für alle Endotheline nahezu identische Bindungseigenschaften besitzt. In Bindungsanalysen von Endothelin-Rezeptorchimären konnten die Determinanten für die Ligandbindung beschrieben werden. Während beim ET_B -Rezeptor die TM-Domänen IV-VI mit ihren extrazellulären Loops für die selektive Agonistenbindung (ET3, BQ3020, IRL1620) verantwortlich sind, kommt beim ET_A -Rezeptor diese Rolle den TM-Domänen I-III und VII zu (Sakamoto et al., 1993). Ein Austausch einzelner Aminosäuren, wie beispielsweise Tyrosin129 und Asparagin126/133 durch Alanin in der zweiten TM-Domäne im ET_A -Rezeptor, können die Ligandaffinität stark beeinflussen (Rose et al., 1995; Krystek et al., 1994).

1.3 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung des Endothelins

Die Beteiligung des Endothelin-Systems an der Blutdruckregulation ist weitestgehend unverstanden. Da die Konzentration von ET1 im Blutkreislauf nur sehr gering ist, wird eher eine lokale Einflußnahme im Sinne einer para- bzw. autokrinen Regulation vermutet. ET1 führt an Endothelzellen zur Freisetzung gefäßrelaxierender Faktoren wie Stickoxid (NO) und Prostacyclin (PGI_2), während es an glatten Gefäßmuskelzellen konstriktorisch wirkt. Somit stellt sich die Frage, ob ET1 ein relaxierender oder kontrahierender Faktor ist. Mäuse mit einem heterozygoten Knockout des ET1-Gens (Maemura et al., 1995) sowie Mäuse mit einer stark verminderten ET_B -Rezeptor-Expression weisen einen erhöhten Ruheblutdruck auf. Dies ist vermutlich auf die fehlende ET_B -Rezeptor-vermittelte Freisetzung von Prostacyclin zurückzuführen (Ohuchi et al., 1999). Auch beim Menschen wurde der Einfluß des Endothelinsystems auf den Blutdruck gezeigt. Eine intravenöse Infusion des ET_A -Rezeptor-Antagonisten BQ-123 führt bei normotensiven Probanden zur Erhöhung des Blutflusses infolge einer Gefäßrelaxation, während ET_B -Rezeptor-Antagonisten einen anhaltenden Blutdruckan-

stieg bewirken (Haynes und Webb, 1994). Bei zahlreichen Krankheitszuständen, wie beispielsweise der chronischen Herzinsuffizienz, der pulmonalen Hypertension, dem Schlaganfall, der Gehirnblutung und der Niereninsuffizienz, ist eine stark erhöhte ET1 Plasmakonzentration nachweisbar. Endothelin-Rezeptor-Antagonisten zeigen oftmals eine deutliche Inhibition dieser fortschreitenden pathologischen Prozesse und damit eine Verbesserung des Krankheitszustandes. ET1 zeigt auf einige Zellen stark mitogene Eigenschaften und induziert die Expression einiger Protooncogene, wie beispielsweise *c-fos*, *c-jun* und *c-myc* (Battistini et al., 1993). Hier könnte ein Zusammenhang mit der Entwicklung von zellulärer Hypertrophie/Hyperplasie gesehen werden. Diese Effekte können in pathologischen Vorgängen, wie z.B. der Hypertonie oder der Herzinsuffizienz, allmählich zu einer Veränderung von kardiovaskulären Strukturen führen. Ebenso ist ET1 durch proliferative Effekte auf Astrozyten an Wundheilungsprozessen im Gehirn beteiligt. ET3 bzw. ET_B-Rezeptor-defiziente Mäuse zeigen den Phänotyp von Morbus Hirschsprung infolge der fehlenden Ausbildung von Ganglien im Darmbereich (Hosoda et al., 1994; Baynash et al., 1994).

1.4 Signalkaskaden der Endothelin-Rezeptoren

Nach der Bindung des Liganden an den Rezeptor werden infolge von Konformationsänderungen heterotrimere G-Proteine aktiviert. Zumeist können GPCRs unterschiedliche Signalwege aktivieren. Dies wird durch Bindung verschiedener G-Proteine an einen Rezeptor bzw. über Wechselwirkungen ihrer hydrolysierten $\beta\gamma$ -Untereinheiten vermittelt (Milligan, 1999). So konnte in zahlreichen heterologen Expressionssystemen auch für Ligandaktivierte Endothelin-Rezeptoren ein ausgeprägtes, vernetztes Effektorsystem gezeigt werden (Abb. 1.4). Der ET_A-Rezeptor stimuliert über ein $G_{\alpha s}$ -Protein die Adenylatzyklase (AC), was zur Erhöhung der Konzentration des sekundären Botenstoffs cAMP führt (Takuwa et al., 1990), während der ET_B-Rezeptor über Pertussistoxin (PTX)-sensitive $G_{\alpha i}$ -Proteine die AC hemmt (Aramori und Nakanishi, 1992; Eguchi et al., 1993). Für beide Rezeptorsubtypen A und B konnte eine Kopplung mit $G_{\alpha q}$ -Proteinen gezeigt werden, die eine Aktivierung der Phospholipase C β (PLC- β) bewirken (Sokolovsky, 1995). Aktivierte PLC- β spaltet Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) zu 1,4,5-Inositoltriphosphat (IP₃) und 1,2-Diacylglycerol (DAG). IP₃ setzt aus

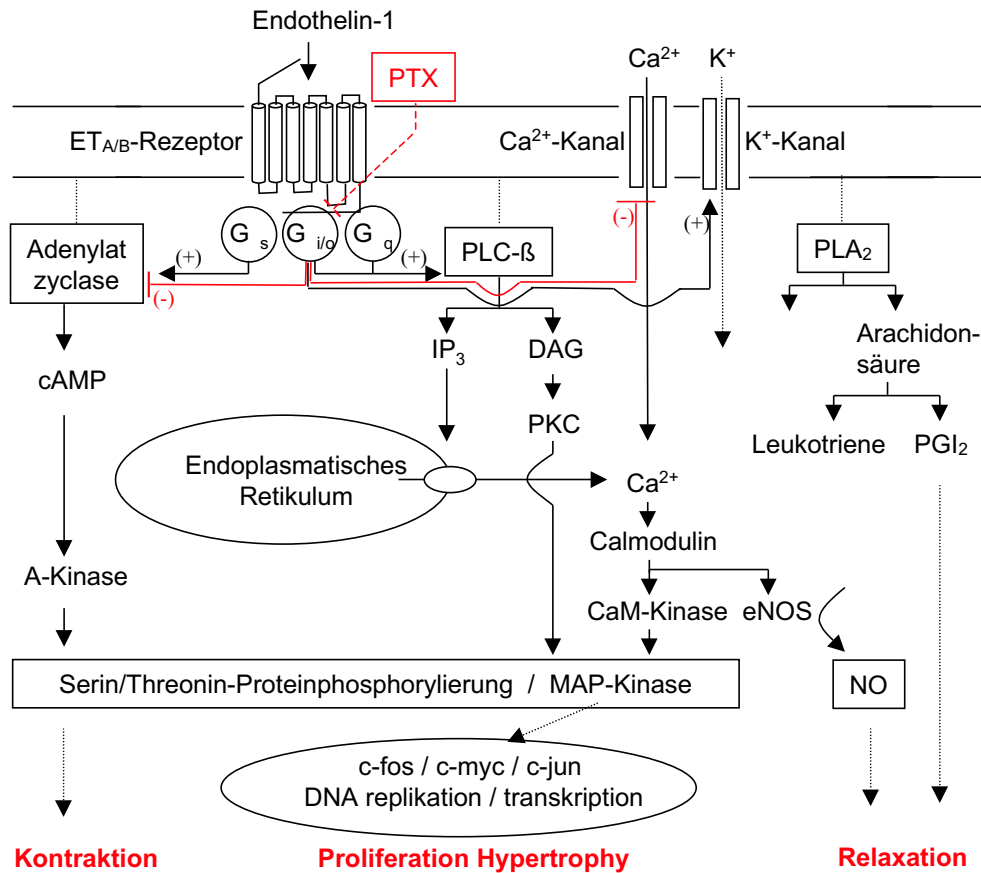


Abbildung 1.4: Effektorsysteme der humanen Endothelin-Rezeptoren: PLA₂: Phospholipase A₂; PLC-β: Phospholipase Cβ; PLD: Phospholipase D; IP₃: Inositol-3-Phosphat; DAG: Diacylglycerol; eNOS: endotheliale NO-Synthase; NO: Stickoxid; PGI₂: Prostacyclin; MAP-Kinase: Mitogen-Aktivierte Protein-Kinase.

intrazellulären Speichern Ca²⁺ frei und erhöht so die cytoplasmatische Ca²⁺-Konzentration. Membranständiges DAG aktiviert zusammen mit Ca²⁺ die Proteinkinase C (PKC) (Nishizuka, 1992), was u.a. zu einer Serin/Threonin-Proteinphosphorylierung einer großen Anzahl unterschiedlicher Substrate führt. Beide Endothelin-Rezeptoren können über Gα_q Phospholipase A₂ (PLA₂) aktivieren und somit Arachidonsäure aus der Zellmembran freisetzen, woraus Zelltyp abhängig Prostaglandine gebildet werden (Schramek et al., 1994; Sokolovsky, 1995). Weiterhin vermitteln Endotheline über sehr komplexe Wege die Aktivierung der mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK) und beeinflussen damit Proliferation und Differenzierung in verschiedenen Geweben. Agonist-aktivierte Endothelin-Rezeptoren können in einem „Cross-talk“ mit Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie für

den EGF-Rezeptor gezeigt (Daub et al., 1996), die kleine GTPase Ras aktivieren. Ein anderer Weg wird von der $\beta\gamma$ -Untereinheit des $G\alpha i$ -Proteins oder der α -Untereinheit von $G\alpha q$ aktiviert (Hawes et al., 1995).

1.5 Endothelin-induzierte Vasokonstriktion

ET1 ist das am besten untersuchte Peptid aus seiner Familie. Es wird als einziges in Endothelzellen gebildet, wo es zu 80% in den subendothelialen Raum freigesetzt wird (Waggoner et al., 1992). Bei entzündlichen Prozessen kann es aber auch

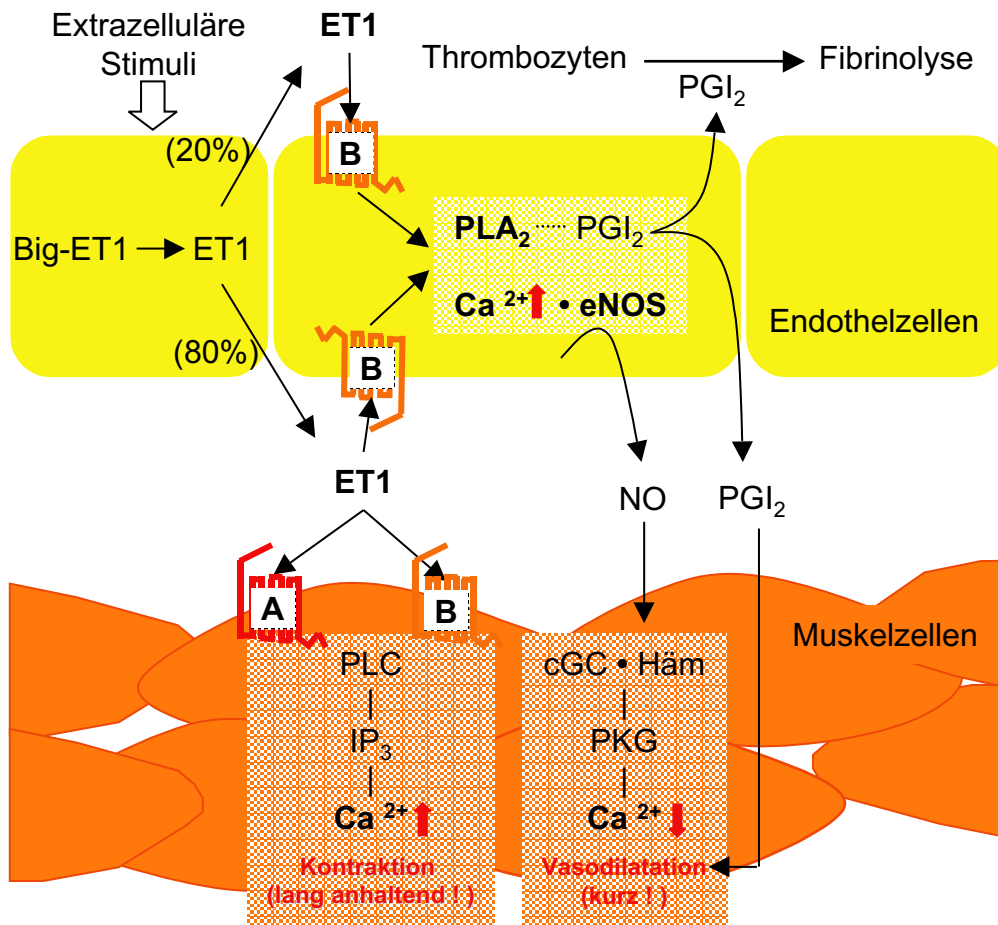


Abbildung 1.5: Von Endothelin-1 an Endothelzellen und glatten Gefäßmuskulzellen vermittelte Effekte: NO: Stickoxid; PGI_2 : Prostacyclin; eNOS: endotheliale NO-Synthase; cGC: cytoplasmatische Guanylatzyklase.

von glatten Gefäßmuskulzellen gebildet werden (Yanagisawa et al., 1988). Eine

intravenöse Injektion von ET1 führt in zahlreichen Spezies zunächst zu einer kurzen, über wenige Minuten anhaltenden Vasodilatation, gefolgt von einer lang, bis zu Stunden andauernden Kontraktion. Diese gegensätzlichen Reaktionen werden durch die unterschiedliche Expression von Endothelin-Rezeptoren in der Gefäßwand vermittelt (Abb. 1.5). Zunächst führt die ET1 Bindung an den ET_B-Rezeptor auf den Endothelzellen zur Freisetzung von Stickoxid (NO) bzw. Prostacyclin (PGI₂), das die Relaxation der vaskulären Muskelzellen bewirkt. NO diffundiert sehr schnell in die glatten Muskelzellen und bindet dort an die Häm-Gruppe der cytoplasmatischen Guanylatzyklase (cGC). Die cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG) wird aktiviert, die über Phosphorylierung von Ca²⁺-Kanälen zu einem intrazellulären Ca²⁺-Abfall und schließlich zur Vasodilatation führt. Spezifische ET_B-Rezeptor -Antagonisten inhibieren diese erste Reaktion vollständig. Gelangt ET1 an die Endothelin-Rezeptoren der Muskelzellen, bewirkt die aktivierte PLC eine Freisetzung von IP₃. Vermittelt über IP₃-Rezeptoren wird aus intrazellulären Speichern, wie dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR), Ca²⁺ freigesetzt. Freies Ca²⁺ bildet mit Calmodulin (CM) einen Komplex, welcher die Myosinleichtkettenkinase (MLCK) aktiviert, was letztendlich zur Kontraktion führt. Eine Erhöhung von intrazellulärem cAMP phosphoryliert und inaktiviert dagegen die MLCK.

1.6 Rezeptor-vermittelte Endozytose

Über die Endozytose werden eine Vielzahl wichtiger biologischer Funktionen reguliert. Nährstoffe, wie beispielsweise das Lipoprotein-geringer-Dichte (LDL), das mit Cholesterol beladen ist oder Transferrin als Trägerprotein von Eisen, werden über Membranproteine in die Zelle aufgenommen. Zum Abbau bestimmte Proteine werden in Lysosomen transportiert. Auch Viren und Toxine gelangen durch Endozytose in die Zelle. Bei GPCRs steht die Endozytose in engem Zusammenhang mit der Desensibilisierung des durch Ligandbindung aktivierten Rezeptors. Innerhalb weniger Sekunden erkennen spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) cytoplasmatische Sequenzmotive, in denen sie Serin-/Threonin-Reste phosphorylieren. Hierdurch löst sich die aktive G α -Untereinheit vom Rezeptor ab, d.h. der GPCR wird desensibilisiert (Freedman et al., 1997). Die zumeist C-terminale Phosphorylierung erhöht die Affinität zu β -Arrestin, einem

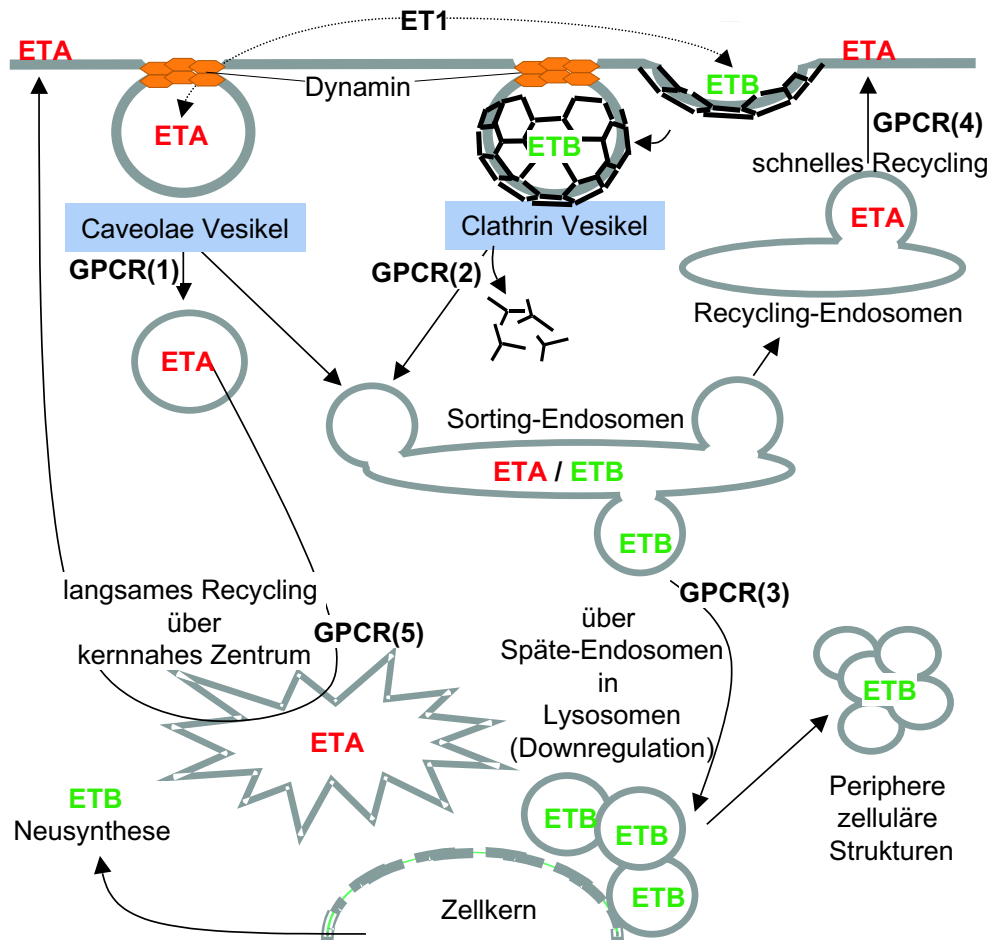


Abbildung 1.6: Internalisierung und intrazellulärer Transport von Endothelin-Rezeptoren über Clathrin-haltige Vesikel bzw. Caveolae: Für den ET_A -Rezeptor (ETA) ist die Lokalisation in Caveolae sowie ein Recycling bekannt. Die Endozytose des ET_B -Rezeptors (ETB) über Clathrin-haltige Vesikel und sein intrazellulärer Transport konnten in dieser Arbeit gezeigt werden. Die GPCRs(1) bis (5) sind in Tab. 1.2 zusammengestellt.

Adaptormolekül, welchem beim Aufbau des Gitterwerkes aus Clathrin-Proteinen eine Schlüsselrolle zukommt. Elektronenmikroskopisch zeigen sich Einstülpungen mit einem Clathringerüst, die sich allmählich als „Coated-Vesicle“ mit einem Durchmesser um die 80 nm von der Plasmamembran abschnüren. Das Clathrin wird rasch von „uncoating“-Enzymen entfernt und die Vesikel verschmelzen mit „Sorting“-Endosomen. In diesem sauren Kompartiment dissoziieren die meisten Ligand/Rezeptor-Komplexe, wobei der Rezeptor, in „Recycling“-Endosomen von Phosphatasen resensibilisiert, zurück an die Zelloberfläche gelangt. Ein anderer

<i>Int.-Wege</i>	<i>GPCRs</i>	<i>Literatur</i>
GPCR(1)	ET _A -R mAChM3-R B1-R β 2A-R CCK-R	(Chun et al., 1994; Okamoto et al., 2000) (Feron et al., 1999) (Sabourin et al., 2002) (Rybin et al., 2000) (Roettger et al., 1995)
GPCR(2)	ET _B -R Reviews	(Oksche et al., 2000b) (Oakley et al., 2000; Ferguson, 2001)
GPCR(3)	LH/hCG-R PAR-R	(Ghinea et al., 1992; Kishi et al., 2001) (Hein et al., 1994; Déry et al., 1999)
GPCR(4)	ET _A -R N1-R Y1-R δ -Opioid-R	(Bremnes et al., 2000) (Southwell et al., 1998) (Gicquiaux et al., 2002) (Hasbi et al., 2000)
GPCR(5)	ET _A -R V2-R	(Paasche et al., 2001) (Innamorati et al., 2001)

Tabelle 1.2: Wege der Internalisierung sowie des intrazellulären Transports, verschiedener G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCRs): B1-R: Bradykinin1-Rezeptor, V2-R: Vasopressin2-Rezeptor, mAChM3-R: muskarinerges AcetylcholinM3-Rezeptor, β 2A-R: α 2(A,B,C)-Adrenerger-Rezeptor, N1-R: Neurokinin1-Rezeptor, LH/hCG-R: Luteotropin/Choriogonadotropin-LH/hCG-Rezeptor, Y1-R: Neuropeptid1-Rezeptor.

Weg führt über „Späte“-Endosomen zum proteolytischen Abbau in die Lysosomen (Gruenberg und Maxfield, 1995) (Abb. 1.6). Dieser bei GPCRs eher ungewöhnliche Weg wurde bisher nur für den Luteotropin/Choriogonadotropin (LH/hCG)-Rezeptor (Ghinea et al., 1992) und die Familie der proteolytisch aktivierbaren Rezeptoren (PARs) beschrieben (Hein et al., 1994; Trejo und Coughlin, 1999; Déry et al., 1999). Bei diesen Rezeptoren führt eine Ligandstimulation zur langfristigen Downregulation an der Zelloberfläche.

Neben den „Clathrin coated pits“ wurden Einstülpungen, reich an Cholesterol und Sphingolipid, mit einem Durchmesser von 50-100 nm, umsäumt von Caveolin-Proteinen, in der Plasmamembran gefunden. Einige GPCRs zeigen eine ligandinduzierte, andere eine ligandunabhängige Lokalisation in diesen sogenannten Caveolae. Eine Endozytose in diese Vesikel setzt keine Phosphorylierung der GPCRs voraus, so konnten bislang auch keine GRKs in Caveolae Mikrodomänen nachgewiesen werden. In diesen Strukturen bleiben GPCRs, wie es u.a. für den ET_A-Rezeptor gezeigt werden konnte, (Okamoto et al., 2000; Chun et al., 1994)

auch nach erfolgter Endozytose noch längere Zeit (bis zu 2 Std.) aktiv (Chun et al., 1995). Wird der Cholesterolgehalt der Plasmamembran vermindert, internalisiert der ET_A -Rezeptor über einen Chlathrin-vermittelten Weg (Okamoto et al., 2000), (Abb. 1.6). Verschiedene kleine GTPasen, insbesondere aus der Ras-Großfamilie, sind an intrazellulären Signal- und Transportprozessen beteiligt. Hierzu zählen die Rho- und Rac-Proteine, über welche GPCRs die Reorganisation des Zytoskeletts beeinflussen können. Eine weitere Unterfamilie bilden die Rab-Proteine, deren Mitglieder an der Regulation des vesikulären Transports beteiligt sind.

1.7 Transportprozesse in polarisierten Zellen

Das Endothel bildet als dichte, monozelluläre Schicht eine Grenzfläche zwischen dem Blutstrom und der Gefäßwand. Beiderseits sind Endothelzellen an wichtigen regulatorischen Prozessen beteiligt. Der Gefäßtonus, die Fließeigenschaften des Blutes sowie immunologische und entzündliche Prozesse werden durch Sekretion verschiedener Mediatoren sowie die Oberflächenexpression von Lipiden und Membranproteinen kontrolliert. Eine solche differenzierte Funktionalität zur apikalen Blutseite sowie zur basalen subendothelialen Grenzfläche setzt einen gerichteten Proteintransport in der polarisierten Zelle voraus (Yeaman et al., 1999; Keller et al., 2001). Membranproteine werden an den Ribosomen des rauen endoplasmatischen Reticulums (RER) synthetisiert und mit Hilfe von N-terminalen Signalpeptiden in die Lipidmembran eingefädelt. Enzyme im Lumen des ER initiieren erste posttranslationale Modifikationen des noch wachsenden Polypeptids. Integrale, transmembranäre Oberflächenproteine gelangen daraufhin in den Golgi-Apparat, wo weitere abschließende Modifikationen erfolgen können. Hier werden die Proteine sortiert, in Vesikel verpackt und auf unterschiedlichen Wegen zu ihrem Bestimmungsort geschickt (Orzech et al., 1999). In vielen Membranproteinen wurden Sortiersignale gefunden, die als „Adresse“ für ihre zelluläre Lokalisation dienen (Kuehn und Scheckman, 1997). Signale für den basolateralen Transport sind zumeist tyrosinhaltige, kurze, hoch konservierte Aminosäuresequenzen die oft im C-Terminus der Membranproteine gefunden werden und für Proteine mit einer einzelnen Transmembrandomäne gut untersucht sind (Brown und Stow, 1996). Apikale Signale sollen v.a. transmembranär oder in exoplasmatischen Be-

<i>GPCRs</i>	<i>Sorting</i>	<i>Sortiermotiv</i>	<i>Literatur</i>
RhodopsinR	apikal	C-Term. / ???	(Chuang und Sung, 1998)
A1AdoR	apikal	???	(Saunders et al., 1996)
P2Y2R	apikal	???	(Kreda et al., 2000)
GAT3R	apikal	C-Term. / PDZ	(Muth et al., 1998)
FSHR	basal	C-Term. / Y-Motiv	(Beau et al., 1998)
GAT2R	basal	C-Term. / PDZ	(Perego et al., 1999)
TRHR	basal	???	(Yeaman et al., 1996)
V2R	basal	???	(Andersen-Beck et al., 1999)
mAChR	basal	???	(Nadler et al., 1999)
$\alpha 2(A,C)$ -AR	basal	???	(Wozniak und Limbird, 1996)
$\alpha 2(B)$ -AR	basal	3. iz. Schleife	(Saunders et al., 1998)

Tabelle 1.4: Abkürzungen für die GPCRs: FSHR: Folikel-stimulierendes Hormon-Rezeptor, TRHR: Thyrotropin-releasing Hormon-Rezeptor, GAT-R: Γ -Aminobuttersäure Transporter-Rezeptor, V2R: Vasopressin2-Rezeptor, mAChR: muskarinerges Acetylcholin-Rezeptor, $\alpha 2$ -AR: $\alpha 2(A,B,C)$ -Adrenerger-Rezeptor, A1AdoR: Adenosin A1 Rezeptor.

reichen vorliegen. Epitheliale Madin-Darby-Canine-Kidney (MDCK)-Zellen werden häufig zur Untersuchung von polarisierten Proteintransportprozessen verwendet, da sie als dichte monozelluläre Schicht durch „tight junctions“ voneinander getrennte apikale und basolaterale Membranbereiche ausbilden (Brown und Stow, 1996; Mostov et al., 2000). Auch GPCRs werden häufig polarisiert exprimiert, doch sind ihre Transportmotive weitestgehend unverstanden. In der Tabelle (Tab. 1.4) sind GPCRs aufgeführt, für welche ein polarisierter Transport gezeigt werden konnte. Ein relevantes tyrosinhaltiges, basolaterales Sortiermotiv konnte bisher nur am FSH-Rezeptor nachgewiesen werden.

1.8 Visualisierung von intrazellulären Transportprozessen

Das grüne fluoreszierende Protein (GFP) wurde 1992 aus der pazifischen Qualle, *Aequorea victoria*, isoliert (Prasher et al., 1992). Vor etwa sieben Jahren wurde dieses Protein erstmals rekombinant in eukaryontischen *Caenorhabditis elegans* wie auch den Bakterien *Escherichia coli* exprimiert, wobei sich ohne exogene Substrate oder Kofaktoren eine sichtbare Fluoreszenz zeigte (Chalfie et al.,

1994). Mittlerweile ist das GFP in der Molekularbiologie ein häufig genutztes Reporter-Molekül. Bereits 1995 wurden in einer Übersichtsarbeit 36 experimentelle Anwendungen von GFP-Fusionsproteinen vorgestellt (Cubitt et al., 1995). Erstmals fand es 1997 Verwendung für die Untersuchung eines GPCR (Barak et al., 1997). Seither sind an mehr als 20 verschiedenen GPCR-GFP Fusionsproteinen (C-terminal) dynamische, zelluläre Prozesse untersucht worden (Kallal und Benovic, 2000, Review). Hierbei zeigte sich, daß der C-terminale GFP-Tag mit seinen 27 kDa weder die Bindung noch die G-Proteinkopplung, die Rezeptor-phosphorylierung, oder die Anlagerung von Arrestin beeinflusst.

1.9 Fragestellung

Verschiedene Analysen deuten darauf hin, daß die Endothelin-Rezeptorsubtypen in Gefäßen Unterschiede in ihrer Oberflächenregulation aufweisen. Für den ET_A -Rezeptor wurde an vaskulären Gefäßmuskelzellen ein Recycling und an COS1 sowie CHO-Zellen eine Internalisierung über Caveolae gezeigt. Für den ET_B -Rezeptor lagen bislang noch keine Untersuchungen vor. Die Analysen zur Internalisierung des ET_B -Rezeptors sind dadurch erschwert, daß der Rezeptor ET-1 quasi irreversibel bindet. Damit sind Internalisierungsexperimente mit Radioliganden nicht durchführbar (hier ist die Dissoziation von Rezeptor und Ligand erforderlich). In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Internalisierung und der intrazelluläre Transport des ET_B -Rezeptors charakterisiert und mit der Internalisierung des ET_A -Rezeptors verglichen werden. Zur Darstellung der Internalisierung der Endothelin-Rezeptoren mittels der Fluoreszenzmikroskopie sollten fluoreszierendes ET1 (Cy3-, Fluo-ET1) und Fusionsproteine der ET_A - und ET_B -Rezeptoren mit GFP etabliert werden. Die Internalisierung sollte zunächst an transfizierten CHO-Zellen charakterisiert, später auch an primär kultivierten Astrozyten, die endogen Endothelin-Rezeptoren exprimieren geprüft werden. Desweiteren sollte untersucht werden, ob der ET_B -Rezeptor in polarisierten Zellen einen gerichteten Transport aufweist. Hierbei sollte durch gerichtete Mutagenese auch die Bedeutung eines potentiellen Transportmotivs im zytoplasmatischen C-Terminus des ET_B -Rezeptors analysiert werden.