

## Zusammenfassung

Endothelin-1 (ET-1) ist ein potentes vasoaktives Peptid dessen Wirkung über den Endothelin-A- (ET<sub>A</sub>) und den Endothelin-B-Rezeptor (ET<sub>B</sub>) vermittelt wird. Obwohl beide Rezeptoren in zahlreichen Zelltypen koexprimiert werden, ist nur wenig darüber bekannt ob diese Heterodimere bilden können. Mittels eines ET<sub>B</sub>-Rezeptor-spezifischen Antikörpers wurde in dieser Arbeit eine Kopräzipitation beider Rezeptorsubtypen aus HEK293 Zellextrakten nachgewiesen, welche den ET<sub>A</sub>- als myc- und CFP-Fusionsprotein und den ET<sub>B</sub>-Rezeptor als YFP-Fusionsprotein stabil koexprimieren. Eine Kopräzipitation konnte ebenfalls aus Extrakten von HEK293 Zellen nachgewiesen werden, die transient den ET<sub>A</sub>-Rezeptor als myc- und den ET<sub>B</sub>-Rezeptor als FLAG-Epitop markierte Rezeptoren exprimieren. Hierbei wurde ausgeschlossen, dass die Heterodimerisierung über eine Aggregation der CFP- und YFP-Fusionsproteine vermittelt wurde. Die Heterodimerisierung wurde weiterhin durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) Analysen bestätigt, die an HEK293 Zellen durchgeführt wurden, welche transient ET<sub>A</sub>myc.CFP- und ET<sub>B</sub>.YFP-Rezeptoren koexprimieren. Zusätzlich konnte eine Homodimerisierung der ET<sub>A</sub>-und ET<sub>B</sub>-Rezeptoren in HEK293 Zellen nachgewiesen werden, welche transient ET<sub>A</sub>myc.CFP- und ET<sub>A</sub>myc.YFP- oder ET<sub>B</sub>.CFP- und ET<sub>B</sub>.YFP-Rezeptoren koexprimieren. Es wurden FRET Effizienzen zwischen 12% und 18% in unbehandelten, Agonist- oder ET-1-behandelten Zellen gemessen, was eine konstitutive Homo- und Heterodimerisierung nahelegt. Eine verlängerte Stimulation (30 Min.) der Zellen mit einem ET<sub>B</sub>-spezifischen Agonisten (BQ3020) führte zu einer Verminderung der FRET Effizienz um 50%. Diese Reduzierung konnte nicht gemessen werden, wenn die Internalisierung durch eine Koexpression von dominant-negativem K44A-Dynamin I oder durch die Zugabe von 450 mM Saccharose inhibiert wurde. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) und LSM (laser scanning microscopy) Analysen wiesen in Zellklonen, welche stabil ET<sub>A</sub>myc.CFP- und ET<sub>B</sub>flag.YFP-Rezeptoren koexprimieren, eine verlangsamte ET-1-vermittelte Internalisierung des

ET<sub>B</sub>flag.YFP- Rezeptors nach. Jedoch konnten keine Unterschiede in der ET-1- oder BQ3020-vermittelten Internalisierung an Zellklonen beobachtet werden, die den ET<sub>B</sub>.flag.YFP-Rezeptor alleine exprimieren. Die vorliegenden Daten zeigen, dass ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptoren konstitutive Heterodimere bilden, deren Sequestrierung nach ET-1 Stimulation im Vergleich zu einer Stimulierung mit BQ3020 verlangsamt ist. Die Dissoziation des Heterodimers während der Internalisierung und des intrazellulären Transports erfolgt nur nach ET<sub>B</sub>-Rezeptor-selektiver Stimulation.