

Desensibilisierung und Internalisierung des Endothelin A-Rezeptors: Rolle der Rezeptor-Phosphorylierung

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Fakultät für Biologie

Universität Bielefeld

vorgelegt von

Florian Gärtner

aus Flieden

Bad Oeynhausen im Januar 2014

Die vorliegende Arbeit wurde am Erich und Hanna Klessmann Institut für kardiovaskuläre Forschung und Entwicklung, Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein Westfalen, Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum unter der Leitung von Herrn **Prof. Dr. Hendrik Milting** angefertigt. Bei ihm möchte ich mich für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie für seine ständige Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion bedanken. Seine Unterstützung hat sehr zum Gelingen meiner Doktorarbeit, deren freie Gestaltung mir ermöglicht wurde, beigetragen. Ebenso möchte ich mich bei Herrn **Prof. Dr. Karl-Josef Dietz** für die Bereitschaft bedanken, meine Arbeit zu betreuen.

Allen Mitarbeitern, die während meiner Zeit am Erich und Hanna Klessmann Institut, im Forschungslabor des Diabeteszentrums und im kardiologischen Forschungslabor des Herz- und Diabeteszentrums NRW tätig waren, gilt mein Dank für die kollegiale und freundliche Atmosphäre sowie für zahllose Hilfestellungen und Ratschläge.

Herrn Prof. Dr. Martin J. Lohse, Frau Dr. Susanne Nuber, Herrn Prof. Dr. Moritz Bünemann, Herrn Dr. Cornelius Krasel und Herrn Prof. Dr. Gerd Ulrich Nienhaus danke ich für ihre fachliche Unterstützung sowie für die Bereitstellung verschiedener Plasmide.

Frau Désirée Maßberg, Frau Franziska Mössler, Frau Dr. Heike Benecke und Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Hanns Hatt möchte ich für die Möglichkeit danken, die Ca^{2+} -*Imaging*-Messungen an der Ruhr-Universität Bochum durchzuführen. Ferner danke ich Herrn Dr. Thorsten Seidel (Universität Bielefeld) für die Unterstützung am konfokalen *Laser Scanning*-Mikroskop.

Diese Arbeit wurde von Actelion Pharmaceuticals und von der Erich und Hanna Klessmann Stiftung unterstützt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Gärtner F, Seidel T, Schulz U, Gummert J, Milting H: Desensitization and Internalization of Endothelin Receptor A: Impact of G Protein-coupled Receptor Kinase 2 (GRK2)-mediated Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2013**;288:32138-32148.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	3
1 Einleitung	5
1.1 Signaltransduktion	5
1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.....	5
1.2.1 Ligandenbindung	6
1.2.2 Rezeptoraktivierung.....	7
1.2.3 Signaltransduktion über heterotrimere G-Proteine	8
1.2.4 Desensibilisierung von GPCRs.....	10
1.2.4.1 GPCR-Kinasen (GRKs)	11
1.2.4.2 Arrestine	13
1.2.5 G-Protein-unabhängige Signaltransduktion	15
1.2.6 Internalisierung von GPCRs.....	15
1.3 Endothelin-Rezeptoren	16
1.3.1 Das Endothelin-System	16
1.3.2 Physiologische Relevanz des Endothelin-Systems.....	17
1.3.3 Desensibilisierung der Endothelin-Rezeptoren	18
1.3.4 Internalisierung und <i>Trafficking</i> der Endothelin-Rezeptoren.....	18
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Material.....	21
2.1.1 Geräte	21
2.1.2 Chemikalien	21
2.1.3 Puffer, Medien und Lösungen	22
2.1.4 Reagenziensätze	23
2.1.5 Antikörper	23
2.1.6 Enzyme.....	24
2.1.7 Plasmide.....	24
2.1.8 Oligonukleotide.....	25
2.1.9 siRNA	25
2.1.10 Bakterienstämme.....	25
2.1.11 Zelllinien.....	25
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	25
2.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion	25
2.2.2 Kolonie-Kontroll-PCR	26
2.2.3 Agarosegelelektrophorese.....	26

2.2.4	DNA-Reinigung.....	27
2.2.5	Restriktion.....	27
2.2.6	Ligation von DNA-Fragmenten	27
2.2.7	Zielgerichtete Mutagenese	27
2.2.8	Kultivierung und Lagerung von <i>E. coli</i>	28
2.2.9	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> mit der CaCl ₂ -Methode.....	28
2.2.10	Transformation in chemisch kompetente <i>E. coli</i>	28
2.2.11	Präparation von Plasmid-DNA	29
2.2.12	Sequenzierung von DNA	29
2.2.13	Präparation von RNA aus HEK 293-Zellen	29
2.2.14	Reverse Transkription	29
2.2.15	Quantitative <i>Real-Time</i> -PCR	29
2.3	Zellbiologische Methoden	30
2.3.1	Kultivierung und Lagerung von HEK 293-Zellen.....	30
2.3.2	Transfektion von HEK 293-Zellen.....	30
2.3.3	Herstellung von Zelllysate aus HEK 293-Zellen.....	31
2.3.4	Membranpräparation	31
2.4	Proteinbiochemische Methoden	32
2.4.1	Proteinbestimmung mit dem Bicinchoninsäure-Test.....	32
2.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32
2.4.3	<i>Western Blot</i>	32
2.5	Radiometrische Methoden	33
2.5.1	Quantitative Bindungsstudien	33
2.5.2	Ermittlung der Rezeptor-Zelloberflächenexpression	33
2.6	Untersuchung der <i>Second Messenger</i> -Produktion.....	33
2.6.1	Nachweis von cAMP.....	33
2.6.2	Nachweis von Myoinositol-1-Phosphat (IP ₁)	34
2.7	Bildgebende Methoden	35
2.7.1	Ca ²⁺ - <i>Imaging</i>	35
2.7.2	Weitfeld-Mikroskopie fluoreszenzmarkierter Rezeptoren.....	35
2.7.3	Konfokale <i>Laser Scanning</i> -Mikroskopie.....	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Klonierung der ET _A -Rezeptor-Mutanten.....	37
3.2	Quantitative Bindungsstudien	38
3.3	Oberflächenexpression der ET _A -Rezeptor-Mutanten.....	41
3.4	Ca ²⁺ - <i>Imaging</i>	41
3.5	cAMP-Freisetzung	42
3.6	Analyse der PLC-Aktivität.....	46
3.6.1	Einfluss der Rezeptor-Phosphorylierung auf die Desensibilisierung.....	46

3.6.2	Identifizierung der in die Desensibilisierung des ET _A -Rezeptors involvierten Phosphorylierungsstellen	48
3.6.3	Phosphomimetik	54
3.6.4	Koexpression von ET _A -Rezeptoren und GRK2.....	54
3.6.5	GRK2- <i>Knockdown</i>	56
3.7	Fluoreszenzmikroskopie	58
3.7.1	β-Arrestin 2-Translokation	59
3.7.2	Rezeptor-Internalisierung	59
4	Diskussion	63
4.1	Experimentelle Grundlagen	63
4.1.1	Kontrolle der Rezeptor-Expression	63
4.1.2	Analyse der homologen Rezeptor-Desensibilisierung	64
4.1.2.1	Ca ²⁺ - <i>Imaging</i> -Experimente	64
4.1.2.2	<i>Second Messenger</i> -basierte Analyse der Signaltransduktion.....	65
4.2	Die Rolle der Phosphorylierung in der Desensibilisierung des ET _A -Rezeptors	65
4.2.1	Hinweise aus der <i>Second Messenger</i> - und Ca ²⁺ -Freisetzung.....	66
4.2.2	Hinweise aus der Koexpression von ET _A -Rezeptoren und GRK2	67
4.2.3	Hinweise durch einen GRK2- <i>Knockdown</i>	67
4.2.4	Hinweise aus der Imitierung der Rezeptor-Phosphorylierung	68
4.3	Mapping der involvierten Phosphorylierungsstellen	69
4.3.1	Untersuchung der Position 184	69
4.3.2	Untersuchung von Phosphorylierungsstellen in der dritten intrazellulären Schleife	70
4.3.3	Untersuchung C-terminaler Phosphorylierungsstellen	71
4.4	Interaktion des ET _A -Rezeptors mit β-Arrestin	73
4.5	Phosphorylierungsunabhängige Desensibilisierung	75
4.6	Internalisierung des ET _A -Rezeptors	76
4.7	Fazit	78
4.8	Ausblick	79
4.8.1	Untersuchung der ET _A -Rezeptor-Desensibilisierung in Echtzeit.....	79
4.8.2	Untersuchung der Rezeptor-β-Arrestin-Interaktion.....	80
4.8.3	<i>Trafficking</i> des ET _A -Rezeptors	80
	Literaturverzeichnis.....	82
	Anhang	96
	Abkürzungsverzeichnis	96
	verwendete Oligonukleotide	98
	Abbildungsverzeichnis	101
	Tabellenverzeichnis	102

Zusammenfassung

Endotheline sind vasoaktive Peptidhormone, die über die Stimulation der beiden G-Protein-gekoppelten Endothelin-Rezeptor-Subtypen A und B die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und somit einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration induzieren. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (*G protein coupled receptors*, GPCRs) unterliegen einer fein abgestimmten Regulation, um einer Überstimulation der Zelle vorzubeugen. Der klassische Desensibilisierungsmechanismus beinhaltet die Phosphorylierung des aktivierten Rezeptors durch GPCR-Kinasen (GRKs). Eine Phosphorylierung durch diese Serin/Threonin-Kinasen erhöht die Affinität des Rezeptors zu Arrestin, welches daraufhin bindet und zu einer sterischen Blockade und somit zur Entkopplung des Rezeptors vom G-Protein führt. Die Rezeptor-Phosphorylierung spielt für viele GPCRs ebenfalls eine Rolle in der Agonisten-induzierten Rezeptor-Endozytose (Internalisierung). Im Endothelin A (ET_A)-Rezeptor sind 15 Phosphorylierungsstellen (13 hiervon Serin/Threonin-Reste) bekannt, die sich hauptsächlich in der Sequenz, die der C-terminalen Palmitoylierungsstelle folgt, befinden. Diese Sequenz (im Folgenden als C-terminale Extremität (CTE) bezeichnet) enthält drei Serin- und sieben Threonin-Reste. Sechs dieser zehn Phosphorylierungsstellen befinden sich in einem proximalen, vier in einem distalen *Cluster*.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Desensibilisierung des ET_A -Rezeptors untersucht. Ob die GRK2, deren Beteiligung an diesem Prozess bekannt ist, hier die Funktion einer Kinase einnimmt und welche Phosphorylierungsstellen gegebenenfalls involviert sind, ist nicht eindeutig geklärt. Daher wurden durch den Austausch von Serin und Threonin gegen Alanin phosphorylierungsdefiziente ET_A -Rezeptoren hergestellt und in der Zelllinie HEK 293 transient exprimiert. Während kontinuierlicher Endothelin-1 (ET-1)-Stimulation wurde die PLC-Aktivität analysiert, um Aufschluss über die Regulation der phosphorylierungsdefizienten ET_A -Rezeptor-Mutanten zu erhalten.

Die kombinierte Substitution der in der CTE befindlichen Serin/Threonin-Reste, jedoch nicht die Substitution aller proximalen oder aller distalen Phosphorylierungsstellen, führte zu einer gestörten Desensibilisierung, was sich in einer Erhöhung des PLC-Signals unter kontinuierlicher ET-1-Stimulation manifestierte. Für eine physiologische Desensibilisierung schien das Vorhandensein mindestens eines intakten Serin/Threonin-*Clusters* obligatorisch zu sein, denn die PLC-Aktivität jeder untersuchten Mutante mit einer Kombination aus proximalen und distalen Substitutionen war gegenüber der PLC-Aktivität des Wildtyps signifikant erhöht.

Des Weiteren wurde die ET-1-induzierte PLC-Aktivität von Zellen untersucht, die den ET_A-Rezeptor und GRK2 transient koexprimierten. Neben der wildtypischen Kinase (GRK2-WT) kamen die beiden Mutanten GRK2-D110A und GRK2-D110A/K220R zum Einsatz. Die Mutation K220R wurde gewählt, da sie in einer katalytisch inaktiven GRK2 resultiert. Die Mutation D110A beeinträchtigt hingegen die Bindung von GRK2 an G α_q . Die rekombinante Expression von GRK2-WT führte sowohl beim wildtypischen ET_A-Rezeptor (ET_A-WT) als auch bei der phosphorylierungsdefizienten Mutante ET_A-6PD (mit einer Kombination aus proximalen und distalen Substitutionen) zu einer Reduktion der PLC-Aktivität. Durch eine Expression von GRK2-D110A wurde die ET_A-WT-, jedoch nicht die ET_A-6PD-vermittelte PLC-Aktivität inhibiert. Beide Signale waren von einer GRK2-D110A/K220R-Expression unbeeinträchtigt. Diese Ergebnisse belegen, dass in die Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors mindestens zwei unabhängige GRK2-vermittelte Komponenten involviert sind: 1) ein phosphorylierungsunabhängiger Mechanismus, der durch die Bindung der Kinase an G α_q realisiert wird und 2) ein Mechanismus, der die Phosphorylierung von Serin/Threonin-Resten in der CTE des Rezeptors beinhaltet und in redundanter Weise in der Lage ist, entweder proximale oder distale Phosphorylierungsstellen zu involvieren. Das Vorhandensein eines phosphorylierungsabhängigen Desensibilisierungsmechanismus konnte durch GRK2-*Knockdown*-Experimente bestätigt werden.

In HEK 293-Zellen wurde zusätzlich die Internalisierung von ET_A-WT und einer Mutante, bei der alle bekannten Serin- und Threonin-Phosphorylierungsstellen entfernt wurden, untersucht. Hierfür wurden die auf der Zelloberfläche exprimierten Rezeptoren mit HiLyte Fluor 488-gekoppeltem ET-1 markiert. Die Internalisierung der fluoreszenzmarkierten Rezeptoren wurde im konfokalen *Laser Scanning*-Mikroskop beobachtet. Es wurden keine Unterschiede in der Endozytosegeschwindigkeit des wildtypischen und des phosphorylierungsdefizienten Rezeptors festgestellt. Dies lässt den Schluss zu, dass die Internalisierung des ET_A-Rezeptors phosphorylierungsunabhängig geschieht.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deuten auf eine komplexe ET_A-Rezeptor-Regulation hin. Die gleichzeitige Beteiligung von phosphorylierungsabhängigen und -unabhängigen Komponenten an der Desensibilisierung und Internalisierung geht über das klassische Paradigma der GPCR-Regulation hinaus und könnte im Zusammenhang mit einer Zelltyp-spezifischen Feinabstimmung des Endothelin-Signals stehen.

Summary

The vasoactive peptide hormones of the endothelin family activate phospholipase C (PLC) via stimulation of the G protein coupled endothelin A and B receptors to induce an increase of the intracellular Ca^{2+} concentration. G protein coupled receptors (GPCRs) are tightly regulated to prevent cellular overstimulation. A well-known desensitization mechanism involves the phosphorylation of the activated receptor by GPCR kinases (GRKs). Phosphorylation of the receptor by these serine/threonine kinases promotes binding of arrestin to the receptor which subsequently is uncoupled from its G protein by steric inhibition. Receptor phosphorylation is also involved in the agonist induced receptor endocytosis (internalization) of many GPCRs. The endothelin A (ET_A) receptor contains 15 confirmed phosphorylation sites (including 13 serine/threonine residues) which are essentially located in the sequence following the C-terminal palmitoylation site. This sequence is subsequently referred to as C-terminal extremity (CTE). It contains three serine and seven threonine residues which are located in a proximal cluster (including six phosphorylation sites) and a distal cluster (including four phosphorylation sites).

In this work the desensitization of the ET_A receptor was analyzed. Involvement of GRK2 in this process was shown in previous studies. Unclear however is whether GRK2 acts as a kinase in this process or rather mediates ET_A receptor desensitization in a phosphorylation independent way. Furthermore, in the case of a phosphorylation dependent desensitization mechanism, the phosphorylation sites are unknown. Therefore, various phosphorylation deficient ET_A receptor mutants were created by substitution of serine/threonine-phosphoacceptor sites by alanine in different combinations. The phospholipase C (PLC) activity of mutant receptors transiently expressed in HEK-293 cells was analyzed during continuous endothelin-1 (ET-1) stimulation to gain information about their regulation and an involvement of phosphorylation in this process.

The total deletion of phosphoacceptor sites in the CTE affected receptor regulation resulting in an increased PLC activity during continuous ET-1 stimulation. However, proximal as well as distal Serine/Threonine-phosphoacceptor sites both turned out to be sufficient to induce wild type-like desensitization. In this context, the integrity of either the proximal or the distal phosphoacceptor cluster seemed to be mandatory for the wild type-like desensitization because the second messenger production of any investigated ET_A receptor containing combined substitutions of proximal and distal Serine/Threonine-phosphoacceptor sites was significantly increased.

Additionally, the ET-1 induced PLC activity of cells transiently coexpressing the ET_A receptor and GRK2 was analyzed. Besides the wild type GRK2 (GRK2-WT) the mutants GRK2-D110A and GRK2-D110A/K220R were used. The mutation K220R was chosen because it results in the loss of kinase activity. The mutation D110A affects GRK2's coupling to Gα_q. Recombinantly expressed GRK2-WT decreased the PLC activity mediated by both the wild type ET_A receptor (ET_A-WT) and the phosphorylation deficient mutant ET_A-6PD containing proximal and distal substitutions. The expression of GRK2-D110A suppressed ET_A-WT signaling but did not impact PLC activity mediated by the phosphorylation-deficient mutant ET_A-6PD. Moreover, GRK2-D110A/K220R failed to inhibit signaling of ET_A-WT and ET_A-6PD. This demonstrates that ET_A desensitization involves at least two autonomous GRK2-mediated components: 1) a phosphorylation-independent signal decrease mediated by blocking of Gα_q and 2) a mechanism involving phosphorylation of serine and threonine residues in the CTE of the receptor in a redundant fashion, able to incorporate either proximal or distal phosphoacceptor sites. The existence of a phosphorylation dependent mechanism of desensitization was confirmed by GRK2 knockdown experiments.

Furthermore, the internalization of ET_A-WT and a mutant lacking all known serine/threonine phosphorylation sites were analyzed. For this purpose, receptors expressed on the cell surface were labeled by the addition of HiLyte Fluor 488 coupled ET-1. The internalization of fluorescently labeled receptors was observed by confocal laser scanning microscopy. No differences in the kinetics of endocytosis of the wild type and the phosphorylation deficient receptors were detected. This suggests a phosphorylation independent internalization mechanism for the ET_A receptor.

The results of this work hint at a complex regulation of ET_A receptor signaling. The coexistence of diverse phosphorylation-dependent and -independent components of desensitization and internalization exceeds the classical paradigm of GPCR regulation and may be associated with cell specific fine-tuning of endothelin signaling.

1 Einleitung

1.1 Signaltransduktion

Die Fähigkeit, auf extrazelluläre Signale zu reagieren, ist eine fundamentale Eigenschaft von lebenden Systemen. Chemische Stoffe binden dabei an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche, die das Signal ins Zellinnere übertragen, wo es über *Second Messenger* weitergegeben wird und in Folge dessen z.B. die Genregulation der Zelle steuert. Die Spezifität eines Rezeptors für bestimmte Liganden sowie die zellspezifische Rezeptor-Expression in mehrzelligen Organismen ermöglichen es der Zelle, trotz der großen Menge an verschiedenen Signalen, spezifisch auf einen biologischen Reiz zu reagieren. Die hohe Affinität der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung bewirkt zudem eine hohe Empfindlichkeit gegenüber kleinen Konzentrationen an extrazellulären Signalmolekülen. Diese Sensitivität wird gegebenenfalls durch die Amplifikation des Signals mit Hilfe intrazellulärer Enzymkaskaden verstärkt.

Die Vielzahl biologischer Signale wird durch einige wenige grundlegende Mechanismen verarbeitet. So diffundieren kleine unpolare Liganden wie z.B. Steroide in die Zelle und binden an nukleäre Rezeptoren, welche als Transkriptionsfaktoren fungieren und die Transkription von Zielgenen Liganden-abhängig aktivieren oder reprimieren [1]. Bei einem weiteren Mechanismus können Liganden an Ionenkanäle binden und diese öffnen oder schließen, wodurch der Ein- bzw. Ausstrom von Ionen und somit deren intrazelluläre Konzentration reguliert wird [2]. Ein dritter Mechanismus stellt die Signalübertragung durch Rezeptorenzyme wie z.B. Rezeptorkinasen dar. Hier wird nach Ligandenbindung an eine extrazelluläre Domäne des Rezeptors dessen intrazelluläre enzymatische Domäne aktiviert und das Signal über die Produktion eines *Second Messengers* in die Zelle übertragen [3]. Die Aktivierung von Sieben-Helix-Rezeptoren stellt eine vierte Möglichkeit der Signaltransduktion dar. Diese Rezeptoren steuern die Produktion von *Second Messenger*-Molekülen im Zellinnern über die Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen und werden daher auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (*G protein-coupled receptors*, GPCRs) genannt [4].

1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Mit etwa 800 identifizierten Genen, die GPCRs im humanen Genom kodieren [5], machen diese Rezeptoren eine der größten Proteinfamilien im Menschen aus. Die Liganden dieser außergewöhnlich heterogenen Rezeptor-Superfamilie sind sowohl strukturell als auch funktionell sehr verschiedenartig. Es gibt Rezeptoren für Hormone, Neurotransmitter,

Chemokine, Ca^{2+} -Ionen sowie für Duft- und Geschmacksstoffe [6]. Auch durch Photonen [7] und durch mechanische Stimulation [8] werden GPCRs aktiviert. Da viele physiologische Prozesse durch GPCRs gesteuert werden, spielen Pharmaka, die diese Rezeptoren beeinflussen, in der Therapie vieler Krankheiten eine große Rolle. 50 - 60 % aller derzeit entwickelten Arzneimittel zielen auf GPCRs ab [9,10].

Trotz der Diversität der GPCRs besitzen alle Mitglieder dieser Superfamilie eine gemeinsame Membrantopologie mit einem extrazellulären N-Terminus, sieben α -Helices (Helix I–Helix VII), die die Plasmamembran durchspannen, und einem intrazellulären C-Terminus. Die helikalen Membrandomänen sind durch drei extrazelluläre (*extracellular loop*, ECL1–ECL3) und drei intrazelluläre (*intracellular loop*, ICL1–ICL3) Schleifen miteinander verbunden. In der C-terminalen Domäne vieler GPCRs befindet sich eine Palmitoylierungsstelle. Durch die Verankerung dieser Stelle an der Plasmamembran wird eine vierte intrazelluläre Schleife ausgebildet. Der Bereich jenseits der Palmitoylierungsstelle wird in dieser Arbeit als C-terminale Extremität (CTE) bezeichnet.

Beruhend auf phylogenetischen Analysen lassen sich die humanen GPCRs nach dem GRAFS-Klassifizierungssystem in fünf Hauptfamilien unterteilen: in die Glutamat-, Rhodopsin-, Adhäsions-, Fizzled/*Taste2* und Secretin-Familie [11]. Die größte und am besten untersuchte Familie ist die Rhodopsin-Familie mit 701 Rezeptoren. Dazu gehören 241 nicht-olfaktorische Rezeptoren, welche den vier Hauptgruppen α , β , γ und δ zugeordnet werden können. Fast alle GPCRs der Rhodopsin-Familie besitzen in Helix VII ein NSxxNPxxY-Motiv und am Übergang von Helix III zur ICL2 ein E/DRY-Motiv.

1.2.1 Ligandenbindung

Die Ligandenbindung geschieht in den unterschiedlichen GPCRs auf vielerlei Arten [12]. Kleine Liganden und Peptid-Liganden binden bei Rezeptoren der Rhodopsin-Familie an tief in der Membran gelegene Stellen zwischen den α -Helices [13] bzw. an extrazelluläre Domänen [14,15]. Andere Liganden wie etwa Glykoprotein-Hormone interagieren mit *leucine-rich repeat*-Motiven im N-Terminus und mit den ECLs ihrer Rezeptoren [16,17]. Thrombin oder andere proteolytische Enzyme aktivieren Protease-aktivierte Rezeptoren hingegen durch Abspaltung ihres N-Terminus [18]. Durch Interaktion mit der ECL2 aktiviert der neue N-Terminus den Rezeptor als gebundener Ligand [19].

Es wird angenommen, dass GPCRs in Abwesenheit eines Liganden in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen inaktivem und weniger bevorzugtem aktiven Zustand sind [20]. Durch Ligandenbindung wird dieses Gleichgewicht zugunsten des aktiven Zustandes verschoben [21]. Abhängig von der Art des Liganden werden dabei unterschiedliche Rezeptor-Konformationen stabilisiert. [22,23]. In der Pharmakologie werden Agonisten und Antagonisten unterschieden. Durch die Bindung eines Agonisten wird eine aktive

Rezeptor-Konformation eingenommen, welche die Interaktion intrazellulärer Domänen mit einem heterotrimeren G-Protein ermöglicht. Bindet eine Substanz an den Rezeptor ohne die Signaltransduktion zu induzieren, wird sie als Antagonist bezeichnet. Der Rezeptor ist bis auf Weiteres blockiert. Wird ein Rezeptor durch einen Liganden nicht in vollem Maße, sondern nur teilweise aktiviert, spricht man von einem partiellen Agonisten. Die aktive Konformation, die nach der Liganden-Bindung eingenommen wird, ist manchmal vom Typ des Agonisten abhängig. So konnte für den M₃ muskarinischen Acetylcholin-Rezeptor [24], den α_{2A} -adrenergen Rezeptor [25] und den β_2 -adrenergen Rezeptor [26] gezeigt werden, dass verschiedene Agonisten unterschiedliche Rezeptor-Konformationen induzieren. Dies kann sich darin auswirken, dass unterschiedliche Signalwege aktiviert werden. Wenn verschiedene Liganden über denselben Rezeptor jeweils ein spezifisches Signal induzieren, spricht man von funktionell-selektiven oder *biased* Agonisten [27–29].

1.2.2 Rezeptoraktivierung

Der Übergang vom Grundzustand in den aktivierten Zustand beinhaltet bei GPCRs mehrere Konformationsänderungen [20,30]. Ein wichtiges Ereignis ist hierbei eine Bewegung der Helix VI. Im inaktiven Zustand von Rhodopsin wird zwischen E134 und R135 des hochkonservierten E/DRY-Motivs in Helix III und E247 in Helix VI ein Netzwerk aus Wasserstoffbrücken und ionischen Wechselwirkungen ausgebildet [31]. Dieses Zusammenspiel wird als *ionic lock* [32,33] bezeichnet und ist an der Arretierung des Grundzustandes beteiligt, indem es die beiden Transmembranhelices zusammenhält [34,35]. Der Rezeptoraktivierung geht das Aufbrechen des *ionic lock* voraus, was im Falle von Rhodopsin eine Protonierung von E134 beinhaltet [36]. Daraufhin kommt es zu einer Rotations- und Kipp-Bewegung der Helix VI [37,38]. Durch die nach außen gerichtete Bewegung dieser Helix wird deren Abstand zur Helix III vergrößert [39] und es bildet sich eine Spalte in der intrazellulären Oberfläche des Rezeptors aus, wodurch die Bindung eines heterotrimeren G-Proteins ermöglicht wird [40,41]. Dementsprechend konnte für Rhodopsin gezeigt werden, dass eine chemische Verknüpfung der beiden Helices die G-Protein-Aktivierung verhindert [37,42]. Für einige GPCRs wurde die Anwesenheit eines *ionic lock* im Grundzustand durch die Aufklärung der jeweiligen Kristallstrukturen belegt [43,44]. Die in den letzten Jahren stetig ansteigende Zahl an verfügbaren Kristallstrukturen [45] lässt jedoch den Schluss zu, dass nicht alle GPCRs der Rhodopsin-Familie ein *ionic lock* ausbilden [46] und alternative Möglichkeiten zur Arretierung des inaktiven Zustandes bestehen [20,47].

1.2.3 Signaltransduktion über heterotrimere G-Proteine

Die klassische Signaltransduktion der GPCRs wird durch die Aktivierung heterotrimerer G-Proteine vermittelt. Diese bestehen aus den drei Untereinheiten α , β und γ . Durch eine Myristoylierung oder Palmitoylierung am N-Terminus der α -Untereinheit ($G\alpha$) [48] sowie durch eine Farnesylierung oder Geranylgeranylierung am C-Terminus der γ -Untereinheit [49] ist das G-Protein an der Plasmamembran verankert [50]. $G\alpha$ besitzt eine GTPase-Aktivität und kann eines der Guanin-Nukleotide GDP und GTP binden, wobei die Identität des Nukleotids den Aktivierungszustand bestimmt. Die beiden anderen Untereinheiten sind im $\beta\gamma$ -Komplex ($G\beta\gamma$) fest miteinander assoziiert [51]. 16, 5 bzw. 12 humane Gene kodieren 23 α -, 6 β - und 12 γ -Untereinheiten [52,53]. Die Anzahl der tatsächlich realisierten Kombinationen ist jedoch unbekannt. Ebenso ist wenig über die Funktion der unterschiedlichen G-Protein-Kompositionen in spezifischen Signalwegen bekannt. Heterotrimere G-Proteine werden jeweils nach ihrer α -Untereinheit benannt. So enthält der heterotrimere Komplex G_q beispielsweise die α -Untereinheit $G\alpha_q$. Basierend auf Sequenzhomologien und funktionellen Aspekten werden vier G-Protein-Subfamilien unterschieden [54]: G_s -Proteine stimulieren die Adenylzyklase (AC); G_i Proteine inhibieren diese bzw. aktivieren einwärtsgerichtete Kalium-Kanäle; G_q -Proteine aktivieren die Phospholipase C (PLC); und G_{12} -Proteine aktivieren GEFs (*guanosin exchange factors*), die zur Aktivierung des kleinen G-Proteins RhoA (*Ras homology gene family, member A*) führt [6].

Im Grundzustand, d.h. wenn ein GDP an die α -Untereinheit gebunden hat, bindet das heterotrimere G-Protein mit der C-terminalen Helix von $G\alpha$ an einen stimulierten Rezeptor [41], welcher als GEF fungiert und die Freisetzung des GDP bewirkt. Durch eine darauffolgende Konformationsänderung des G-Proteins wird ein hoch affiner Komplex zwischen Rezeptor und G-Protein gebildet [4] bis ein GTP bindet. Durch diesen Nukleotid-Austausch wird das G-Protein aktiviert und verliert seine Affinität zum Rezeptor. Nach Abspaltung von diesem dissoziiert es in die α -Untereinheit und den $\beta\gamma$ -Komplex. Sowohl das durch GTP aktivierte $G\alpha$ ($G\alpha(GTP)$) als auch der freie $\beta\gamma$ -Komplex können über die Aktivierung von Effektorproteinen [55] und die Regulation von *Second Messenger*-Konzentrationen zellspezifische Reaktionen auslösen [35]. Durch eine intrinsische GTPase-Aktivität von $G\alpha$ wird das Signal terminiert. Die inaktive GDP-Form reassoziert erneut mit einem $\beta\gamma$ -Komplex. Die Dauer des Signals wird somit vom Zeitpunkt der GTP-Hydrolyse bestimmt, welche von RGS (*regulator of G protein signaling*)-Proteinen [56,57], die zu den GAPs (*GTPase-activating proteins*) gehören, beschleunigt wird. Es wird angenommen, dass unterschiedliche kinetische Profile der Konzentrationen von $G\alpha(GTP)$ und $G\beta\gamma$ zur Signalspezifität der GPCRs beitragen [58]. Zudem wird Signalspezifität durch räumliche Kompartimentierung verschiedener Signale erreicht [59,60].

Dem oben beschriebenen Mechanismus, bei dem das an der Plasmamembran verankerte G-Protein durch laterale Diffusion an den aktivierten Rezeptor bindet, liegt das *collision coupling*-Modell [61] zugrunde. Alternativ dazu schlägt das *precoupling*-Modell [62,63] eine Interaktion zwischen Rezeptor und G-Protein schon vor der Rezeptoraktivierung vor [64].

Zwei wichtige Effektorproteine, die durch aktive $G\alpha$ -Untereinheiten aktiviert werden, sind die AC und die PLC. Die durch $G\alpha_s$ stimulierte und durch $G\alpha_i$ inhibierte AC ist ein Transmembranprotein und katalysiert die Bildung des *Second Messengers* cAMP aus ATP (Abb. 1-1). Phosphodiesterasen bauen cAMP schnell und kontinuierlich zu AMP ab. Durch einen Anstieg der cAMP Konzentration wird die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) aktiviert. Diese ist im inaktiven Zustand ein Tetramer aus zwei katalytischen und zwei regulatorischen Untereinheiten. Bindet cAMP an die regulatorischen Untereinheiten, zerfällt der Komplex und die aktiven katalytischen Untereinheiten werden freigesetzt. Die aktive PKA reguliert durch Ser/Thr-Phosphorylierung diverse Zielproteine und beeinflusst somit - abhängig vom Zelltyp - zahlreiche unterschiedliche Prozesse wie Glykogenabbau [65], Zellmotilität [66], Kontraktilität [67] und Transkription [68,69].

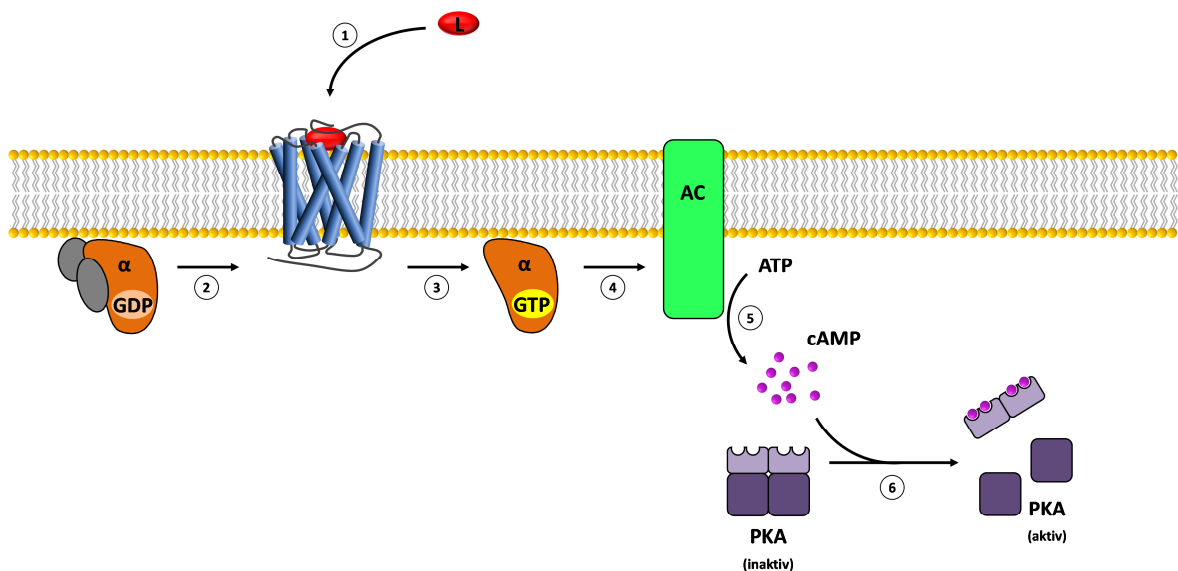


Abb. 1-1. Signaltransduktion G_s -gekoppelter Rezeptoren. Nach Aktivierung des Rezeptors durch einen extrazellulären Liganden (1) bindet das inaktive heterotrimere G-Protein an den Rezeptor (2). Daraufhin kommt es in dessen α -Untereinheit (α) zu einem Austausch von GDP durch GTP, wodurch diese aktiviert wird (3) und die Adenylylzyklase (AC) stimuliert (4). Die AC katalysiert die Bildung von cAMP aus ATP (5). Der *Second Messenger* cAMP bindet an die regulatorischen Untereinheiten der Proteinkinase A (PKA), wodurch die katalytischen Untereinheiten freigesetzt und somit aktiviert werden.

Die Aktivierung der Membran-assoziierten Phospholipase C (PLC) geschieht über Gq (Abb. 1-2). PLC hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). Beide Spaltprodukte fungieren als Signalmoleküle. Das wasserlösliche IP₃ bindet an IP₃ Rezeptoren, die Ca²⁺-Kanäle im endoplasmatischen Retikulum (ER) darstellen, und veranlasst so einen Ausstrom an Ca²⁺ ins Zytosol. Die Ca²⁺-abhängige Proteinkinase C (PKC) transloziert daraufhin zur Plasmamembran und wird dort von DAG aktiviert. Ähnlich wie die PKA kann die PKC Zelltyp-spezifische Effekte durch Ser/Thr-Phosphorylierung von diversen Zielproteinen auslösen. Die Terminierung des Ca²⁺-Signals wird über die rasche Dephosphorylierung von IP₃ zu Inositol-4,5-bisphosphat (IP₂) und durch aktive Ca²⁺-Transporter gewährleistet.

1.2.4 Desensibilisierung von GPCRs

Nach der Stimulation von GPCRs kommt es oftmals selbst bei kontinuierlicher Anwesenheit des Agonisten zu einer schnellen Abschwächung des Signals. Dieses Phänomen ist eine Konsequenz verschiedener regulatorischer Mechanismen und wird

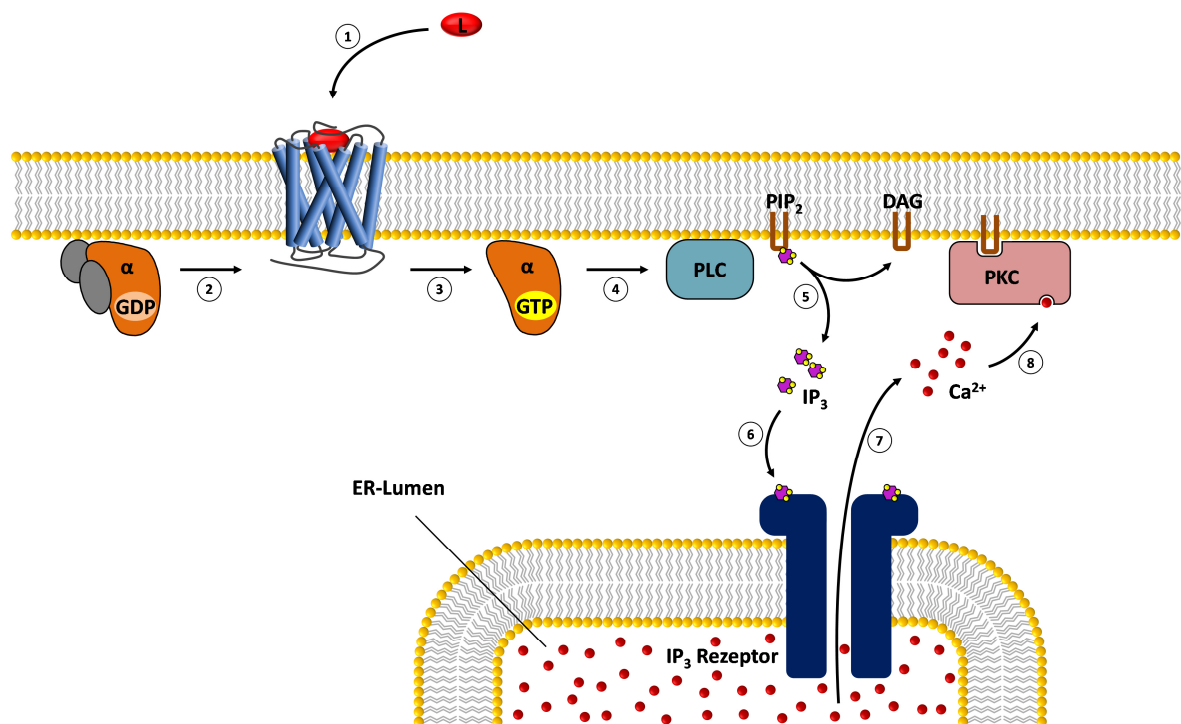


Abb. 1-2. Signaltransduktion G_q-gekoppelter Rezeptoren. Nach Aktivierung des Rezeptors durch einen extrazellulären Liganden (L) (1) bindet das inaktive heterotrimerische G-Protein an den Rezeptor (2). Daraufhin kommt es in dessen α -Untereinheit (α) zu einem Austausch von GDP zu GTP, wodurch diese aktiviert wird (3) und die Phospholipase C (PLC) stimuliert (4). PLC katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) (5). IP₃ bindet an den IP₃-Rezeptor in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) (6), woraufhin dieser sich öffnet und Ca²⁺ ins Zytosol freisetzt (7). Aufgrund des Anstiegs der Ca²⁺-Konzentration wird die Proteinkinase C (PKC) zur Plasmamembran rekrutiert (8), wo sie durch DAG aktiviert wird.

Desensibilisierung genannt [70]. Hierdurch wird einer Überstimulation durch akute oder chronische Agonistenpräsenz vorgebeugt. Es werden zwei Arten der Desensibilisierung unterschieden: Homologe Desensibilisierung betrifft direkt das stimulierte Signal. Von heterologer Desensibilisierung spricht man hingegen, wenn ein Rezeptor stimuliert wird und dadurch ein Prozess ausgelöst wird, der dazu führt, dass das Signal anderer Rezeptoren abnimmt.

Desensibilisierungsmechanismen können sowohl auf Rezeptorebene geschehen als auch nachgeschaltete zelluläre Prozesse, wie z.B. die G-Protein-Aktivität [71,72], beeinflussen. Die Rezeptor-Desensibilisierung kann prinzipiell drei Ereignisse beinhalten: 1.) Die Entkopplung vom G-Protein, 2.) die Internalisierung membranständiger Rezeptoren durch Endozytose und 3.) die Herunterregulation der zellulären Rezeptormenge durch verminderte Synthese und/oder vermehrte lysosomale Degradation (*Down Regulation*) [73].

Klassischerweise wird die Entkopplung des Rezeptors vom G-Protein durch die Phosphorylierung der dritten intrazellulären Schleife und/oder der C-terminalen Domäne [74,75] ausgelöst, was zur Bindung von Arrestin führt [76–78]. Die Rezeptor-Phosphorylierung wird entweder durch *Second Messenger*-abhängige Kinasen wie z.B. PKA oder PKC [79] oder durch die Familie der GPCR-Kinasen (GRKs) [80,81] (s. Abschnitt 1.2.4.1) vermittelt. *Second Messenger*-abhängige Kinasen werden durch den GPCR-induzierten Anstieg der zytosolischen *Second Messenger*-Konzentration aktiviert und erkennen und phosphorylieren in einem Rückkopplungsmechanismus spezifische Konsensus-Sequenzen des Rezeptors. Dabei wird nicht nur der stimulierte Rezeptor selbst phosphoryliert. Es kommt auch zur Phosphorylierung und heterologen Desensibilisierung von nicht aktivierten Rezeptoren.

Bei einigen GPCRs wie Rhodopsin [82], dem C5a-Rezeptor [83] oder dem δ -opioid-Rezeptor [84] findet eine hierarchische Phosphorylierung statt. Zunächst wird eine bestimmte Schlüsselstelle, eine initiale Phosphorylierungsstelle, phosphoryliert und erst danach kommt es zur Phosphorylierung weiterer Ser/Thr-Reste.

1.2.4.1 GPCR-Kinasen (GRKs)

GRKs sind aktivierbare Ser/Thr-Kinasen und spielen in der Regulation von GPCRs eine wichtige Rolle, indem sie durch Rezeptor-Phosphorylierung die homologe Desensibilisierung einleiten (Abb. 1-3). Die Aminosäuresequenzen der intrazellulären Domänen von GPCRs sind sehr variabel. Daher basiert die Rezeptorbindung nicht auf der Erkennung von speziellen Konsensus-Sequenzen im Rezeptor. Vielmehr wird von der Kinase ein aktivierter Rezeptor, der gleichzeitig Substrat und allosterischer Aktivator ist [41], spezifisch erkannt und phosphoryliert. Die GRK-Familie besteht aus den Isoformen GRK1-7 [85–92], wobei die Expression von GRK1 und GRK7 hauptsächlich auf retinale Zapfen und Stäbchen

beschränkt ist. Nahezu jede Säugerzelle exprimiert verschiedene, nicht-visuelle GRK-Isoformen. Die zellspezifische Isoform-Zusammensetzung - obwohl größtenteils noch unbekannt - ist sehr wahrscheinlich eine wichtige Determinante der Spezifität der GRK-Funktion [93] und ist z.B. für die Embryogenese von Bedeutung [94–96].

Aufgrund von Homologien der Sequenzen und Genstrukturen werden drei GRK-Unterfamilien unterschieden. Die GRK1-Unterfamilie besteht aus GRK1 und GRK7, die GRK2-Unterfamilie aus GRK2 und GRK3 und die GRK4-Unterfamilie aus GRK4, GRK5 und GRK6 [97]. Alle GRKs bestehen aus einer N-terminalen Region, die spezifisch für die jeweilige GRK-Unterfamilie ist und die für die GPCR-Bindung verantwortlichen Elemente enthält [98]. Diese wird von einer konservierten RGS-Homologie (RH)-Domäne und einer konservierten katalytischen Domäne gefolgt [80,99]. Der C-Terminus enthält Isoform-spezifisch unterschiedliche Elemente, die der Verankerung an der Plasmamembran dienen.

Der Mechanismus der GRK-Aktivierung durch einen aktiven Rezeptor ist nicht vollständig verstanden. Aufgrund der Kristallstruktur von GKR6 in einer Konformation, die der einer aktiven Kinase ähnelt [100], wird jedoch angenommen, dass die intrazelluläre Oberfläche des aktiven Rezeptors bezüglich Struktur und Ladung komplementär zur aktiven GRK-

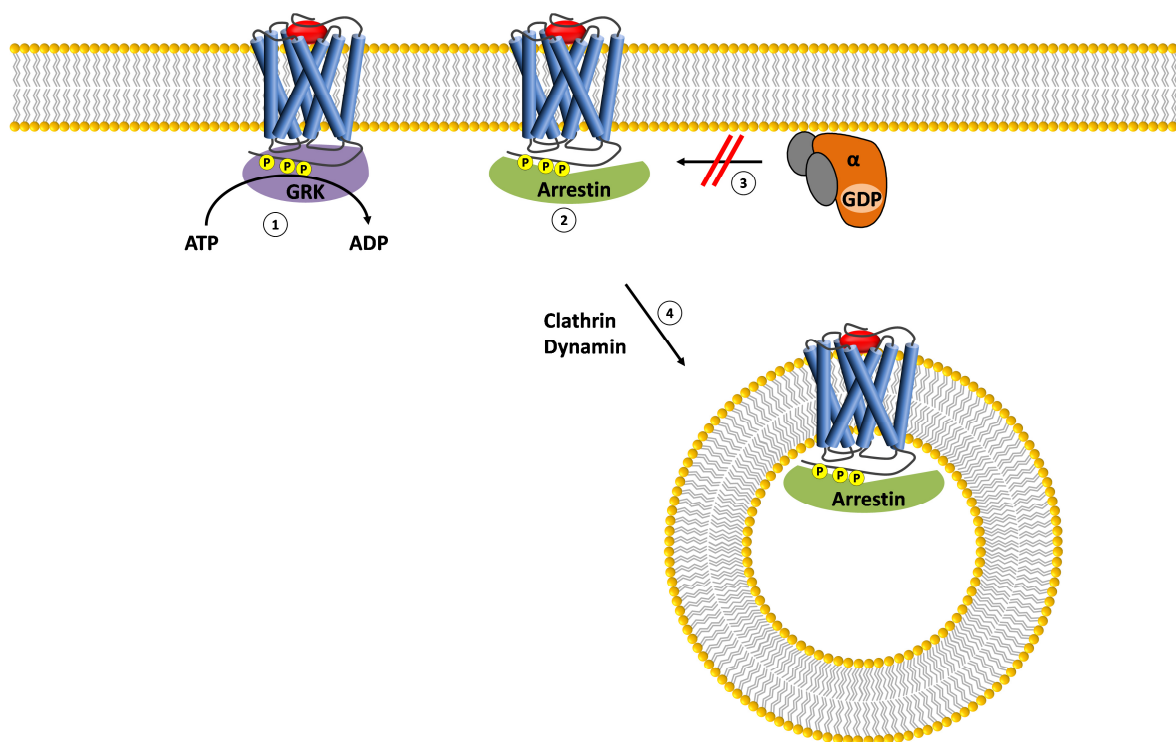


Abb. 1-3. „Klassische“ Rezeptor Desensibilisierung. Der aktivierte Rezeptor wird von der GPCR-Kinase (GRK) phosphoryliert (1). Durch eine hochaffine Bindung von Arrestin an den aktivierten phosphorylierten Rezeptor (2) wird die G-Protein-Kopplung unterbrochen (3). Über eine Interaktion des Arrestins an das Adapterprotein AP-2 kann eine Clathrin-vermittelte Endozytose eingeleitet werden (4).

Konformation ist und diese somit stabilisiert. Als Folge wird der Rezeptor, aber auch alle Substrate, die sich in näherer Umgebung befinden, durch die Kinase phosphoryliert, sobald diese an einen Rezeptor gebunden hat [93].

Neben der Fähigkeit, aktive Rezeptoren zu phosphorylieren, um die Arrestin-Bindung zu initiieren, sind GRKs auch an phosphorylierungsunabhängigen Desensibilisierungs-Mechanismen beteiligt [73]. GRK2 ist in der Lage, an aktiviertes $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$ [101–104] und $G\alpha_s$ [105] zu binden und somit die IP_3 -Bildung zu inhibieren [81]. Die Interaktion wird über die RH-Domäne von GRK vermittelt. An der GRK2- $G\alpha_q$ -Interaktion sind unter anderem die Aminosäuren R106 und D110 des GRK2 eingebunden, welche zu Y261 des $G\alpha$ Wasserstoffbrücken ausbilden [106]. Ein Austausch dieser Aminosäuren in GRK2 (GRK2-R106A bzw. GRK2-D110A) verhindert die $G\alpha_q$ -Bindung [107], wodurch die phosphorylierungsunabhängige Desensibilisierung inhibiert wird [108].

Im Zusammenhang mit der phosphorylierungsunabhängigen Desensibilisierung sind zahlreiche weitere Interaktionspartner von GRKs bekannt [109,110]. Die Bindung von GRK2 an $G\beta\gamma$ spielt z.B. in der raschen, nicht-enzymatischen Desensibilisierung von GIRK eine Rolle [111]. Des Weiteren kann GRK2 an Clathrin binden. Diese Bindung wird über den C-Terminus von GRK2 vermittelt [112] und spielt eine Rolle in der Arrestin-unabhängigen Internalisierung von β -adrenergen Rezeptoren [113]. Ein weiterer GRK2-vermittelter phosphorylierungsunabhängiger Desensibilisierungsmechanismus involviert die direkte Interaktion mit dem Rezeptor, wodurch dieser sterisch blockiert wird. Beispiele hierfür sind die GRK2-Bindung an den ET_A Rezeptor [114] und den metabotropen Glutamat-Rezeptor 1a [115,116].

1.2.4.2 Arrestine

Die Desensibilisierung von GPCRs wird oft über die Bindung von Arrestinen [117,118] vermittelt, wobei deren Bindungsaffinitäten zum Rezeptor durch die Phosphorylierung des Rezeptors erhöht werden [78,119]. Es sind die vier humanen Arrestine 1-4 bekannt, wobei die Expression der Arrestine 1 [120,121] und 4 [122,123] hauptsächlich auf Zapfen bzw. Stäbchen in der Retina beschränkt ist, wo sie als visuelle Arrestine am Sehprozess beteiligt sind. Die ubiquitären, nicht-visuellen [124,125] Arrestine 2 und 3 werden auch als β -Arrestine 1 und 2 bezeichnet, da sie ursprünglich im Zusammenhang mit der Desensibilisierung des β_2 -adrenergen Rezeptors identifiziert wurden [124,126].

Für die Bindung von Arrestin 1 an Rhodopsin wurde ein sequenzielles Modell postuliert, welches von einem Aktivierungssensor und einem Phosphatsensor im Arrestin ausgeht [127,128]. Der Aktivierungssensor ist in der Lage, durch ionische Interaktionen spezifisch an Elemente des Rezeptors zu binden, die ihre Konformation im Zuge der Rezeptoraktivierung ändern. Dadurch werden Wechselwirkungen zwischen einer N- und einer C-

Domäne gelockert. Des Weiteren ist zwischen den beiden Arrestin-Domänen ein Netzwerk aus Wasserstoffbrücken (*polar core*) ausgebildet, welches als Phosphatsensor fungiert und das Protein in einer inaktiven Konformation hält. Der Kontakt zu Phospho-*Clustern* des mehrfach phosphorylierten Rezeptors bricht das *polar core* auf und die aktive Konformation kann eingenommen werden. Ist ein Rezeptor im aktiven Zustand und gleichzeitig phosphoryliert, binden beide Sensoren und es werden zusätzlich hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Arrestin ausgebildet, die eine hochaffine Bindung ermöglichen.

Nicht ganz so eindeutig scheint der Fall für die nicht-visuellen Arrestine zu sein. So wurde für eine Reihe nicht-phosphorylierter GPCRs eine β -Arrestinbindung beschrieben [129–134]. Verglichen mit den visuellen Arrestinen haben β -Arrestine allgemein eine weniger stark ausgeprägte Präferenz für phosphorylierte aktive Rezeptoren gegenüber phosphorylierten inaktiven bzw. nicht-phosphorylierten aktiven Rezeptoren. Dennoch wird ein ähnlicher Mechanismus der Bindung von β -Arrestinen an GPCRs vermutet [128]. Auch hier kann die Bindungsaffinität des Rezeptors zum Arrestin durch eine Rezeptor-Phosphorylierung erhöht werden [78]. Im Gegensatz zu den visuellen Arrestinen sind die β -Arrestine an der Regulation vieler hundert verschiedener GPCRs mit geringer Sequenzhomologie der intrazellulären Bereiche und mit unterschiedlichen Phosphorylierungsmustern beteiligt [135]. Daraus ergeben sich unterschiedlich stark ausgeprägte Rezeptor-Arrestin-Affinitäten. Basierend auf ihrer Fähigkeit β -Arrestine zu binden, werden zwei Klassen GPCRs unterschieden [136,137]. Klasse A-Rezeptoren wie z.B. der β_2 -adrenerge Rezeptor oder der ET_A -Rezeptor binden bevorzugt an β -Arrestin 2. Diese Bindung ist jedoch transient. Der Rezeptor-Arrestin-Komplex dissoziiert nach der Bildung von *clathrin coated pits* [138,139]. Klasse B-Rezeptoren wie der Angiotensin II Typ 1A-Rezeptor oder der Neurotensin 1-Rezeptor hingegen binden gleichermaßen stabil an beide β -Arrestine. Diese Bindung bleibt nach der Endozytose der Rezeptoren erhalten [138,139].

Arrestine beeinflussen die Signaltransduktion von GPCRs auf vielfältige Weise. Durch die Bindung an den Rezeptor wird die Rezeptor-G-Protein-Kopplung sterisch inhibiert. Zusätzlich zur Entkopplung des aktiven Rezeptors vom G-Protein initiieren Arrestine die Degradation von *Second Messenger*-Molekülen. So werden Phosphodiesterasen [140] und Diacylglycerolkinasen [141] Arrestin-abhängig zum Rezeptor rekrutiert, wodurch die Spaltung von cAMP bzw. der Abbau von DAG zu Phosphatidsäure katalysiert wird. Weiterhin sind Arrestine an der Rezeptor-Internalisierung beteiligt, indem sie über das Adapterprotein AP-2 an Clathrin binden [142] und so die Clathrin-vermittelte Endozytose veranlassen [143].

1.2.5 G-Protein-unabhängige Signaltransduktion

β -Arrestine sind nicht nur als negative Regulatoren der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion wirksam, sondern sind auch an einer G-Protein-unabhängigen Signaltransduktion maßgeblich beteiligt [77,144]. Sie fungieren in diesem Zusammenhang als multifunktionelle Adapterproteine und rekrutieren eine Vielzahl von Signalmolekülen zum Rezeptor [145]. So wird z.B. die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kaskade aktiviert und die Kinasen ERK1 und ERK2 (*extracellular signal regulated kinases*) phosphoryliert. Im Gegensatz zur klassischen, G-Protein-vermittelten ERK-Aktivierung ist die durch Arrestin induzierte ERK-Phosphorylierung verzögert und hält länger an [146]. Des Weiteren sind β -Arrestine in der Lage, ihr Signal über Src [147], *nuclear factor- κ B* und die Phosphoinositid-3-Kinase zu vermitteln [148]. Die über β -Arrestine vermittelten alternativen Signale unterscheiden sich funktionell und physiologisch von den klassischen G-Protein-abhängigen Signalen.

Ob für die β -Arrestin-vermittelte Signaltransduktion eine andere Rezeptor-Konformation als für die β -Arrestin-vermittelte Desensibilisierung erforderlich ist, wurde bisher nicht untersucht [148]. Es ist jedoch eine Rezeptor-Phosphorylierung an der Aktivierung G-Protein-unabhängiger Signalwege beteiligt, wobei das Phosphorylierungsmuster eine entscheidende Rolle zu spielen scheint. Wie bei einem *Barcode* kann die Komposition der Phosphogruppen das Signal beeinflussen [21,149–151]. Wahrscheinlich nehmen β -Arrestine aufgrund verschiedener Rezeptor-Phosphorylierungsmuster bestimmte aktive Konformationen ein [152]. Erfolgt die Rezeptor-Phosphorylierung durch Kinasen mit unterschiedlicher Substratspezifität und gewebsspezifischer Expression, kann somit eine Zelltyp-spezifische Antwort vermittelt werden [153].

1.2.6 Internalisierung von GPCRs

Die Endozytose von GPCRs nach der Stimulation mit einem Agonisten ist ein häufig beobachtetes Phänomen. Ursprünglich wurde angenommen, dass es sich - neben der bereits beschriebenen funktionellen Entkopplung vom G-Protein - um einen weiteren Desensibilisierungsmechanismus handelt, da der Rezeptor ins Zellinnere gebracht wird und somit physisch vom G-Protein entkoppelt ist [154]. Mittlerweile geht man jedoch davon aus, dass die Rezeptor-Internalisierung vor allem der Resensibilisierung bereits entkoppelter Rezeptoren dient [155,156]. Zusätzlich sind internalisierte Rezeptoren an alternativen Signaltransduktionsmechanismen beteiligt [157,158].

Bei der Endozytose über sogenannte Stachelsaumgrübchen (*clathrin coated pits*) lagern sich an der Plasmamembran hexamere Clathrin-Einheiten an, die zu einem nach innen gestülpten polyedrischen Clathrinmantel zusammenwachsen [159]. Dadurch wird eine Invagination der Plasmamembran herbeigeführt. Clathrin wird dabei vom Adapter-

komplex AP-2 mit der Membran verknüpft. AP-2 interagiert ebenfalls mit Membranproteinen, um diese für die Endozytose in den Stachelsaumgrübchen anzureichern. Dynamin, eine GTPase, führt schließlich zur Ablösung des sich formenden Vesikels (*clathrin coated vesicle*) [160,161]. Internalisierte Rezeptoren werden anschließend sortiert und gelangen entweder über Recycling-Endosomen zur Plasmamembran zurück oder werden zum Abbau in Lysosome befördert [162,163].

Für eine Vielzahl von Rezeptoren nehmen β -Arrestine eine Schlüsselrolle bei der Clathrin-vermittelten Internalisierung ein [164]. Als Adapterproteine binden sie an AP-2 und an Clathrin [165,166] und interagieren mit Phosphoinositiden [167]. Somit werden gebundene GPCRs zur Endozytosestelle rekrutiert (Abb. 1-3). Des Weiteren fungieren β -Arrestine als Gerüst für Proteinkomplexe, die in die Rezeptor-Internalisierung eingebunden oder am Prozess der Sortierung der Rezeptoren beteiligt sind [143].

GPCRs können neben der Clathrin-vermittelten Endozytose auch über weitere, weniger gut charakterisierte Mechanismen internalisiert werden [168,169]. So kann die Endozytose in Caveolae [170] initiiert werden [171]. Diesen sackförmigen Einbuchtungen wird neben der Fähigkeit zur Endozytose von Zelloberflächenrezeptoren auch eine Rolle in der Signaltransduktion zugeschrieben [172]. In Caveolae ist ebenfalls Dynamin lokalisiert, welches unter GTP-Hydrolyse an der Abschnürung der Vesikel beteiligt ist [173–175].

Es existieren weitere sowohl Clathrin- als auch Caveolae-unabhängige GPCR-Internalisierungsmechanismen (zusammengefasst in [176–178]).

1.3 Endothelin-Rezeptoren

1.3.1 Das Endothelin-System

Das Peptidhormon Endothelin 1 (ET-1) besteht aus 21 Aminosäuren und besitzt einen hydrophoben C-terminus. Am N-terminus befinden sich zwei Cysteinbrücken. Die beiden strukturell sehr ähnlichen Peptide ET-2 und ET-3 unterscheiden sich lediglich durch zwei bzw. sechs Aminosäuren vom Hauptmitglied der Endothelin-Familie.

Im Menschen wird das Endothelin-Signal über die zwei Endothelin-Rezeptoren ET_A und ET_B vermittelt, welche zur Superfamilie der GPCRs gehören. Der ET_A -Rezeptor besteht aus 427 Aminosäuren und bindet die Endothelin-Isoformen mit unterschiedlichen Affinitäten in der Reihenfolge $ET-1 \geq ET-2 \gg ET-3$ [179,180]. Der ET_B -Rezeptor mit 442 Aminosäuren hingegen bindet ET-1, ET-2 und ET-3 mit annähernd gleicher Affinität [181]. Aufgrund der hohen Affinität der Endothelin-Rezeptoren für deren Agonisten bleiben diese nach der Bindung für lange Zeit mit dem Rezeptor assoziiert [114,182–185]. Obwohl die

Endothelin-Rezeptoren hauptsächlich an $G_{q/11}$ -gekoppelt sind [186,187], kann das Signal Zelltyp-spezifisch auch über G_s [188,189], G_i/o [190–193], G_z [194] und $G_{12/13}$ [195,196] vermittelt werden, wobei eine Vielzahl unterschiedlicher Signalkaskaden involviert ist [197]. Die beiden Endothelin-Rezeptoren lösen oftmals gegensätzliche Zellantworten aus [198,199].

Neben den verschiedenen Endothelin-Isoformen und deren Rezeptoren gehören auch die Endothelin-Konversionsenzyme (*endothelin-converting enzymes*, ECEs) zum Endothelin-System. Diese membrangebundenen Metalloproteasen sind in die Endothelin-Synthese eingebunden: ET-1 entsteht durch einen mehrstufigen proteolytischen Abbau des 212 Aminosäuren umfassenden Preproendothelin-1 [200]. Als erstes wird eine kurze Signalsequenz entfernt, um Proendothelin-1 zu erhalten, welches weiter zu Big-ET-1, bestehend aus 38 Aminosäuren, prozessiert wird [201]. Big-ET-1 kann sowohl intra- als auch extrazellulär von ECEs gespalten werden, wodurch das reife ET-1 entsteht.

1.3.2 Physiologische Relevanz des Endothelin-Systems

ET-1 wird von einer Vielzahl an unterschiedlichen Zellen gebildet. Dazu gehören vaskuläre Endothelzellen, vaskuläre Glattmuskelzellen, Epithelzellen der Atemwege, Makrophagen, Fibroblasten, kardiale Myozyten, Neuronen und Pankreas-Inselzellen [200]. Ursprünglich wurde ET-1 auf der Suche nach einem vom Endothelium sekretierten kontraktilem Faktor [202] aus dem Kulturüberstand von porcinen Endothelzellen der Aorta isoliert [203]. In der Tat gilt ET-1 bis heute als der potenteste Vasokonstriktor. Es ist jedoch auch in zahlreiche andere physiologische und pathophysiologische Zusammenhänge involviert [204]. Im vaskulären System hat ET-1 durch die Stimulation des ET_A -Rezeptors der Glattmuskelzellen eine basale vasokonstriktive Funktion und trägt zur Entwicklung von Bluthochdruck und Atherosklerose bei [205]. Die Stimulation des von Endothelzellen exprimierten ET_B -Rezeptors führt hingegen zu einer Stickstoffmonoxid-Ausschüttung und somit zur Relaxation der Glattmuskelzellen [206]. Im Herzen wirkt ET-1 positiv chronotrop [207], positiv inotrop [208] sowie arrhythmogen [209] und ist am durch Herzversagen verursachten *Remodelling*-Prozess beteiligt [210]. Ebenso wird das Myozyten-Wachstum angeregt [211]. In der Lunge steuert das Endothelin-System den Gefäßtonus der Bronchien sowie die Proliferation der Blutgefäße und kann somit zur Entstehung einer pulmonaren Hypertonie beitragen [212]. Unter physiologischen Bedingungen reguliert ET-1 den renalen Natrium- und Wassertransport sowie den Blutfluss im Nierenmark [206]. Im Gehirn werden kardiorespiratorische Zentren sowie die Ausschüttung von Hormonen reguliert [204]. Des Weiteren beeinflusst das Endothelinsystem das Immunsystem, den Glukosehaushalt sowie diverse Vorgänge in Leber, Muskel, Knochen, Haut, Prostata, Fettgewebe und im Reproduktionstrakt [213].

1.3.3 Desensibilisierung der Endothelin-Rezeptoren

Obwohl Endotheline lang anhaltende physiologische Antworten auslösen können [214], unterliegen deren Rezeptoren während kontinuierlicher Stimulation einer homologen Desensibilisierung [215]. Den Kinasen GRK2 [114,216,217] und GRK3 [215] wird eine Beteiligung hieran zugeschrieben. Der zugrundeliegende Mechanismus ist jedoch nicht eindeutig geklärt. In einer Studie von Freedman *et al.* [114] wurden ET_A- und ET_B-Rezeptoren in HEK 293-Zellen nach Stimulation mit ET-1 durch GRK2 phosphoryliert. Sowohl die ET-1-induzierte Phosphorylierung des ET_A-Rezeptors als auch dessen Desensibilisierung wurde durch eine Inhibition von GRK2 beeinträchtigt. Auch in arteriellen Glattmuskelzellen konnte sowohl durch GRK2-*Knockdown* als auch durch die Expression einer katalytisch inaktiven GRK2-Mutante die ET_A-Desensibilisierung gehemmt werden [217]. Die Regulation des ET_A-Rezeptors könnte demzufolge über einen phosphorylierungsabhängigen GRK2-vermittelten Mechanismus ablaufen. Tatsächlich wurden im ET_A-Rezeptor massenspektrometrisch 15 Phosphorylierungsstellen nachgewiesen [218]. Unter diesen sind 13 Ser/Thr-Reste, welche in der dritten intrazellulären Schleife und in der C-terminalen Domäne des Rezeptors lokalisiert sind (Abb. 1-4).

Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass weitere, phosphorylierungsunabhängige GRK-vermittelte Mechanismen an der Regulation des ET_A-Rezeptors beteiligt sind (siehe auch Kapitel 1.2.4.1). So wurde in der oben erwähnten Studie von Freedman *et al.* [114] das Signal des ET_A-Rezeptors durch die Expression der katalytisch inaktiven GRK2-K220R-Mutante in ähnlicher Weise inhibiert wie durch die Expression der katalytisch aktiven Wildtyp-Form. Die Autoren schlugen einen phosphorylierungsunabhängigen Desensibilisierungsmechanismus vor und wiesen eine Assoziation von GRK2 mit dem Rezeptor nach.

1.3.4 Internalisierung und *Trafficking* der Endothelin-Rezeptoren

Die beiden Endothelin-Rezeptoren ET_A und ET_B werden Agonisten-induziert internalisiert [219,220]. Hierfür existieren verschiedene Endozytosemechanismen. In CHO-Zellen wurde für beide Endothelin-Rezeptoren ein Mechanismus beschrieben, der von GRK, Arrestin, Dynamin und Clathrin abhängig ist [221,222]. Für den ET_A- sowie für den ET_B-Rezeptor wurde in HEK 293-Zellen ein β -Arrestin-abhängiger, jedoch Clathrin-unabhängiger Internalisierungsmechanismus belegt [142]. Claing *et al.* [223] wiesen in HEK 293-Zellen eine β -Arrestin-unabhängige aber Dynamin-vermittelte Internalisierung des ET_B-Rezeptors nach, wobei es sich vermutlich um eine Endozytose über Caveolae handelte [224]. Tatsächlich sind beide Rezeptoren in Caveolae lokalisiert [225–228]. Okamoto *et al.* [229] beschrieben für den ET_A-Rezeptor einen vom oxidativen Zustand des sich in der Zellmembran befindlichen Cholesterins abhängigen Prozess: Bevorzugt wird in CHO-Zellen eine Caveolae-vermittelte Endozytose; nach Oxidation des Cholesterins wird jedoch ein zweiter, Arrestin-abhängiger Clathrin-vermittelter Endozytoseweg eingeschlagen.

Nach der Internalisierung wird der ET_B-Rezeptor zusammen mit dem gebundenen Agonisten lysosomal abgebaut [221,222] und nimmt somit eine Rolle in der Beseitigung von ET-1 aus dem Blut ein [230,231]. Der ET_A-Rezeptor hingegen gelangt erneut an die Zellmembran [221]. Das *Recycling* des ET_A-Rezeptors ist von einem im C-Terminus befindlichen internen Ligandanden für PDZ-Adapterproteine determiniert [232,233]. PDZ-Proteine, welche nach drei ihrer Familienmitglieder (*postsynaptic density protein*, *Drosophila disc large tumor suppressor* und *zonula occludens-1 protein*) benannt sind, können eine Vielzahl membranassoziierter Proteine und Signalmoleküle in kurzlebigen funktionellen Einheiten assemblieren und sind somit z.B. am Transport vieler GPCRs beteiligt [234].

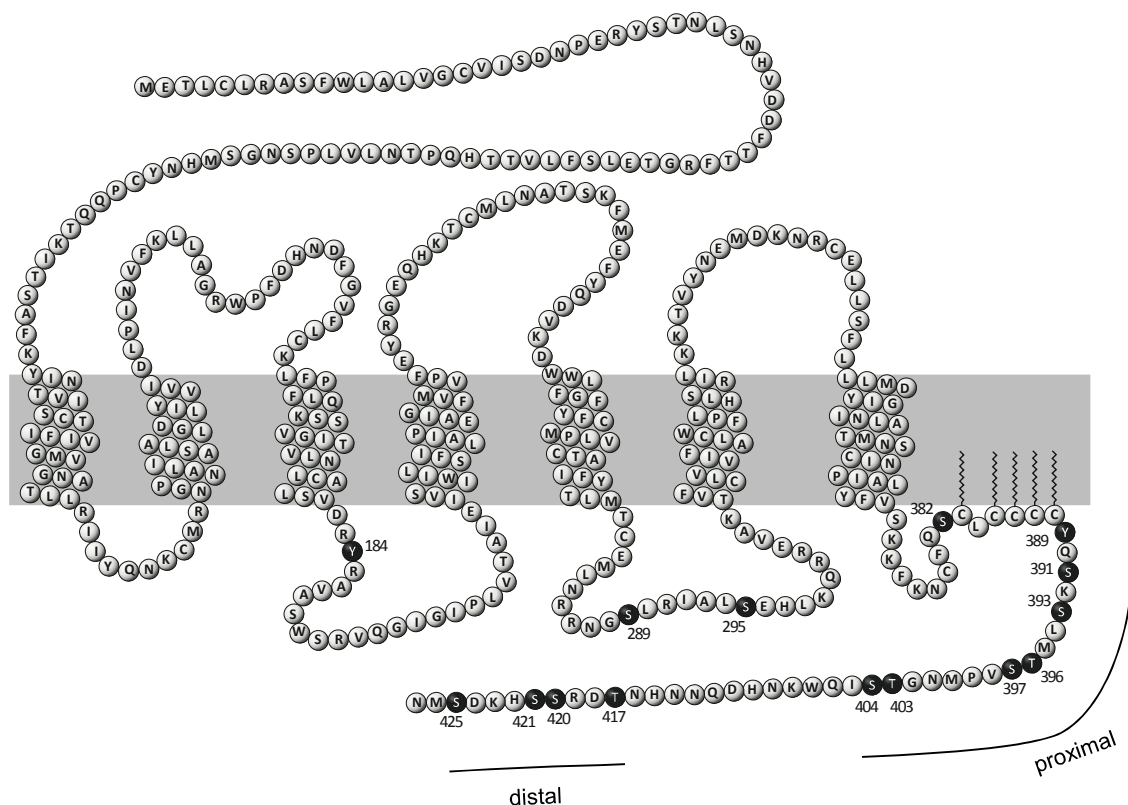


Abb. 1-4. Posttranslationale Modifizierungen des ET_A-Rezeptors. Gezeigt ist die Aminosäuresequenz des humanen ET_A-Rezeptors. Die Plasmamembran ist als grauer Balken dargestellt. In dieser Arbeit wurden Punktmutationen an bekannten Phosphorylierungsstellen des ET_A-Rezeptors eingefügt (schwarz gekennzeichnet). Palmitoylierungen sind durch Zickzack-Linien repräsentiert. Posttranslationale Modifizierungen sind [218], Transmembrandomänen dem NCBI-Eintrag P25101 entnommen. *Cluster* an Phosphorylierungsstellen treten in der Sequenz nach den Palmitoylierungsstellen auf. Diese Sequenz (Aminosäuren Y389 bis N427) wird in dieser Arbeit als C-terminale Extremität (CTE) bezeichnet. Unterschieden werden hierbei die Phosphorylierungsstellen in einem proximalen und einem distalen *Cluster*.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) unterliegen fein abgestimmten Regulationsmechanismen, um einer Überstimulation der Zelle vorzubeugen. So nimmt auch das Signal des ET_A-Rezeptors bei kontinuierlichem oder wiederholtem Stimulus ab. Das klassische Paradigma der GPCR-Desensibilisierung, welches vor allem für den β_2 -adrenergen Rezeptor beschrieben wurde, beinhaltet eine GPCR-Kinase (GRK)-vermittelte Phosphorylierung des Rezeptors in der dritten intrazellulären Schleife und in der C-terminalen Domäne. Daraufhin kommt es zur Bindung von β -Arrestinen. Wie Studien aus den letzten beiden Dekaden gezeigt haben, können GRKs die Interaktion zwischen Rezeptor und G-Protein allerdings auch phosphorylierungsunabhängig unterbinden.

Die Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors wird durch GRK2 vermittelt. Ob jedoch phosphorylierungsabhängige oder -unabhängige Mechanismen involviert sind oder ob beides zutrifft, ist bisher ungeklärt. Ebenso gibt es bisher keine Informationen über die Position eventuell eingebundener Phosphorylierungsstellen und darüber, ob gegebenenfalls eine hierarchische Phosphorylierung erfolgt. Massenspektrometrisch wurden bereits zahlreiche phosphorylierte Ser/Thr-Reste in der dritten intrazellulären Schleife und im C-Terminus des ET_A-Rezeptors gefunden.

Ein zentrales Ziel dieser Arbeit bestand in der Untersuchung der Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors. Es sollte geprüft werden, ob hierbei ein phosphorylierungsabhängiger Mechanismus vorliegt und falls ja, welche Phosphorylierungsstellen relevant sind. Dazu wurden verschiedene Rezeptor-Mutanten mit deletierten Phosphorylierungsstellen generiert und in der Zelllinie HEK 293 exprimiert. Die *Second Messenger*-Produktion der phosphorylierungsdefizienten Rezeptoren während kontinuierlichem ET-1-Stimulus wurde als Indikator für die Desensibilisierung verwendet. In Zellen, die den wildtypischen oder einen phosphorylierungsdefizienten ET_A-Rezeptor exprimieren, sollte der Mechanismus der GRK2-vermittelten Desensibilisierung aufgeklärt werden. Hierfür wurden einerseits verschiedene GRK2-Mutanten überexprimiert und andererseits die endogene GRK2-Expression mit Hilfe von siRNA herunterreguliert.

Ein weiteres Ziel bestand in der Analyse der Rezeptor-Phosphorylierung im Zusammenhang mit der Internalisierung des ET_A-Rezeptors. Hierfür wurde die Agonisten-induzierte Endozytose des wildtypischen und eines phosphorylierungsdefizienten Rezeptors im Fluoreszenzmikroskop beobachtet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tab. 2-1. Übersicht über die verwendeten Geräte.

Gerät	Bezeichnung/Modell	Hersteller
CCD-Kamera, Fluoreszenzmikroskopie	- CCD-1300B - C9100	VDS Vosskühler GmbH Hamamatsu
Dokumentationsanlage	MultImage™ Light Cabinet	Alpha Innotech Corporation
Elektrophoresekammer, Agarosegelelektrophorese	OWL Separation Systems	Thermo Scientific
Elektrophoresekammer, SDS-PAGE	Mini-PROTEAN® 3 Cell	Bio-Rad
Fluoreszenzmikroskop	- Eclipse TE2000-U - IX71	Nikon Olympus
Gamma-Zähler	- Multi Crystal LB2111 - PC-RIA	Berthold Technologies STRATEC Biomedical AG
Inkubator, Bakterien	BE 600	Memmert
Inkubator, Zellkultur	AutoFlow NU-4500E	Nuaire
Laser Scanning-Mikroskop	LSM 780	Zeiss
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Infinite® M1000	Tecan
Proteintransfer-System	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad
Real-Time-PCR System	StepOnePlus™	Applied Biosystems
Sequenzierautomat	ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Thermocycler	- T3 - T-Gradient	Biometra Biometra
UV-Photometer	NanoDrop ND2000	Peqlab
Zentrifuge	- ProteomeLab™ SP - 5810 R - Biofuge 13 - Universal 30 RF	Beckman Coulter Eppendorf Heraeus Instruments Hettich

2.1.2 Chemikalien

ET-1 und Isoprenalin wurde von Sigma-Aldrich, HiLyte Fluor™ 488-markiertes ET-1 von AnaSpec bezogen. Alle weiteren in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich, Roth, Merck, Promega, Biozym, Biomol, PAA oder Biochrom AG bezogen und entsprachen der jeweils höchsten verfügbaren Reinheitsstufe.

2.1.3 Puffer, Medien und Lösungen

Tab. 2-2. Übersicht über die verwendeten Puffer, Medien und Lösungen.

Bezeichnung	Hersteller/Zusammensetzung
Antikörperlösung	TBST; 0,5 % (v/v) Magermilchpulver
BCA-CuSO ₄ -Lösung	Bicinchoninsäure; 2 % (v/v) CuSO ₄
Bindepuffer A	10 mM Tris; 154 mM NaCl; pH 7,4
Bindepuffer B	Hanks' balanced salt solution mit 20 mM HEPES; 0,2 % (w/v) BSA und 0,1 % Glucose; pH 7,4
DMEM ¹	Gibco® 4,5 g/L Glukose; L-Glutamin; 25 mM HEPES; Phenolrot
DMEM-Wachstumsmedium	DMEM; 10 % (v/v) FCS (PAA); 100 U/mL Penicillin; 100 µg/mL Streptomycin
dNTP-Mix	10 mM dATP; 10 mM dCTP; 10 mM dGTP; 10 mM dTTP
Ladepuffer, Agarosegelelektrophorese	TE-Puffer; 50 % (v/v) Glycerol; 1 µM EDTA; 0,5 % (w/v) Xylencyanol
Lysepuffer	PBS; 0,2 % (v/v) Triton® X-100; Proteinase-Inhibitor-Cocktail (Sigma-Aldrich #P2714; Einsatz: 0,32-fach)
LB-Medium (Lennox) ¹	Carl Roth
Magermilchpulver-Lösung	TBST; 5 % (v/v) Magermilchpulver
PBS	PAA Laboratories
<i>Pfu</i> -Puffer ¹	Fermentas
Ponceau-S Lösung	0,5 % (w/v) Ponceau-S; 1 % (v/v) Essigsäure
Probenpuffer, SDS-PAGE	125 mM Tris; 4 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) Glycerin; 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; pH 7,0
Ringer-Lösung	147 mM NaCl, 4 mM KCl; 2,3 mM CaCl ₂
SDS-PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris; 200 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS
TBE-Puffer	90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 20 mM EDTA; pH 8,0
TE-Puffer	10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 7,4
TBST	100 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl; 0,1 % (v/v) Tween 20; pH 7,5
Transferpuffer	50 mM Tris; 40 mM Glycin; 1,3 mM SDS; 20 % (v/v) Methanol
Trypsin/EDTA	Biochrom PBS; 0,05 % (w/v) Trypsin; 0,02% (w/v) EDTA

¹ Die Zusammensetzung kann den Herstellerangaben entnommen werden.

2.1.4 Reagenziensätze

Tab. 2-3. Übersicht über die verwendeten Reagenziensätze.

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing-Kit	Sanger-Sequenzierung	Applied Biosystems
cAMP HiRange-Kit	cAMP Messung	Cisbio Bioassays
DyeEx 2.0 Spin-Kit	Sanger-Sequenzierung	Qiagen
IP-One Tb-Kit	IP ₁ Messung	Cisbio Bioassays
QIAGEN Plasmid Midi-Kit	Plasmidisolierung	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep-Kit	Plasmidisolierung	Qiagen
QIAquick Gel Extraction-Kit	DNA Reinigung	Qiagen
QIAquick PCR Purification-Kit	DNA Reinigung	Qiagen
QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis-Kit	Zielgerichtete Mutagenese	Agilent Technologies
RNeasy® Mini-Kit	RNA-Isolierung	Qiagen
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Real-Time PCR	Applied Biosystems
TOPO® TA Cloning Dual Promoter-Kit	Klonierung	Invitrogen

2.1.5 Antikörper

Tab. 2-4. Übersicht über die verwendeten Antikörper.

Antikörper	Antigen / Beschreibung	Hersteller und Katalognr.
GRK 2/3 Maus, monoklonal	synthetisches GST-Fusionsprotein gemäß Aminosäuren 767-688 der GRK3	Upstate #05-465
ET_A-Rezeptor Kaninchen, polyklonal	synthetisches Peptid gemäß den Aminosäuren 413-426 des Ratten-ET _A -Rezeptors	Alomone Labs #AER-001
anti-Maus IgG Ziege, polyklonal	sekundär-Antikörper, HRP-konjugiert	BD Biosciences #554002
anti-Kaninchen IgG Esel, polyklonal	sekundär-Antikörper, HRP-konjugiert	GE Healthcare #NA934
GAPDH Maus, monoklonal	Kaninchenmuskel-GAPDH	Abcam #ab8245

2.1.6 Enzyme

Tab. 2-5. Übersicht über die verwendeten Enzyme.

Enzym	Verwendung	Hersteller
HotStarTaq DNA Polymerase	Kolonie-Kontroll-PCR	Qiagen
Pfu-Polymerase	PCR	Fermentas
Superscript®II Reverse Transkriptase	cDNA Synthese	Invitrogen
Restriktionsendonukleasen	Restriktion	Fermentas
T4 DNA Ligase	Ligation	Fermentas
Taq-Polymerase	Anfügen eines 3'-Adenosins	GE Healthcare

2.1.7 Plasmide

Tab. 2-6. Übersicht über die in dieser Arbeit eingesetzten bzw. als Ausgangsplasmid für Klonierungen verwendeten Konstrukte. Die im pBSK-Vektor befindlichen DNA-Sequenzen wurden durch ATG:biosynthetics synthetisch hergestellt.

Konstrukt	Insert	Verwendung
pBSK-partial_ETA-10PD	C-terminaler Bereich des ET _A -Rezeptors (205 bp), gefolgt von einer NotI-Schnittstelle; enthält 10 Punktmutationen (Ser/Thr → Ala).	Ausganskonstrukt zur Klonierung von pLPCX-ETA-10PD
pBSK-partial_ETA-4PD	C-terminaler Bereich des ET _A -Rezeptors (205 bp), gefolgt von einer NotI-Schnittstelle; enthält 4 Punktmutationen (Ser/Thr → Ala).	Ausganskonstrukt zur Klonierung von pLPCX-ETA-4PD
pBSK-partial_ETA-6PD	C-terminaler Bereich des ET _A -Rezeptors (205 bp), gefolgt von einer NotI-Schnittstelle; enthält 6 Punktmutationen (Ser/Thr → Ala).	Ausganskonstrukt zur Klonierung von pLPCX-ETA-6PD
pBSK-partial_ETA-6E	C-terminaler Bereich des ET _A -Rezeptors (205 bp), gefolgt von einer NotI-Schnittstelle; enthält 6 Punktmutationen (Ser/Thr → Glu).	Ausganskonstrukt zur Klonierung von pLPCX-ETA-6E
pBSK-partial_ETA-8PD	C-terminaler Bereich des ET _A -Rezeptors (205 bp), gefolgt von einer NotI-Schnittstelle; enthält 8 Punktmutationen (Ser/Thr → Ala).	Ausganskonstrukt zur Klonierung von pLPCX-ETA-8PD
pBSK-partial_ETA-PD	C-terminaler Bereich des ET _A -Rezeptors (656 bp), gefolgt von einer NotI-Schnittstelle; enthält 14 Punktmutationen (Ser/Thr → Ala).	Ausganskonstrukt zur Klonierung von pLPCX-ETA-14PD und pLPCX-ETA-15PD
pBSK-partial_ETA-PDZPD	C-terminaler Bereich des ET _A -Rezeptors (205 bp), gefolgt von einer NotI-Schnittstelle; enthält 6 Punktmutationen (Ser/Thr → Ala).	Ausganskonstrukt zur Klonierung von pLPCX-ETA-PDZPD
pcDNA3-β-Arrestin 2-YFP	β-Arrestin 2-YFP	β-Arrestin 2-Translokationsexperiment
pcDNA3-GRK2	humane GRK2	<i>IP-One Tb-Assay</i> ; Klonierung von GRK2-D110A und GRK2-D110A/K220R
pCMV-XL5-ETA	humaner ET _A -Rezeptor	Template für PCR zur Klonierung von pLPCX-ETA-WT
pLPCX	-	Leervektor für Kontrollen; Zielvektor für Klonierung von pLPCX-ETA-WT
pmRuby-N1	mRuby (Konstrukt entspricht pECFP-N1 (Clontech) mit mRuby statt eCFP)	Zielvektor zur Klonierung von ETA-WT-mRuby und ETA-14PD-mRuby

2.1.8 Oligonukleotide

Nicht-markierte Oligonukleotide wurden von Microsynth und TaqMan Sonden bei TIB MOLBIOL bezogen. Eine Auflistung der verwendeten Oligonukleotide und Sonden befindet sich im Anhang.

2.1.9 siRNA

Für *Knockdown*-Experimente wurde validierte, unmodifizierte *Silencer*[®] siRNA von Ambion bezogen. Es wurde GRK2-spezifische siRNA (siRNA ID: 147) und Kontroll-siRNA (*Silencer*[®] *Negative Control* #1 siRNA) verwendet.

2.1.10 Bakterienstämme

Mit dem *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies) zielgerichtet mutierte Konstrukte wurden in den mitgelieferten Bakterienstamm XL-10 Gold transformiert. Für alle anderen molekularbiologischen Methoden wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α verwendet (s. Tab. 2-7).

Tab. 2-7. Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 α MCR	F ⁻ <i>endA1 supE44 thi-1 λ⁻ recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF)U169 ϕ80dlacZΔM15 mcrA Δ(mrr hsdRMS mcrBC)</i>	[235]
XL10-Gold	Tet ^r Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r</i>]	Agilent Technologies

2.1.11 Zelllinien

Für Zellkulturexperimente wurde die adhärent wachsende Zelllinie HEK 293 [236] aus humaner embryonaler Niere verwendet.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

Zur präparativen Amplifikation von DNA-Abschnitten wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction, PCR) unter Verwendung der *Pfu*-Polymerase (Fermentas) eingesetzt. Ein typischer Reaktionsansatz und das PCR-Programm für die

Standard-PCR ist Tab. 2-8 zu entnehmen. Eine optimale Hybridisierungstemperatur wurde jeweils im Bereich zwischen 55 und 65 °C mit Hilfe eines Temperaturgradienten ermittelt.

Tab. 2-8. PCR mit der Pfu-Polymerase. A) Zusammensetzung eines typischen 25 µL PCR-Reaktionsansatzes B) PCR-Standardprogramm

A		B			
Vol [µL]	Substanz	Schritt	Temp. [°C]	Zeit [min]	Zyklen
16 - x	ddH ₂ O	init. Denaturierung	95	2	1
2,5	<i>Pfu</i> -Puffer	Denaturierung	95	0,5	
2,5	dNTP-Mix	Hybridisierung	55 - 65	0,5	35
je 1,0	Oligonukleotide (10µM)	Elongation	72	2 pro kb	
x	<i>Template</i> -DNA (100 ng)	finale Elongation	72	15	1
1,75	DMSO				
0,25	<i>Pfu</i> -Polymerase				

2.2.2 Kolonie-Kontroll-PCR

Für die Analyse von Plasmid-DNA in Bakterienkolonien wurde die Kolonie-Kontroll-PCR mit der *HotStarTaq*-DNA-Polymerase (Qiagen) und vektorspezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Hierfür wurde ein Teil der Bakterienkolonie in den PCR-Reaktionsansatz, der Tab. 2-9 zu entnehmen ist, überführt.

Tab. 2-9. Kolonie-Kontroll-PCR. A) Zusammensetzung des 20 µL PCR-Reaktionsansatzes B) PCR-Programm

A		B			
Vol [µL]	Substanz	Schritt	Temp. [°C]	Zeit [min]	Zyklen
14,5	H ₂ O	init. Denaturierung	95	15	1
2	<i>Taq</i> -Puffer	Denaturierung	94	1	
1	MgCl ₂ (25mM)	Hybridisierung	55 - 65	1	35
0,4	dNTP-Mix	Elongation	72	1 pro kb	
je 1	Oligonukleotide (10 µM)	finale Elongation	72	10	1
0,1	<i>HotStarTaq</i> DNA Polymerase				

2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Identifizierung und Reinigung von PCR-Produkten bzw. geschnittener DNA wurden die DNA-Fragmente in Ladepuffer in einem 1 %igen (M/V) Agarosegel in TBE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt und durch den interkalierenden Farbstoff *Gelstar*[®] *Nucleic Acid Gel Stain* (Cambrex) nach Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht. Zur Größenabschätzung

wurde der *1 kb DNA Ladder* von Fermentas verwendet. Die Dokumentation erfolgte im *MultimageTM Light Cabinet* (Alpha Innotec Corporation).

2.2.4 DNA-Reinigung

Die Reinigung von DNA wurde mit *Kits* von Qiagen entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Dabei bindet die DNA bei hohen Salzkonzentrationen an eine Silicagelmembran und kann mit einem basischen Puffer niedriger Salzkonzentration eluiert werden. PCR-Produkte wurden zur Reinigung und zur Volumenreduktion vor einer hydrolytischen Spaltung mit dem *QIAquick[®] PCR Purification Kit* behandelt. Enzymatisch gespaltene DNA-Fragmente, die zur Ligation eingesetzt werden sollten, wurden nach einer Agarosegelelektrophorese mit dem *QIAquick[®] Gel Extraction Kit* aus dem Gel extrahiert.

2.2.5 Restriktion

Hydrolytische Spaltung von DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen der Firma Fermentas entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Für eine präparative Restriktion wurde der Reaktionsansatz mind. 1 h bei 37°C inkubiert; bei einer Kontrollspaltung von Plasmid-DNA 20 min.

2.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten, welche zuvor mit Restriktionsenzymen geschnitten wurden und daher entsprechende *sticky ends* enthielten, wurde mit der T4 DNA-Ligase (Fermentas) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die Reaktionszeit betrug mind. 2 h bei einer Temperatur von 16 °C.

Alternativ konnten nicht-geschnittene PCR-Produkte in den linearisierten pCR[®] II-TOPO[®]-Vektor unter Verwendung des *TOPO[®] TA Cloning Dual Promoter Kits* entsprechend den Herstellerangaben (Invitrogen) ligiert werden. Hierfür wurde das PCR-Produkt zuvor mit *Taq*-Polymerase (GE Healthcare) inkubiert (10 min, 72 °C), um einen 3'-Adenosin-Überhang zu generieren.

2.2.7 Zielgerichtete Mutagenese

Der Austausch einer oder mehrerer Basen eines Basentriplets erfolgte mit dem *Quick Change Lightning Kit* (Agilent Technologies) nach Herstellerangaben oder alternativ mit der *Splicing-by-Overlap-Extension-PCR* (SOEing-PCR). Diese Methode ist eine Kombination dreier PCRs mit der *Pfu*-Polymerase. Man erhält nach der dritten PCR ein Amplifikat, welches die Mutation beinhaltet. Die Amplifikation dieses Abschnittes erfolgt mit einem *forward*- und einem *reverse*-Primer, welche mit Stellen auf der Template-DNA

hybridisieren, die *upstream* bzw. *downstream* von dem zu mutierenden Codon liegen. Als *Template* werden hierfür zwei PCR-Produkte eingesetzt, die zuvor mit dem oben genannten *forward*-Primer und einem *reverse mismatch*-Primer (1. PCR) bzw. mit dem oben genannten *reverse*-Primer und einem *forward mismatch*-Primer (2. PCR) generiert wurden. Die beiden *mismatch*-Primer enthalten - flankiert von jeweils 15 bis 20 komplementären Basen - die einzufügende Mutation und sind komplementär zueinander.

2.2.8 Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* in Flüssigkeit erfolgte bei 37 °C in LB-Medium, welchem Antibiotika für die Plasmid-Selektion (100 µg/mL Ampicillin bzw. 50 µg/mL Kanamycin) zugefügt wurden.

Die Langzeitlagerung der Bakterien erfolgte bei -80 °C. Zuvor wurden die Bakterien in einem 1:1 (v/v) LB-Medium/Glycerin-Gemisch resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.2.9 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* mit der CaCl₂-Methode

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* wurden 250 mL LB-Medium mit 5 mL einer Glycerin-freien *E. coli*-Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD₅₈₀ von 0,5 - 0,8 inkubiert. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 4 °C und 3.000 x g wurden die Bakterien auf Eis in 25 mL einer eiskalten 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Sediment auf Eis in 10 mL 50 mM CaCl₂ resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde mit 1,5 mL einer 87 %-igen Glycerinlösung versetzt und zu je 200 µL in vorgekühlte 1,5 mL Reaktionsgefäße gegeben. Diese wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.10 Transformation in chemisch kompetente *E. coli*

Zur Transformation der chemisch kompetenten Bakterien wurden diese auf Eis aufgetaut, mit Plasmid-DNA bzw. dem Ligationsansatz versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 2 min bei 42 °C. Nach einer Inkubation für 2 min auf Eis wurden 750 µL LB-Medium zugefügt und die Bakterien eine Stunde bei 37 °C über Kopf geschüttelt. Die transformierten Bakterien wurden auf LB-Agar-Platten mit Antibiotika für die Plasmid-Selektion (100 µg/mL Ampicillin bzw. 50 µg/mL Kanamycin) ausgestrichen.

2.2.11 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde aus *E. coli* mit Hilfe des *QIAprep[®] Spin Miniprep Kits* und des *Plasmid Midi Kits* entsprechend den Herstellerangaben (Qiagen) gereinigt. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei 260 nm.

2.2.12 Sequenzierung von DNA

Durch Sequenzierung nach Sanger [237] wurde die Basenabfolge der kodierenden Bereiche sämtlicher in dieser Arbeit generierten Plasmide verifiziert. Die Synthese des komplementären Einzelstrangs mit zufälligen Kettenabbrüchen erfolgte mit dem *BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben. Zur Trennung von den im Reaktionsansatz verbliebenen fluoreszenzmarkierten dNTPs wurde eine Gelfiltration mit Hilfe des *DYE EXTM 2.0 Spin Kits* (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach Denaturierung bei 95 °C für 2 min wurden die Proben im Kapillar-Sequenzierer *ABI PrismTM 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software *SeqScape[®] 2.6* (Applied Biosystems).

2.2.13 Präparation von RNA aus HEK 293-Zellen

Um die Genexpression in HEK 293-Zellen zu analysieren, wurde zunächst die RNA mit Hilfe des *RNeasy Mini Kits* von Qiagen nach Herstellerangaben isoliert. Zur Homogenisierung der lysierten Zellen wurden diese vor der RNA-Präparation in *QIAshredder Spin Columns* 2 min bei 18.000 × g zentrifugiert.

2.2.14 Reverse Transkription

Die Synthese komplementärer DNA (cDNA) aus RNA erfolgte mit der Reversen Transkriptase *SuperScript[®] II* (Invitrogen) nach Herstellerangaben. Dabei kamen hexamere Oligonukleotide mit statistischer Basenverteilung (*random primers*) zum Einsatz.

2.2.15 Quantitative Real-Time-PCR

Die Analyse der Genexpression wurde mit Hilfe der quantitativen *Real-Time-PCR* (qRT-PCR) im *StepOnePlus* System (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben unter Verwendung Sequenz-spezifischer TaqMan[®] Sonden durchgeführt. Das Pipettierschema für einen 20 µL Reaktionsansatz sowie das PCR-Programm ist in Tab. 2-10 aufgeführt. Als endogene Kontrolle wurde die Expression des ribosomalen Proteins L32 analysiert. Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode [238]. Die verwendeten Oligonukleotide und Sonden sind im Anhang aufgeführt.

Tab. 2-10. Quantitative *Real-Time-PCR*. A) Zusammensetzung des 20 μ L-Reaktionsansatzes
B) PCR-Programm.

A		B			
Menge	Substanz	Schritt	Temp ($^{\circ}$ C)	Zeit	Zyklenzahl
10 μ L	2 x Mastermix	UNG-Aktivierung	50	2 min	1
je 6 pmol	Oligonukleotide	init. Denaturierung	95	10 min	1
3 pmol	TaqMan [®] Sonde	Denaturierung	95	15 s	40
2 μ L	cDNA	Hybridisierung und	60	1 min	
ad 20 μ L	H ₂ O	Elongation			

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung und Lagerung von HEK 293-Zellen

HEK 293-Zellen wurden in DMEM-Wachstumsmedium im Wärmeschrank bei 37 $^{\circ}$ C und einem CO₂-Gehalt von 5 % kultiviert. Die in *Cellstar[®] Tissue Culture Treated T-75*-Flaschen (Greiner Bio-One) wachsenden Zellen wurden beim Erreichen der Konfluenz subkultiviert. Dafür wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen und mit 1 mL Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 % (w/v), Biochrom AG) für 5 min im Wärmeschrank von der Wachstumsfläche abgelöst. Nach der Inaktivierung des Trypsins durch Zugabe von 9 mL DMEM-Wachstumsmedium wurden die Zellen in sterile Kulturgefäße passagiert.

Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen 5 min bei 200 x g zentrifugiert und in DMEM-Wachstumsmedium, welches mit 5 % DMSO versetzt wurde, resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen unter Zuhilfenahme des *Mr. Frosty freezing containers* (Nalgene) langsam auf -80 $^{\circ}$ C abgekühlt und nach 24 h in flüssigen Stickstoff überführt.

2.3.2 Transfektion von HEK 293-Zellen

Die Liposomen-vermittelte Transfektion von HEK 293-Zellen mit Plasmid-DNA wurde mit dem Transfektionsreagenz *LipofectamineTM 2000* (Invitrogen) durchgeführt. Die Menge an Transfektionsreagenz pro μ g Plasmid-DNA wurde zunächst im *Western Blot* exemplarisch mit dem Konstrukt pLPCX-ETA-WT optimiert. Hierbei wurde die beste Transfektionseffizienz mit 3 μ L *LipofectamineTM 2000* pro μ g DNA erzielt (Abb. 2-1), sodass diese Menge in folgenden Experimenten zum Einsatz kam. HEK 293-Zellen, die in Ca²⁺-*Imaging*-Experimenten zum Einsatz kamen, wurden am Vortag ausgesät und nach 24 h mit 1 μ g DNA pro 35 mm Zellkulturschale transfiziert. Für alle anderen Transfektionen wurde die Zellsuspension nach der Trypsinbehandlung in DMEM-Wachstumsmedium verdünnt und die entsprechende Menge Zellen direkt zum DNA-Lipofektamin-Komplex gegeben, der nach Herstellerangaben angesetzt wurde. Hierbei wurden 200 ng (Fluoreszenzmikroskopie und *Knockdown*-Experimente) oder 400 ng (alle anderen Anwendungen) Rezeptor-kodierende

Plasmid-DNA und 50 ng β -Arrestin 2-YFP-kodierende Plasmid-DNA pro cm^2 Wachstumsoberfläche verwendet.

Für *Knockdown*-Experimente wurden die suspendierten HEK 293-Zellen 48 h vor Beginn der Experimente mit validierter *Silencer*[®] siRNA von Ambion transfiziert.

2.3.3 Herstellung von Zelllysat aus HEK 293-Zellen

24 h nach der Transfektion wurde das Medium über den HEK 293-Zellen abgesaugt und diese mit Lysepuffer für 30 min bei 4 °C geschüttelt. Nach Zentrifugation bei 21.000 x g und 4 °C wurde der Überstand bei -20 °C für maximal drei Tage gelagert.

2.3.4 Membranpräparation

In 6-Well-Platten wurden $2,85 \times 10^6$ HEK 293-Zellen transient mit Rezeptor-kodierender Plasmid-DNA transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen, welches eine Proteinase-Inhibitor-Mischung enthielt, und in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 800 x g wurde der Überstand entfernt und die Zellen durch Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen auf Eis lysiert. Nach Zugabe von 1 mL 20 mM Tris (pH 7,5) mit einer Proteinase-Inhibitor-Mischung wurde 30-mal mit einem Dounce-Homogenisator homogenisiert. Nach dem Entfernen der Zellkerne und nicht-lysierten Zellen durch eine zehnmütige Zentrifugation bei 800 x g wurde der Überstand 15 min bei 40.000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 150 μL

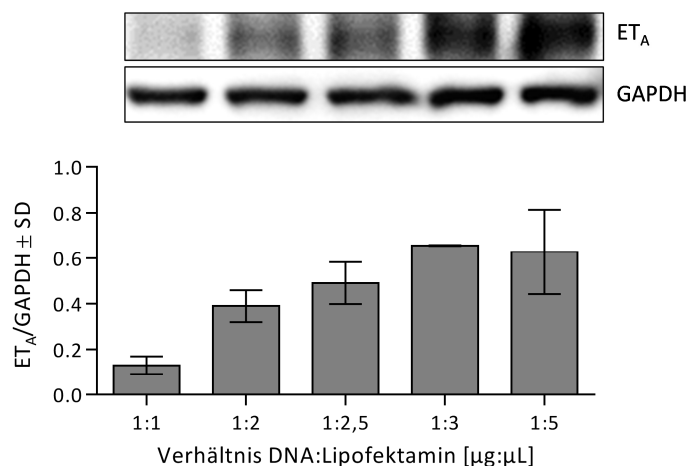


Abb. 2-1. Optimierung der Transfektion von HEK 293-Zellen. Die Zellen wurden transient mit 400 ng pLPCX-ET-WT-Plasmid-DNA pro cm^2 Wachstumsoberfläche transfiziert. Hierfür kamen verschiedene Mengen an *Lipofectamine*TM 2000 (Verhältnis 1:1 bis 1:5 (μg DNA: μL *Lipofectamine*TM 2000)) zum Einsatz. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und 7 μg Protein über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Im *Western Blot* wurde die Expression des ET_A -Rezeptors und zur Ladekontrolle die GAPDH-Expression in Doppelbestimmung analysiert (oben). Die Auswertung des Verhältnisses beider Proteine erfolgte densitometrisch (unten).

Bindepuffer A mit einer Proteinase-Inhibitor-Mischung resuspendiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Bicinchoninsäure (BCA)-Test.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Proteinbestimmung mit dem Bicinchoninsäure-Test

Die Proteinkonzentration in Zelllysaten wurde photometrisch mit dem BCA-Test gemessen. Zur Probe in einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurden 200 µL BCA-CuSO₄-Lösung pipettiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C erfolgte die Messung bei 550 nm im Mikrotiterplatten-Lesegerät *Infinite[®]M1000* (Tecan). Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde eine Kalibrierung aus verschiedenen konzentrierten BSA-Lösungen verwendet.

2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Vor der Auftrennung von Proteinproben wurden diese mit Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95 °C denaturiert. Die elektrophoretische Trennung nach dem Molekulargewicht erfolgte in einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel mit 5 %igem Sammelgel und 12 %igem Trenngel bei einer Spannung von 50 V für 30 min und anschließend 200 V für 1-2 h in SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)-Laufpuffer. Zur Größenabschätzung der Proteinbanden wurde der *Precision Plus Protein[™] All Blue*-Standard (Bio-Rad) verwendet.

2.4.3 Western Blot

Der Transfer der Proteinbanden aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulosemembran (0,45 µm, Bio-Rad) erfolgte im *Semi-Dry Blot*-Verfahren zwischen in Transferpuffer getränkten Filterpapieren bei 15 V für 1 h in der *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell*-Apparatur (Bio-Rad) und wurde im Anschluss mit Ponceau-S-Lösung überprüft. Nachdem die Membran zum Blockieren der freien Bindestellen für 60 min in Magermilchpulver-Lösung geschwenkt wurde, erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (1:1000 in Antikörperlösung) über Nacht bei 4 °C. Die Membran wurde dreimal für 10 min mit TBST gewaschen und für 1 h mit einem geeigneten HRP (*horseradish peroxidase*)-gekoppelten Sekundärantikörper (1:2.000 in Antikörperlösung) bei RT inkubiert. Nach 6-maligem Waschen für je 10 min wurde die Membran mit dem *ChemiGlow West*-Chemilumineszenz-Substrat (Biozym) inkubiert. Die Detektion der Lumineszenz-Signale erfolgte in der Dokumentationsanlage *Multimage[™] Light Cabinet* (Alpha Innotec Corporation).

2.5 Radiometrische Methoden

2.5.1 Quantitative Bindungsstudien

4 µg der Membranpräparation (Proteinmenge) wurde mit 10 – 1.000 pM ^{125}I -ET-1 in 120 µL Bindepuffer A für 4,5 h bei 37 °C inkubiert (totale Bindung). In Gegenwart von 100 nM ET-1 wurde zusätzlich die unspezifische Bindung bestimmt. Die Bindung wurde jeweils durch Verdünnung mit 10 mL Bindepuffer A beendet. Die Lösung wurde durch mit 0,1 % (v/w) BSA-getränkten 25 mm Glasfaser-Filter filtriert. Diese wurden anschließend dreimal mit 10 mL Bindepuffer A gewaschen. Die ^{125}I -Aktivität der Filter wurde mit einem Gamma-Zähler ermittelt. Die spezifische Bindung ergab sich aus der Differenz zwischen der totalen und der unspezifischen Bindung.

2.5.2 Ermittlung der Rezeptor-Zelloberflächenexpression

Zum Vergleich der Zelloberflächenexpression verschiedener Rezeptoren auf HEK 293-Zellen wurden diese mit dem Radioliganden ^{125}I -ET-1 markiert. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 3×10^5 Zellen pro cm^2 Wachstumsfläche in 12-Well-Mikrotiterplatten ($8,4 \times 10^5$ Zellen pro Näpfchen) ausgesät und transient mit der Rezeptor-Plasmid-DNA transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit eiskaltem Bindepuffer B gewaschen und mit 100 pM ^{125}I -ET-1 in Bindepuffer B bei 10 °C für 3 h inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in PBS resuspendiert, auf einen 25 mm Glasfaser-Filter (Millipore) überführt und dreimal mit PBS gewaschen. Die ^{125}I -Aktivität der Filter wurde mit einem Gamma-Zähler ermittelt.

2.6 Untersuchung der *Second Messenger*-Produktion

2.6.1 Nachweis von cAMP

Die Konzentration des *Second Messengers* cAMP wurde in HEK 293-Zellen mit dem *homogeneous time-resolved fluorescence* (HTRF)-basierten *cAMP HiRange Kit* von Cisbio Bioassays ermittelt. Beim HTRF, einem zeitlich aufgelösten Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET), kommt ein Akzeptor mit langlebiger Fluoreszenz (hier ein Eu^{3+} -Kryptat) zum Einsatz. Durch eine Verzögerung der Fluoreszenz-Messung nach Anregung des Donors (*lag time*), wird eine Elimination der kurzlebigen Hintergrund-Fluoreszenz erzielt. Bei dem Versuch handelt es sich um einen kompetitiven Immunoassay. Im *Kit* ist ein Eu^{3+} -Kryptat-gekoppelter anti-cAMP Antikörper und d2 (Donor-Farbstoff)-gekoppeltes cAMP enthalten, welches mit zellgeneriertem cAMP um die Antikörperbindung

konkurriert. Eine Abnahme des FRET-Signals entspricht also einer Zunahme der cAMP-Konzentration.

Die Zellen wurden 24 h vor dem Assay in *96-Well half area*-Mikrotiterplatten (Greiner Bio-One #675083) mit Rezeptor-DNA transfiziert. Zum Nachweis der $G\alpha_s$ -Aktivität wurde das Medium abgenommen und die Zellen für 30 min bei Raumtemperatur mit 25 μ L 100 nM ET-1 stimuliert. Zum Nachweis der $G\alpha_i$ -Aktivität wurde durch gleichzeitige Gabe von 500 nM Isoprenalin und 100 nM ET-1 stimuliert, sodass eine Abnahme des durch Isoprenalin induzierten cAMP-Anstiegs einer $G\alpha_i$ -Stimulation durch ET-1 entsprach. Die Stimulation erfolgte jeweils in PBS in Gegenwart des Phosphodiesterasehemmers IBMX (1 mM), um den cAMP-Abbau zu inhibieren und dessen Konzentration kumulativ bestimmen zu können. Nach der Stimulation wurden die Zellen durch Zugabe von je 12,5 μ L cAMP-d2 und anti-cAMP-Kryptat im Konjugat- und Lysepuffer lysiert. Nach einer 60-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Fluoreszenz im FRET-Kanal (Anregung 317 nm; Emission 665 nm) und im Donor-Kanal (Anregung 317 nm; Emission 620 nm) mit jeweils 60 μ s *lag time* im Mikrotiterplatten-Lesegerät *Infinite[®] M1000* (Tecan) gemessen. Es wurde das Verhältnis F_{665}/F_{620} beider Fluoreszenzintensitäten ermittelt. Die Auswertung erfolgte durch nichtlineare Regression der F_{665}/F_{620} -Ratio von cAMP-Verdünnungen.

2.6.2 Nachweis von Myoinositol-1-Phosphat (IP₁)

Die Bestimmung der Myoinositol-1-Phosphat (IP₁)-Konzentration erfolgte mit dem *IP-One Tb Kit* von Cisbio Bioassays. Es handelt sich hierbei - wie beim *cAMP HiRange Kit* - um einen HTRF basierten kompetitiven Immunoassay. d2-gekoppeltes IP₁ konkurriert mit zellgeneriertem IP₁ um die Bindung an einen Tb³⁺-Kryptat-gekoppelten anti-IP₁ Antikörper.

HEK 293-Zellen wurden in einer Dichte von 10.000 – 75.000 Zellen pro Nöpfchen in *384-Well*-Mikrotiterplatten (Greiner Bio-One #781080) ausgesät und mit Rezeptor-DNA transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde das Medium abgenommen und die Zellen für bis zu 2 h mit ET-1 stimuliert. Zum Stoppen der Reaktion wurden 4,5 μ L d2-gekoppeltes IP₁ und 4,5 μ L Terbium-Kryptat-markierter IP₁-Antikörper zugegeben. Nach einer 60-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Fluoreszenz im FRET-Kanal (Anregung 340 nm; Emission 665 nm) und im Donor-Kanal (Anregung 340 nm; Emission 620 nm) mit jeweils 60 μ s *lag time* im Mikrotiterplatten-Lesegerät *Infinite[®] M1000* (Tecan) gemessen. Es wurde das Verhältnis F_{665}/F_{620} beider Fluoreszenzintensitäten ermittelt. Die Auswertung erfolgte durch nichtlineare Regression der F_{665}/F_{620} -Ratio von IP₁-Verdünnungen.

2.7 Bildgebende Methoden

2.7.1 Ca^{2+} -Imaging

Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach einem Zellstimulus wurden mit dem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 gemessen. Liegt der Farbstoff als Acetoxymethyl (AM)-Ester vor, ist er zunächst unpolar und somit membranpermeabel. Intrazelluläre Esterasen hydrolysieren den Farbstoff zu dem polaren Fura-2, welches in der Zelle verbleibt. Das Fluorophor fungiert als Ca^{2+} -Chelator. Bei Bindung eines Ca^{2+} -Ions wird dessen Anregungswellenlänge verringert [239], sodass das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei einer alternierenden Anregung mit Licht der Wellenlängen von 340 und 380 nm Aufschluss über die relative Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle gibt.

Semikonfluente HEK 293-Zellen wurden in 35 mm-Glasboden-Schälchen transient mit Rezeptor-DNA transfiziert. Nach 24 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO_2 , 95 % Luftfeuchtigkeit) wurden die Zellen mit 3 μM Fura-2/AM (Invitrogen) beladen und für weitere 30 min im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit Ringer-Lösung gewaschen und überschichtet. Während der Messung strömte über die im Fokus befindlichen Zellen durch eine Kanüle permanent Ringer-Lösung mit oder ohne ET-1 bzw. ATP. Die Messung erfolgte an einem inversen Mikroskop (IX71, Olympus) mit einem 10× Objektiv (CPlanFL N, Olympus). Als Lichtquelle diente eine 150 Watt Xenon-Lampe (MT20, Olympus). Durch ein Filtersystem wurde eine alternierende Anregungswellenlänge von 340 nm und 380 nm gewährleistet. Das Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenzsignal wurde bei 510 nm mit Hilfe einer *charge-coupled device* (CCD)-Kamera (C9100, Hamamatsu) aufgenommen und die F_{340}/F_{380} -Ratio mit der *Imaging Software* cellR (Olympus) als Video-Datei (100 Bilder/min) mit Falschfarbendarstellung gespeichert und ausgewertet.

2.7.2 Weitfeld-Mikroskopie fluoreszenzmarkierter Rezeptoren

Für die Weitfeld-Mikroskopie fluoreszenzmarkierter Proteine wurden 80.000 HEK 293-Zellen in 8-Well *Lab-Tek*TM-Kammerdeckgläsern (Thermo Scientific) mit der entsprechenden DNA transfiziert. Nach 24-stündiger Inkubation in Phenolrot-freiem DMEM-Wachstumsmedium wurden die Zellen am *Eclipse TE 2000-U* (Nikon) unter Verwendung der in Tab. 2-11 aufgeführten Filtersets bei 37 °C mikroskopiert. Die Datenaufnahme erfolgte mit der CCD-Kamera 1300 B (Vosskühler).

Tab. 2-11. Kenndaten der zur Fluoreszenzmikroskopie eingesetzten Filtersets.

Filterset	verwendet für	Anregungsfilter	Strahlteiler	Emissionsfilter
F41-007 (AHF Analystechnik)	mRuby	HQ 545/30	Q 570 LP	HQ 610/75
B-2E/C (Nikon)	HiLyte Fluor 488	Ex 465-495	DM505	BA 515-555
F36-528 (AHF Analystechnik)	YFP	HC 500/24	HC BS 520	HC 542/27

2.7.3 Konfokale *Laser Scanning*-Mikroskopie

Zur Analyse der Rezeptor-Internalisierung wurde konfokale *Laser Scanning*-Mikroskopie an transient transfizierten HEK 293-Zellen in *Nunc Lab-Tek*TM-Kammerdeckgläsern mit einem Zeiss *LSM 780* und einem 63× Wasser-Immersionsobjektiv durchgeführt (*Pinhole*: 3,98 *Airy-Units*). Die Zellen wurden mit 100 nM HiLyte Fluor 488-markiertem ET-1 (ET-1-HiLyte) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Aufnahmen des HiLyte Fluor 488- und mRuby-Signals erfolgten direkt nach der Zugabe des Liganden sowie 15, 30, 45 und 60 min später bei einer Anregung mit der 488 nm-Linie eines Argon-Lasers bzw. mit einem DPSS-Laser (561 nm). Die Emission wurde im Bereich von 493-551 bzw. 569-652 nm aufgenommen. Es wurde ein 488/561 nm Strahlteiler verwendet. Die Signalverstärkung war bei allen Messungen konstant.

3 Ergebnisse

Um den Einfluss der Rezeptor-Phosphorylierung auf die Regulation des ET_A-Rezeptors zu untersuchen, wurden diverse phosphorylierungsdefiziente Rezeptor-Mutanten generiert. Anhand von *Second Messenger*-basierten Untersuchungsmethoden in HEK 293-Zellen konnten zum einen Ser/Thr-Cluster in der C-terminalen Domäne des ET_A-Rezeptors identifiziert werden, die in die Rezeptordesensibilisierung involviert sind und zum anderen die Funktion der Kinase GRK2 in diesem Prozess analysiert werden. Ferner wurde der Einfluss der Phosphorylierungsstellen auf die Rezeptor-Internalisierung anhand konfokaler Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht.

3.1 Klonierung der ET_A-Rezeptor-Mutanten

Der DNA-Abschnitt des kommerziell erhältlichen Plasmids pCMV-XL5-ETA (Origene), welcher den ET_A-Rezeptor kodiert, wurde mit den Oligonukleotiden XhoI_ETA_f und ETA_NotI_r in einer PCR amplifiziert. Dabei wurden die Restriktionsschnittstellen XhoI und NotI angefügt, über welche die Rezeptor-DNA in den pLPCX-Vektor (Clontech) eingefügt wurde. Das so erhaltene Konstrukt pLPCX-ETA-WT wurde als Ausgangsvektor für alle weiteren Klonierungen von Rezeptoren herangezogen. Durch den Nachweis des ET_A-Rezeptors im Zelllysate von mit pLPCX-ETA-WT transfizierten HEK 293-Zellen anhand eines *Western Blot*-Experimentes konnte die Identität des auf dem Vektor kodierten Proteins bestätigt werden (Abb. 3-1).

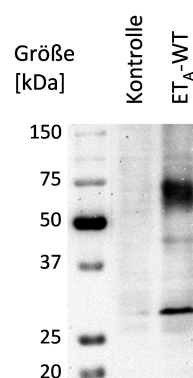


Abb. 3-1. Western-Blot-Analyse zur Kontrolle der ET_A-Rezeptor-Expression. HEK 293-Zellen wurden transient mit pLPCX-ETA-WT transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und 5 µg Protein über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Der *Western Blot* erfolgte mit einem ET_A-Rezeptor-spezifischen Antikörper. Als Kontrolle wurde der pLPCX-Leervektor transfiziert. Als Proteinstandard wurde *Precision Plus Protein All Blue* (Bio-Rad) verwendet.

Phosphorylierungsdefiziente Mutanten des ET_A-Rezeptors (Abb. 3-2) wurden durch Punktmutationen an Phosphorylierungsstellen hergestellt. Es wurde jeweils Tyr durch Phe und Ser oder Thr durch Ala ersetzt. Die Klonierung erfolgte nach dem in Abb. 3-3 gezeigten Schema durch das Einbringen synthetisch hergestellter DNA-Sequenzen mit den entsprechenden Mutationen, sowie durch zielgerichtete Mutagenese. Der Austausch gegen synthetische DNA-Abschnitte erfolgte über die Restriktionsschnittstellen BamHI bzw. EcoRI (beide innerhalb der wildtypischen Rezeptor-DNA) sowie über NotI in der *multiple cloning site* (MCS) des pLPCX-Vektors. Die phosphorylierungsdefizienten Mehrfachmutanten des ET_A-Rezeptors werden in dieser Arbeit mit ET_A-xPD bezeichnet, wobei x die Anzahl an Punktmutationen indiziert.

Zur Herstellung der mRuby-getaggen Rezeptor-Mutanten wurde die Rezeptor-DNA ohne Stopcodon aus den entsprechenden pLPCX-ETA-Plasmiden amplifiziert und mit den Restriktionsschnittstellen XhoI und AgeI versehen. Die für die PCR benutzten Oligonukleotide sind dem Anhang zu entnehmen. Über XhoI und AgeI wurde das Amplifikat in den Vektor pmRuby-N1 kloniert, welcher dem Vektor pECFP-N1 (Clontech) entspricht, aber den roten Fluoreszenzfarbstoff mRuby [240] statt eCFP kodiert. Zwischen Rezeptor und mRuby ergab sich die Linker-Sequenz Gly-Pro-Val-Ala-Thr.

3.2 Quantitative Bindungsstudien

Um einen eventuellen Einfluss der eingefügten Mutationen auf die Expression des Rezeptors in HEK 293-Zellen zu untersuchen, wurde die Bindung von ¹²⁵I-ET-1 an Membranpräparationen transient transfizierter Zellen analysiert. Wie Tab. 3-1 zu entnehmen ist, wurde in der Membran von ET_A-WT- und ET_A-14PD-exprimierenden Zellen kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der spezifischen Bindungsstellen (B_{max}) festgestellt. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Expressionsstärke der Rezeptor-Mutanten mit weniger als 14 Mutationen entsprechend unverändert war. Ebenso war kein signifikanter Einfluss der Mutationen auf die Dissoziationskonstante K_d nachweisbar.

Tab. 3-1. Charakterisierung der Bindung von ¹²⁵I-ET-1 an ET_A-WT und ET_A-14PD. HEK 293-Zellen wurden transient mit Rezeptor-DNA transfiziert. Die ¹²⁵I-ET-1-Bindung an die Membranpräparationen wurde analysiert, um die Anzahl der spezifischen Bindungsstellen B_{max} und die Dissoziationskonstante K_d zu bestimmen. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM aus sechs Experimenten. Für K_d und B_{max} ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Rezeptoren.

	K _d [nM]	B _{max} [pmol/mg protein]
ET _A -WT	0,28 ± 0,08	2,3 ± 1,1
ET _A -14PD	0,43 ± 0,11	2,0 ± 1,16

	184	289	295	382	389	391	393	396 397	403 404	417	420 421	425
ET _A -WT	<u>Y</u> ... <u>S</u> ... <u>S</u> ... <u>SCLCCCCYQSKSLMTSVPMNGT</u> S... <u>TDRSSHKDSMN</u>											
ET _A -Y184F	F ...S...S...SCLCCCCYQSKSLMTSVPMNGT...TDRSSHKDSMN											
ET _A -Y184D	D ...S...S...SCLCCCCYQSKSLMTSVPMNGT...TDRSSHKDSMN											
ET _A -Y184E	E ...S...S...SCLCCCCYQSKSLMTSVPMNGT...TDRSSHKDSMN											
ET _A -S289A	Y... A ...S...SCLCCCCYQSKSLMTSVPMNGT...TDRSSHKDSMN											
ET _A -S295A	Y...S... A ...SCLCCCCYQSKSLMTSVPMNGT...TDRSSHKDSMN											
ET _A -S289AS295A	Y... A ... A ...SCLCCCCYQSKSLMTSVPMNGT...TDRSSHKDSMN											
ET _A -S391A	Y...S...S...SCLCCCCYQ A KSLMTSVPMNGT...TDRSSHKDSMN											
ET _A -S393A	Y...S...S...SCLCCCCYQSK A LMTSVPMNGT...TDRSSHKDSMN											
ET _A -T396A	Y...S...S...SCLCCCCYQSKSL M ASVPMNGT...TDRSSHKDSMN											
ET _A -S397A	Y...S...S...SCLCCCCYQSKSLMT A VPMNGT...TDRSSHKDSMN											
ET _A -T403A	Y...S...S...SCLCCCCYQSKSLMTSVPMNG A S...TDRSSHKDSMN											
ET _A -S404A	Y...S...S...SCLCCCCYQSKSLMTSVPMNGT A ...TDRSSHKDSMN											
ET _A -T417A	Y...S...S...SCLCCCCYQSKSLMTSVPMNGT... A DRSSHKDSMN											
ET _A -S420A	Y...S...S...SCLCCCCYQSKSLMTSVPMNGT...TDR A SHKDSMN											
ET _A -S421A	Y...S...S...SCLCCCCYQSKSLMTSVPMNGT...TDRS A HKDSMN											
ET _A -S425A	Y...S...S...SCLCCCCYQSKSLMTSVPMNGT...TDRSSHK D AMN											
ET _A -15PD	F ... A ... A ... A CLCCCC FQAKALMAAVPMNGAA ... ADRAAHKDAMN											
ET _A -14PD	Y... A ... A ... A CLCCCC FQAKALMAAVPMNGAA ... ADRAAHKDAMN											
ET _A -12PD	Y...S...S... A CLCCCC FQAKALMAAVPMNGAA ... ADRAAHKDAMN											
ET _A -11PD	Y...S...S... A CLCCCCY QAKALMAAVPMNGAA ... ADRAAHKDAMN											
ET _A -10PD	Y...S...S...SCLCCCCY QAKALMAAVPMNGAA ... ADRAAHKDAMN											
ET _A -9PD	Y...S...S...SCLCCCCYQSK ALMAAVPMNGAA ... ADRAAHKDAMN											
ET _A -8PD	Y...S...S...SCLCCCCYQSKSL MAAVPMNGAA ... ADRAAHKDAMN											
ET _A -7PD	Y...S...S...SCLCCCCYQSKSLMT AVPMNGAA ... ADRAAHKDAMN											
ET _A -6PD	Y...S...S...SCLCCCCYQSKSLMTSVPMNG AA ... ADRAAHKDAMN											
ET _A -5PD	Y...S...S...SCLCCCCYQSKSLMTSVPMNGT A ... ADRAAHKDAMN											
ET _A -4PD	Y...S...S...SCLCCCCYQSKSLMTSVPMNGT... ADRAAHKDAMN											
ET _A -3PD	Y...S...S...SCLCCCCYQSKSLMTSVPMNGT...TDR A AHKDAMN											
ET _A -2PD	Y...S...S...SCLCCCCYQSKSLMTSVPMNGT...TDRS A HKDAMN											
ET _A -PDZPD	Y...S...S...SCLCCCCY QAKALMAAVPMNGAA ...TDRSSHKDSMN											
ET _A -11PD-A404S	Y...S...S... A CLCCCCY QAKALMAAVPMNGAS ... ADRAAHKDAMN											
ET _A -11PD-A403T/A404S	Y...S...S... A CLCCCCY QAKALMAAVPMNGT S... ADRAAHKDAMN											
ET _A -4PD-S391A	Y...S...S...SCLCCCCY QAK SLMTSVPMNGT... ADRAAHKDAMN											
ET _A -4PD-S393A	Y...S...S...SCLCCCCYQSK AL MTSVPMNGT... ADRAAHKDAMN											
ET _A -4PD-T396A	Y...S...S...SCLCCCCYQSKSL M ASVPMNGT... ADRAAHKDAMN											
ET _A -4PD-S397A	Y...S...S...SCLCCCCYQSKSLMT A VPMNGT... ADRAAHKDAMN											
ET _A -4PD-T403A	Y...S...S...SCLCCCCYQSKSLMTSVPMNG A S... ADRAAHKDAMN											
ET _A -S404A/T417A	Y...S...S...SCLCCCCYQSKSLMTSVPMNGT A ... ADRSSHKDSMN											
ET _A -S404A/S420A	Y...S...S...SCLCCCCYQSKSLMTSVPMNGT A ...TDR A SHKDSMN											
ET _A -S404A/S421A	Y...S...S...SCLCCCCYQSKSLMTSVPMNGT A ...TDRS A HKDSMN											
ET _A -S404A/S425A	Y...S...S...SCLCCCCYQSKSLMTSVPMNGT A ...TDRSSHK D AMN											
ET _A -5PD -A421S	Y...S...S...SCLCCCCYQSKSLMTSVPMNGT A ... ADRASHKDAMN											
ET _A -6E	Y...S...S...SCLCCCCYQSKSLMTSVPMNG EE ... EDREEHKDEMN											

Abb. 3-2. In dieser Arbeit verwendete Mutanten des ET_A-Rezeptors. Dargestellt sind die Positionen 184, 289 und 295 sowie Teile der Aminosäuresequenz der C-terminalen Domäne des wildtypischen ET_A-Rezeptors (ET_A-WT) und aller in dieser Arbeit verwendeten Einzel- und Mehrfachmutanten dieses Rezeptors. Bekannte Phosphorylierungsstellen und Palmitoylierungsstellen im ET_A-WT sind unterstrichen. Punktmutationen sind fett dargestellt.

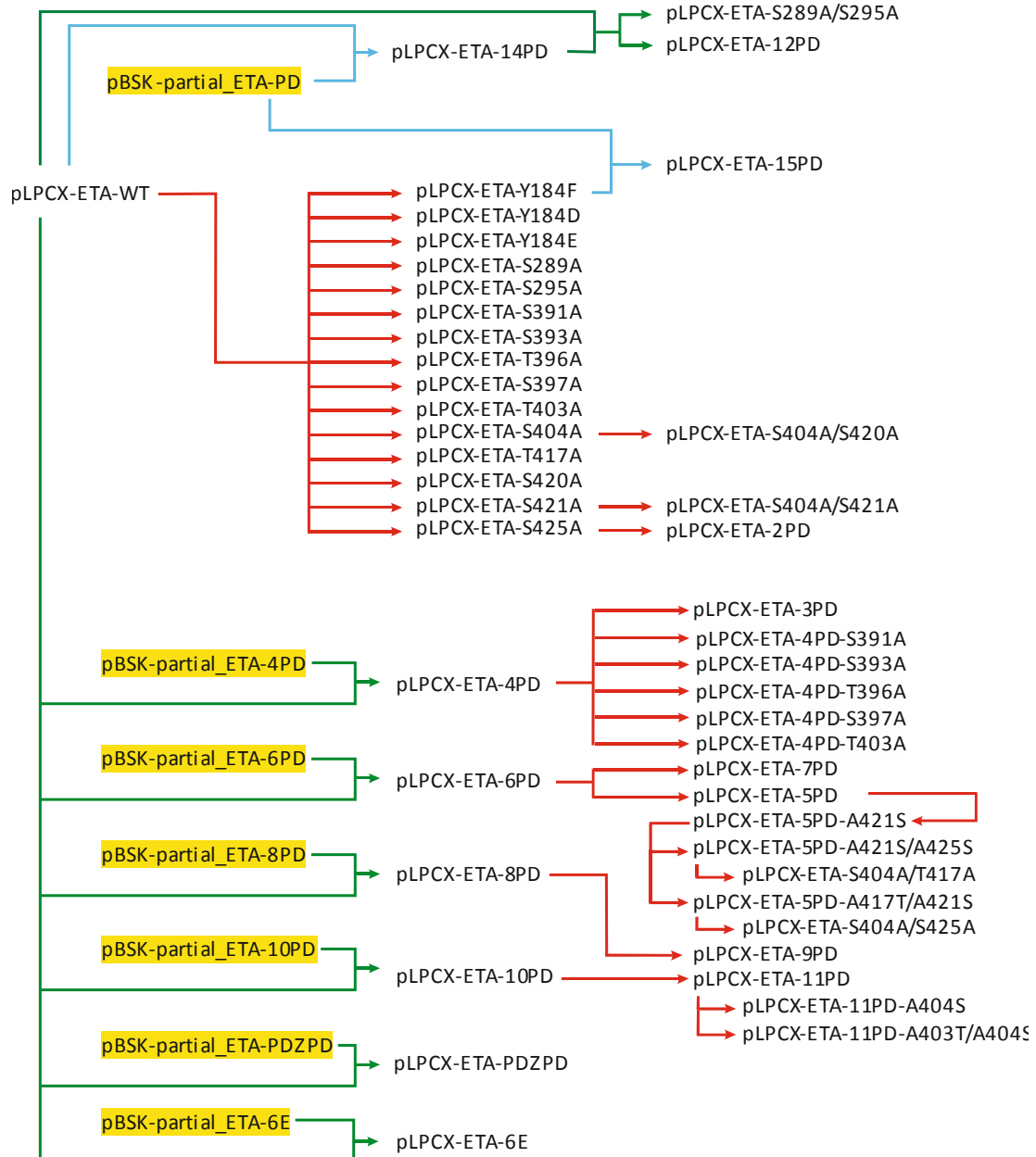


Abb. 3-3. Klonierungs-Strategie für die Gewinnung von ET_A-Rezeptor-Mutanten. Ausgehend von pLPCX-ETA-WT wurden Mutanten erzeugt, indem Abschnitte der Rezeptor-DNA durch im pBSK-Vektor befindliche, synthetische DNA mit diversen Mutationen (gelb hinterlegt) ersetzt wurden. Die Umklonierung erfolgte über EcoRI und NotI (grüne Pfeile) bzw. über BamHI und NotI (blaue Pfeile). Weitere Mutanten des ET_A-Rezeptors wurden durch zielgerichtete Mutagenese generiert (rote Pfeile). Die hierfür verwendeten Oligonukleotide sind dem Anhang zu entnehmen.

3.3 Oberflächenexpression der ET_A-Rezeptor-Mutanten

Zusätzlich zu den quantitativen Bindungsstudien an ausgewählten Rezeptoren wurde die Oberflächenexpression aller in dieser Arbeit verwendeten Rezeptoren miteinander verglichen. Hierfür wurde die totale Bindung von 100 pM ¹²⁵I-ET-1 an intakte Zellen gemessen. Wie in Abb. 3-4 dargestellt ist, war diese für alle Ansätze vergleichbar. Die totale Bindung des Radioliganden an Kontrollzellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden, war hingegen deutlich reduziert.

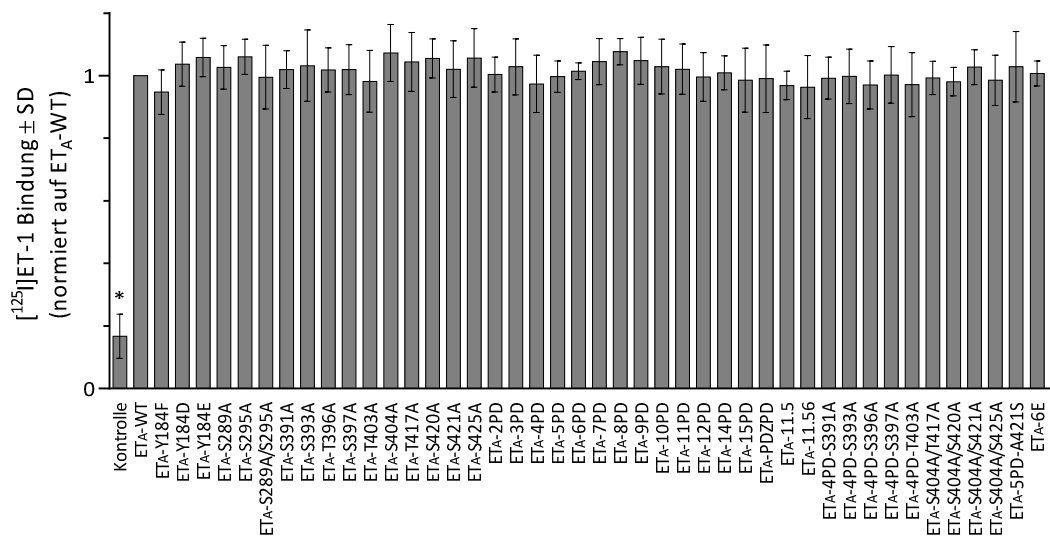


Abb. 3-4. Oberflächenexpression der verwendeten ET_A-Rezeptor-Mutanten. HEK 293-Zellen wurden transient mit Rezeptor-DNA transfiziert und nach 24 h mit 100 pM ¹²⁵I-ET-1 für 3 h bei 10°C inkubiert. Die totale Bindung des Radioliganden wurde im Gamma-Zähler gemessen und auf die totale Bindung an ET_A-WT normiert. Zur Kontrolle wurden HEK 293-Zellen mit dem pLPCX-Leervektor transfiziert. Gezeigt ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Experimenten ± SD. *, p < 0,1, *One Way Anova* mit *Benferroni's Post Test* gegenüber ET_A-WT.

3.4 Ca²⁺-Imaging

Durch die Aktivierung von IP₃-Rezeptoren kommt es bei der Stimulation des Gα_q-PLC-Signalwegs zu einem transienten Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration (Abb. 1-2). Das Ca²⁺-Signal in HEK 293-Zellen wurde nach einem ET-1-Stimulus mit dem Farbstoff Fura-2 nachgewiesen, um die Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors zu analysieren. Es kamen ET_A-WT- und ET_A-14PD-exprimierende Zellen zum Einsatz. Als Kontrolle wurden mit dem Leervektor transfizierte HEK 293-Zellen stimuliert. Hier wiesen lediglich vereinzelte Zellen während der Messung spontane bzw. mechanisch induzierte Ca²⁺-Antworten auf.

Eine ET-1-Applikation von 30 s führte bei beiden Ansätzen zu einem transienten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, welche nach etwa 1 min wieder auf den Basalwert zurückging (Abb. 3-5 A). Nach einer 2,5-minütigen Waschzeit führte eine erneute ET-1-Stimulation bei den meisten Zellen zu einer weniger starken Ca^{2+} -Antwort. Die *Baseline*-korrigierte Amplitude des ET_A -WT- und ET_A -14PD-vermittelten Fluoreszenzsignals betrug jetzt noch 46 ± 57 und 45 ± 89 % der ersten Ca^{2+} -Antwort (Abb. 3-5 B). Nach erneuter Waschzeit und einem dritten ET-1-Stimulus betrug der Anstieg des Fluoreszenzsignals für beide Ansätze noch 29 ± 45 und 16 ± 70 % des ersten *Peaks*. Ein ATP-induziertes Ca^{2+} -Signal am Ende des Versuchs zeigte, dass die Zellen noch intakt waren und die Fähigkeit zur Signaltransduktion nicht verloren hatten (Abb. 3-5 A). Die Amplituden der Fluoreszenzsignale beider Ansätze unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

Es wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, um die Desensibilisierung während kontinuierlicher Stimulation zu untersuchen. Während einer fünfminütigen ET-1-Stimulation wurde ein Ca^{2+} -Signal beobachtet, das nach etwa 1 min wieder auf den Basalwert zurückging. Nach diesem lang anhaltenden Stimulus konnte für beide Rezeptoren in den darauffolgenden 10 min bei erneuter ET-1-Applikation kein weiteres Ca^{2+} -Signal beobachtet werden (Abb. 3-5 C). Die Zellen reagierten jedoch noch auf eine Stimulation mit ATP.

3.5 cAMP-Freisetzung

Über die Freisetzung des *Second Messengers* cAMP wurde die Kopplung des ET_A -Rezeptors an $\text{G}\alpha_s$ und $\text{G}\alpha_i$ in HEK 293-Zellen untersucht. Die Stimulation $\text{G}\alpha_s$ -gekoppelter Rezeptoren führt über die Aktivierung der AC zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration, während $\text{G}\alpha_i$ -gekoppelte Rezeptoren die AC hemmen. Die cAMP-Freisetzung wurde mit Hilfe des *cAMP HiRange Kits* (Cisbio Bioassays) untersucht. Da in HEK 293-Zellen β -adrenerge Rezeptoren endogen exprimiert werden [241,242], konnte für die Untersuchung der $\text{G}\alpha_i$ -Kopplung die cAMP-Produktion durch den β -adrenergen Agonisten Isoprenalin stimuliert werden.

Zur Ermittlung der optimalen Zelldichte in *96-Well half area*-Mikrotiterplatten wurden zunächst 4.000 bis 250.000 HEK 293-Zellen ausgesät und nach 24 h mit 100 μM Isoprenalin stimuliert (Abb. 3-6 A bis C). Bei 50.000 Zellen war die Differenz der F_{665}/F_{620} -Ratio zum Basalwert am größten. Anhand einer Isoprenalin-Konzentrations-Wirkungskurve konnte gezeigt werden, dass mit 100 μM Isoprenalin die maximale Stimulation erreicht wurde (Abb. 3-6 D).

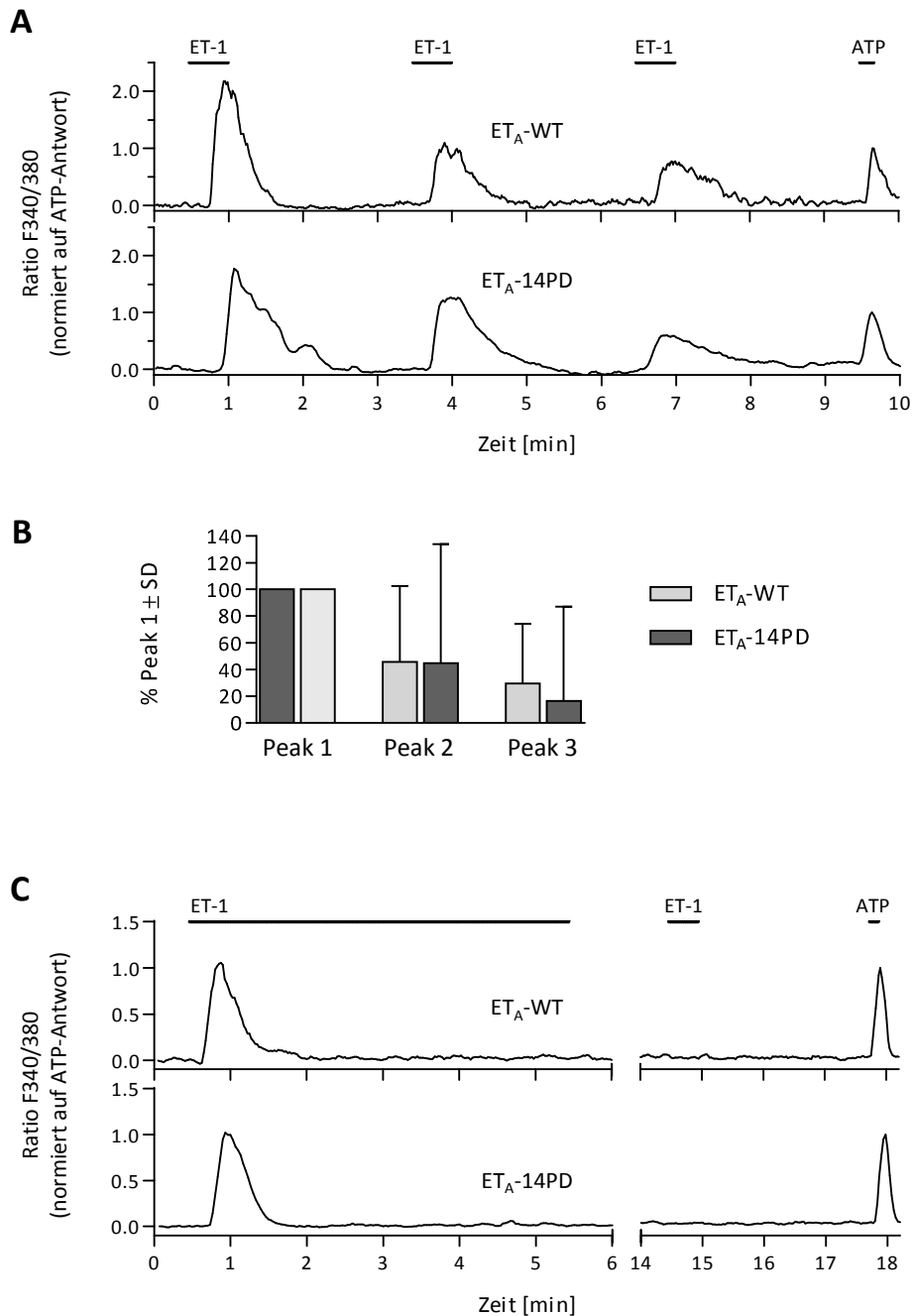


Abb. 3-5. Ca²⁺-Imaging-Experimente. Die Messung der ET_A-WT- und der ET_A-14PD-vermittelten zytosolischen Ca²⁺-Konzentration erfolgte in transient transfizierten HEK 293-Zellen mit dem Ca²⁺-sensitiven Farbstoff Fura-2. A) - B) Es wurde dreimal für 30 s mit 50 nM ET-1 und zur Kontrolle einmal für 10 s mit 100 μM ATP stimuliert. Gezeigt ist die F₃₄₀/F₃₈₀-Ratio von je einer Zelle pro Konstrukt über 10 min (A) sowie der Mittelwert ± SD der Netto-Amplitude (*Baseline*-korrigierter Wert) der einzelnen Ca²⁺-*Peaks* (B). Alle Netto-Amplituden wurden auf den ersten *Peak* bezogen und sind in Prozent angegeben. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen mindestens 170 Zellen pro Konstrukt aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten festgestellt. C) Es wurde einmal für 5 min mit 100 nM ET-1 und nach einer neunminütigen Pause einmal für 30 s mit 50 nM ET-1 stimuliert. Zur Kontrolle wurde für 10 s mit 100 μM ATP stimuliert. Gezeigt ist die F₃₄₀/F₃₈₀-Ratio von je einer repräsentativen Zelle aus 128 Zellen pro Konstrukt über 18 min.

Die G_s - und G_i -Kopplung einiger Rezeptoren wurde mit 50.000 transient transfizierten HEK 293-Zellen durchgeführt. In ET_A -WT-exprimierenden HEK 293-Zellen konnte nach ET-1-Stimulation keine cAMP-Produktion über dem Basalwert festgestellt werden (Abb. 3-7 A). Ebenso wurden 15 verschiedene Rezeptor-Mutanten mit je einer Einzelmutation an den Phosphorylierungsstellen sowie die Mutanten ET_A -14PD und ET_A -15PD untersucht. Bei keinem Ansatz ergab sich ein ET-1-vermittelter Anstieg der cAMP-Konzentration. Zur Analyse einer potentiellen G_i -Kopplung wurde mit 500 nM Isoprenalin stimuliert (Abb. 3-7 B). Es wurde keine Inhibition der cAMP-Antwort durch die ET_A -Konstrukte beobachtet.

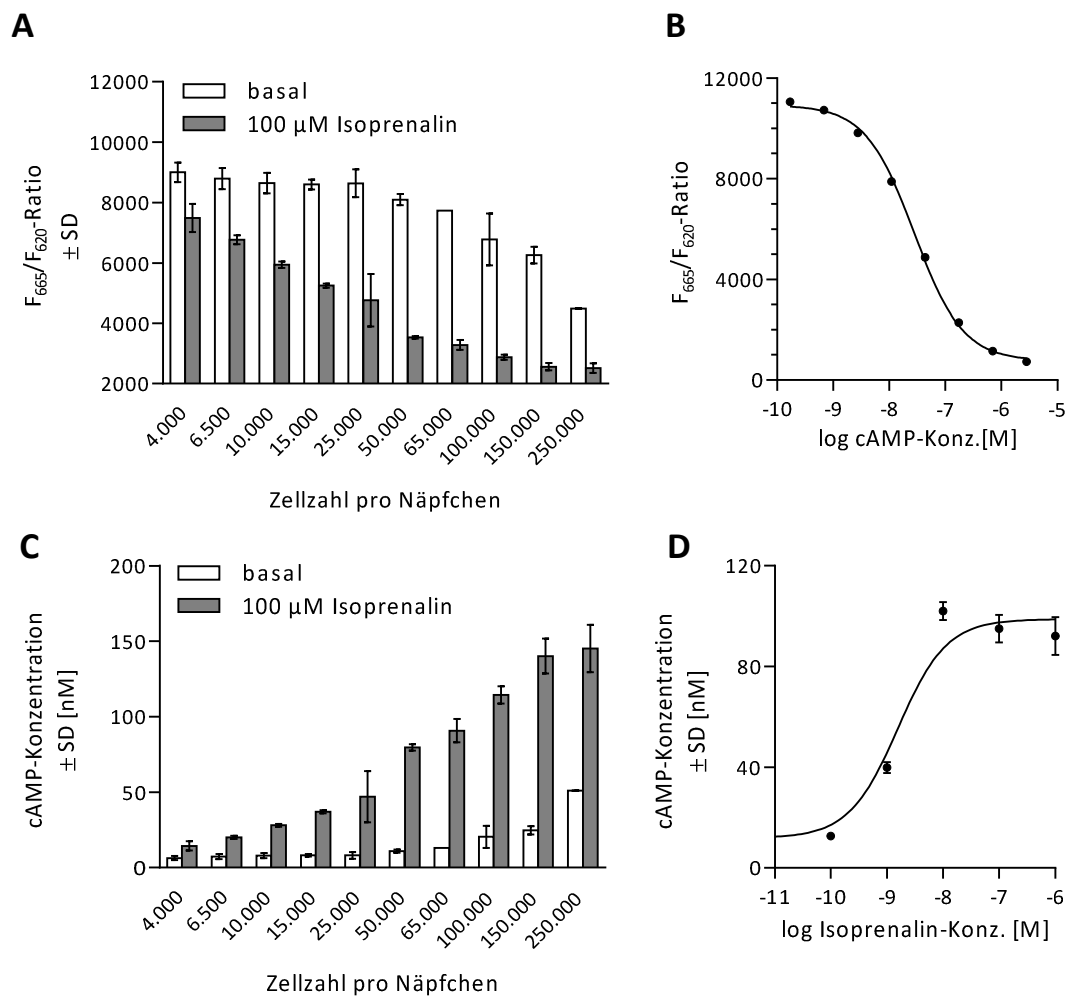


Abb. 3-6. Optimierung der cAMP-Bestimmung. A-C) Zur Optimierung der Zellzahl in 96-Well half area-Mikrotiterplatten wurden 4.000 bis 250.000 nicht transfizierte HEK 293-Zellen pro Nöpfchen ausgesät und nach 24 h für 30 min mit 100 μM Isoprenalin stimuliert bzw. ohne Stimulation inkubiert (basal). Die cAMP-Messung erfolgte mit dem *cAMP HiRange Kit* in Dreifachbestimmung nach Herstellerangaben. A) Die FRET-Effizienz wurde als F_{665}/F_{620} -Ratio im Mikrotiterplatten-Lesegerät bestimmt. B) Zur Ermittlung der cAMP-Konzentration aus der F_{665}/F_{620} -Ratio wurde eine Standardkurve mit cAMP Verdünnungen erstellt. C) Gezeigt ist die cAMP-Konzentration in Abhängigkeit der Zelldichte. Diese ließ sich mit Hilfe der Standardkurve aus der FRET-Effizienz ermitteln D) Durch Stimulation mit Isoprenalin wurde eine Konzentrations-Wirkungskurve aufgenommen.

Es ist daher auszuschließen, dass der ET_A -Rezeptor im untersuchten System an $G\alpha_s$ oder $G\alpha_i$ gekoppelt war und dass die Eliminierung einer oder mehrerer Phosphorylierungsstellen eine solche Kopplung induzierte.

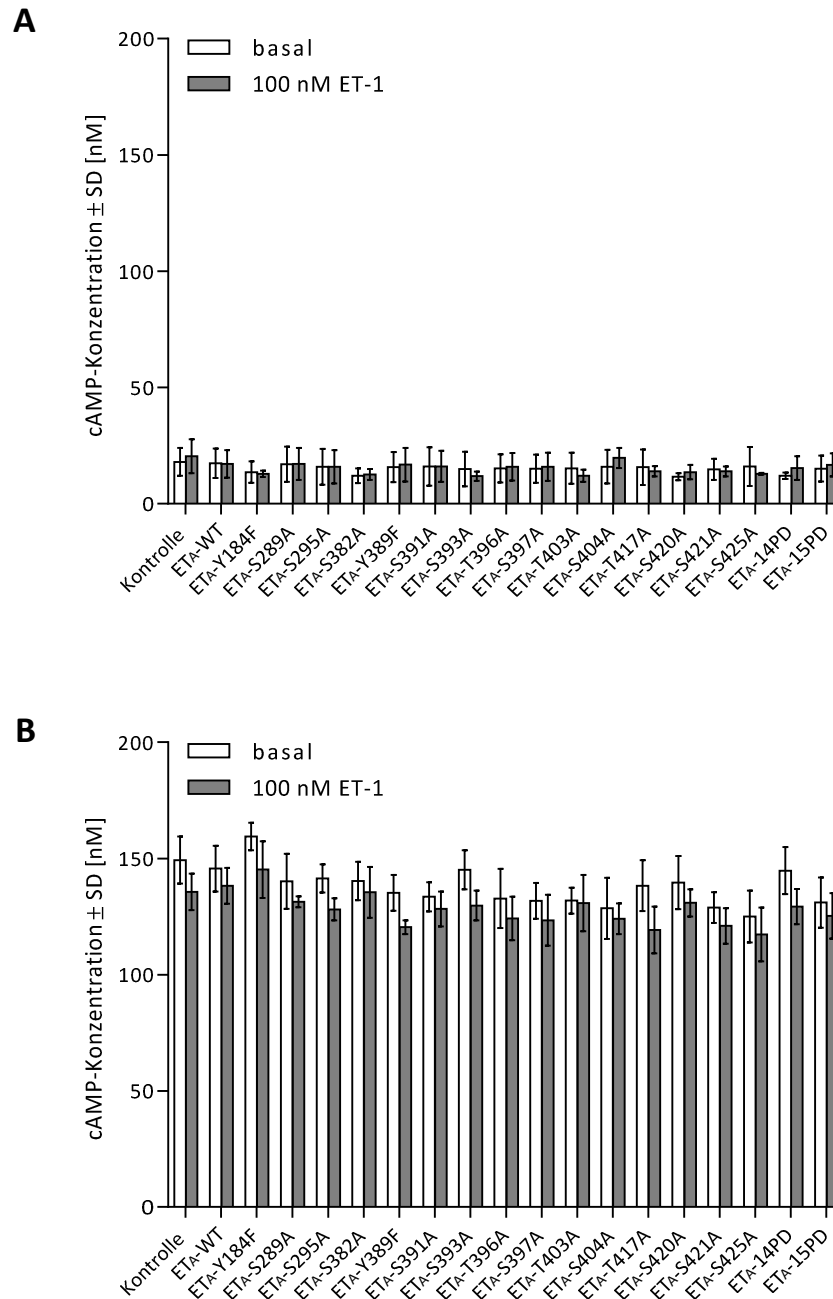


Abb. 3-7. Kopplung des ET_A -Rezeptors an $G\alpha_s$ und $G\alpha_i$. A) Zur Untersuchung der $G\alpha_s$ -Kopplung wurden 50.000 HEK 293-Zellen mit ET_A -Rezeptor-DNA transfiziert und nach 24 h für 30 min mit 100 nM ET-1 stimuliert oder im Stimulations-Puffer inkubiert (basal). Anschließend wurde die cAMP-Konzentration mit dem *cAMP HiRange Kit* bestimmt. Zur Kontrolle wurde der Leervektor transfiziert. Die Messung wurde dreimal in unabhängigen Experimenten durchgeführt. B) Die Analyse der $G\alpha_i$ -Kopplung erfolgte analog. Zur Aktivierung der Adenylylzyklase wurde parallel mit 500 nM Isoprenalin stimuliert.

3.6 Analyse der PLC-Aktivität

Die Kopplung des ET_A-Rezeptors an G_q wurde untersucht, indem die ET-1-induzierte Akkumulation von IP₁ mit dem *IP-One Tb Kit* (Cisbio Bioassays) bestimmt wurde. Dieses Molekül ist in Gegenwart von Li⁺-Ionen stabil und spiegelt daher die PLC-Aktivität wider. Bevor die im Rahmen dieser Arbeit klonierten Rezeptoren in transient transfizierten HEK 293-Zellen analysiert wurden, mussten einige Parameter optimiert werden. Hierfür wurde der wildtypische ET_A-Rezeptor verwendet.

Zur Ermittlung der optimalen Zelldichte wurde die ET-1-stimulierte IP₁-Akkumulation von 10.000 bis 75.000 Zellen in 384-Well-Mikrotiterplatten 24 h nach der Transfektion gemessen und mit dem Basalwert verglichen (Abb. 3-8 A bis C). Das Verhältnis der IP₁-Konzentrationen beider Ansätze war bei 30.000 Zellen pro Näpfchen mit 2,4 am größten. Diese Zelldichte wurde bei allen folgenden Versuchen verwendet, die 24 h nach der Transfektion durchgeführt wurden. In einem weiteren Versuch wurde die ET-1-Konzentration ermittelt, die nötig war, um die maximale IP₁-Antwort (E_{max}) zu erreichen. Hierfür wurde eine Konzentrations-Wirkungskurve mit steigender ET-1-Konzentration aufgenommen (Abb. 3-8 D). Eine Konzentration von 100 nM ET-1 wurde für alle weiteren IP₁-Messungen ausgewählt, da hiermit die maximale IP₁-Antwort erzielt wurde. Schließlich wurde geprüft, ob die Zellen über einen Zeitraum von 2 h stimulierbar waren (Abb. 3-8 D). Da die IP₁-Konzentration während der Stimulation in diesem Zeitrahmen linear anstieg, wurden die Experimente mit einer Stimulationsdauer von bis zu 2 h durchgeführt.

3.6.1 Einfluss der Rezeptor-Phosphorylierung auf die Desensibilisierung

Anhand der PLC-Aktivität sollte die Desensibilisierung verschiedener Rezeptor-Mutanten untersucht werden. Ist der Desensibilisierungsmechanismus beeinträchtigt, resultiert hieraus eine erhöhte IP₁-Akkumulation. Um den Einfluss der Rezeptor-Phosphorylierung auf die Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors zu untersuchen, wurde zunächst die ET-1-induzierte IP₁-Akkumulation der Mutante ET_A-15PD untersucht (Abb. 3-9 A). Bei diesem Rezeptor wurden alle 15 bisher bekannten Phosphorylierungsstellen des ET_A-Rezeptors [218] gegen Phe bzw. Ala ausgetauscht. Unter kontinuierlicher ET-1-Stimulation ergab sich nach Abzug der Basalaktivität eine dem Wildtyp-Rezeptor gegenüber um rund 70 % erhöhte *Second Messenger*-Produktion. Die Fähigkeit zur Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors korrelierte also mit dem Vorhandensein von Phosphorylierungsstellen. Um diese ausfindig zu machen, wurden Versuche mit weiteren Mutanten durchgeführt, bei denen weniger Phosphorylierungsstellen gleichzeitig ausgetauscht waren.

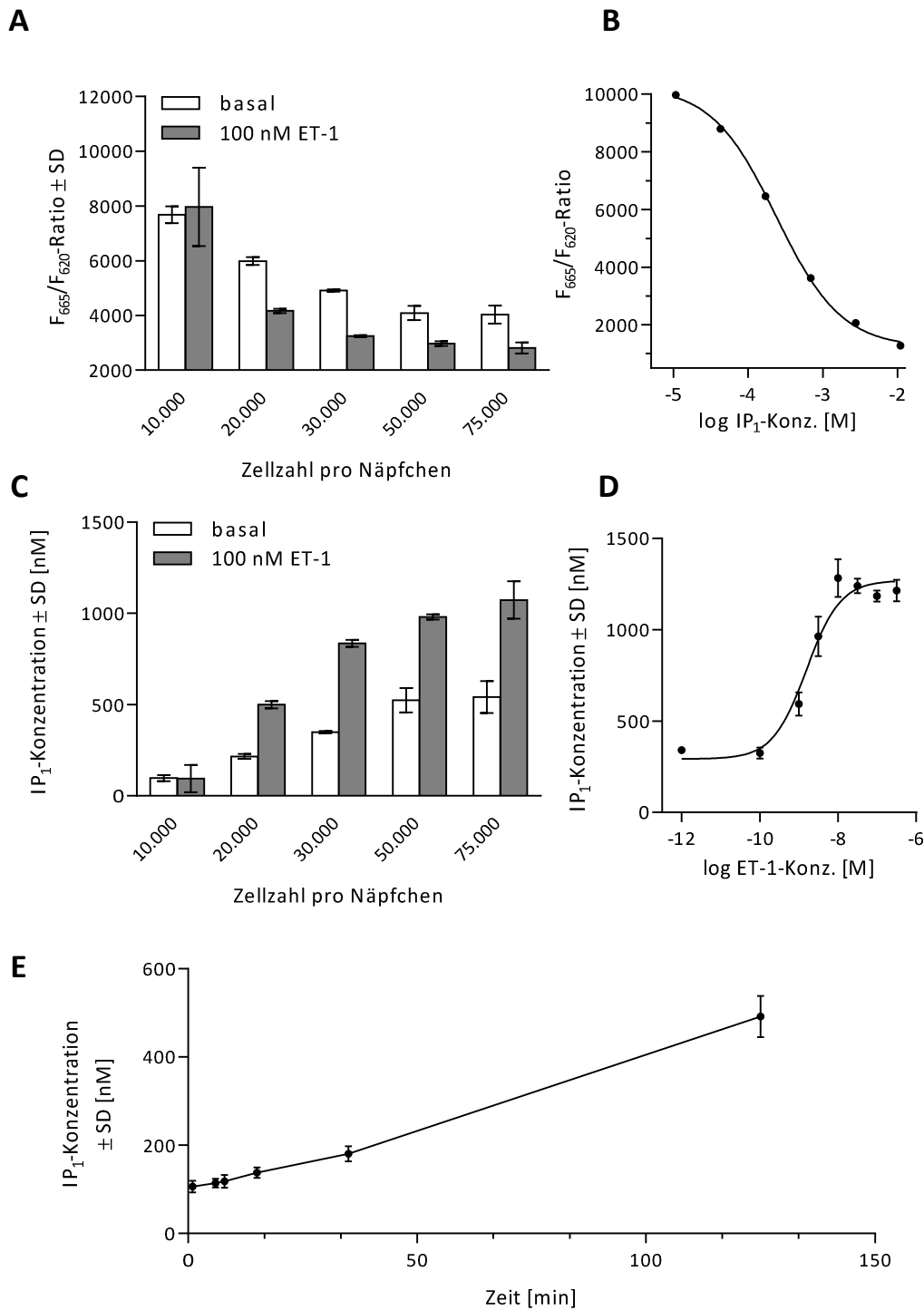


Abb. 3-8. Optimierung der IP₁-Bestimmung. A-C) Zur Optimierung der Zelldichte wurden 10.000 bis 75.000 HEK 293-Zellen mit ET_A-WT-Rezeptor-DNA in 384-Well-Mikrotiterplatten transfiziert und nach 24 h fur 2 h mit 100 nM ET-1 stimuliert bzw. mit Stimulationspuffer inkubiert (basal). Die IP₁-Messung erfolgte mit dem *IP-One Tb Kit* in Funffachbestimmung nach Herstellerangaben. A) Die FRET-Effizienz wurde als F₆₆₅/F₆₂₀-Ratio im Mikrotiterplattenlesegerat bestimmt. B) Zur Ermittlung der IP₁-Konzentration aus der F₆₆₅/F₆₂₀-Ratio wurde eine Standardkurve mit IP₁-Verdunungen erstellt. C) Gezeigt ist die IP₁-Konzentration in Abhangigkeit von der Zellzahl. Diese ließ sich mit Hilfe der Standardkurve aus der der F₆₆₅/F₆₂₀-Ratio ermitteln D) Durch Stimulation von ET_A-WT-exprimierenden Zellen mit ET-1 wurde eine Konzentrations-Wirkungskurve aufgenommen. E) Gezeigt ist die IP₁-Akkumulation von ET_A-WT-exprimierenden Zellen in Abhangigkeit der Stimulationszeit mit 100 nM ET-1.

3.6.2 Identifizierung der in die Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors involvierten Phosphorylierungsstellen

Am zytosolischen Ende der dritten Transmembranhelix befindet sich in allen GPCRs der Rhodopsinfamilie das E/DRY-Motiv, welches an der Regulation der strukturellen Dynamik des Rezeptors beteiligt ist. Bei der Mutante ET_A-15PD wurde unter anderem Y184 im ET_A-Rezeptor, welches Teil dieses hochkonservierten Motivs ist, durch Phe ersetzt. Diese Substitution könnte einen massiven Eingriff in die Funktionalität des Rezeptors darstellen. Daher sollte zunächst überprüft werden, ob auf die Mutation an Position 184 verzichtet werden kann ohne den Phänotyp der Mutante ET_A-15PD zu verlieren, und welche Folgen eine isolierte Substitution von Y184 auf die Signaltransduktion hat. Hierfür wurde die ET-1-induzierte PLC-Aktivität der Mutante ET_A-14PD mit intaktem E/DRY-Motiv (Abb. 3-9 A) sowie die Mutante ET_A-Y184F (Abb. 3-9 B) analysiert. ET_A-14PD zeigte, wie die Mutante ET_A-15PD, eine gegenüber dem Wildtyp verringerte Fähigkeit zur Desensibilisierung. Es wurde die gleiche, erhöhte IP₁-Akkumulation gemessen. Bei der Mutante ET_A-Y184F hingegen ergab sich ein signifikanter Einbruch der IP₁-Akkumulation. Zur Untersuchung, ob dieser Effekt durch eine fehlende Phosphorylierung an Position 184 zustande kam, wurde eine Substitution durch Asp (ET_A-Y184D) und Glu (ET_A-Y184E) durchgeführt. Hierdurch kam es zu einer noch wirksameren Signalreduktion (Abb. 3-9 B).

Um die in die Desensibilisierung involvierten Phosphorylierungsstellen ausfindig zu machen, wurde die PLC-Aktivität weiterer ET_A-Rezeptor-Mutanten mit schrittweise reduzierter Anzahl an Punktmutationen analysiert. Bei der Mutante ET_A-12PD sind, im Gegensatz zur Mutante ET_A-14PD, die beiden in der ICL3 befindlichen Serinreste S289 und S295 erhalten. ET_A-12PD mit lediglich noch C-terminalen Substitutionen von Tyr-, Ser- und Thr-Resten verhielt sich nach ET-1-Stimulation wie die bisher untersuchten phosphorylierungsdefizienten Mehrfachmutanten mit einer reduzierten Fähigkeit zur Desensibilisierung (Abb. 3-9 A). Auch konnten für die beiden Einzelmutanten ET_A-S289A und ET_A-S295A sowie für die Doppelmutante ET_A-S289A/S295A mit Mutationen in der ICL3 keine dem Wildtyp-Rezeptor gegenüber veränderten Signale gemessen werden (Abb. 3-9 C).

Bei der Mutante ET_A-11PD sind alle elf bekannten C-terminalen Ser/Thr-Phosphorylierungsstellen gegen Ala ausgetauscht. Dieser Rezeptor zeigte ebenfalls eine erhöhte IP₁-Akkumulation (Abb. 3-9 A).

Die CTE des wildtypischen ET_A-Rezeptors weist eine hohe Dichte an Phosphorylierungsstellen auf. Man kann hier zwei phosphorylierbare Ser/Thr-Cluster unterscheiden: in der distalen Region 391 bis 404 wurden sechs Phospho-Ser/Thr identifiziert, während in der proximalen Region 417 bis 425 die Phosphorylierung von vier Ser/Thr nachgewiesen wurde [218]. In der Mutante ET_A-10PD wurden die zehn Phosphorylierungsstellen der CTE

durch Alaninreste ersetzt. Diese Mutante des ET_A-Rezeptors zeigte die bereits bei ET_A-15PD, ET_A-14PD, ET_A-12PD und ET_A-11PD beobachtete, gestörte Regulation (Abb. 3-9 A). Es kann also gefolgert werden, dass die in der CTE des ET_A-Rezeptors lokalisierten Ser/Thr-Phosphorylierungsstellen (CTE-Phosphorylierungsstellen) eine wichtige Rolle in der Rezeptor-Desensibilisierung spielen.

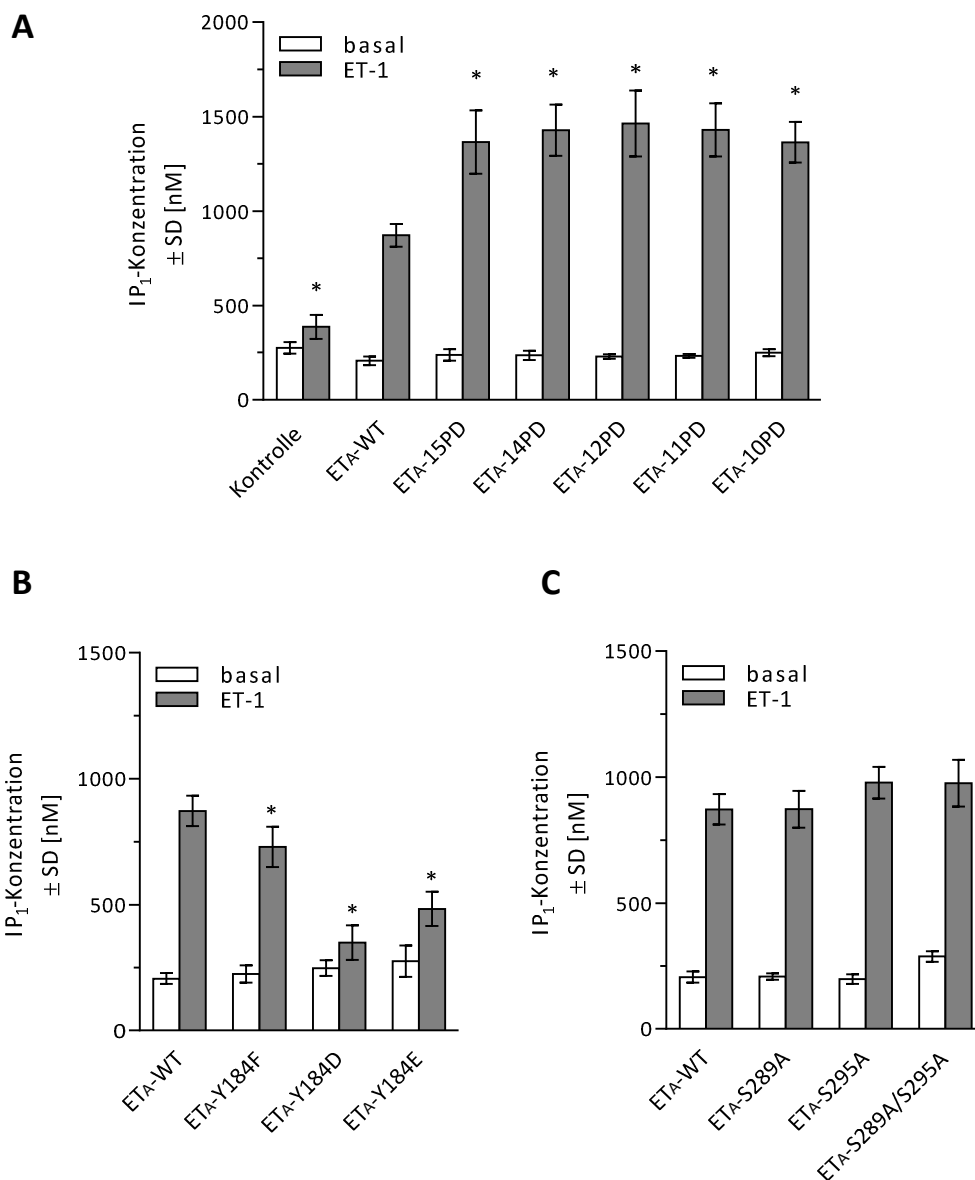


Abb. 3-9. Einfluss von Punktmutationen in der zweiten und dritten intrazellulären Schleife des ET_A-Rezeptors auf die PLC-Aktivität. HEK 293-Zellen wurden mit Rezeptor-DNA transfiziert und nach 24 h für 2 h mit 100 nM ET-1 stimuliert oder mit Stimulationspuffer inkubiert (basal). Die IP₁-Konzentration im Zellysate wurde mit dem *IP-One Tb Kit* ermittelt. Zur Kontrolle wurde der Leervektor transfiziert. Die Versuche wurden dreimal mindestens in Vierfachbestimmung durchgeführt. Gezeigt sind die hieraus gemittelten Werte. *, $p < 0,001$, *One Way Anova* mit *Benferroni's Post Test* gegenüber ET_A-WT.

In Bezug auf Lokalisierung und Funktion dieser CTE-Phosphorylierungsstellen ergaben sich weitere Fragen:

1. Ist die Phosphorylierung einer bestimmten Aminosäure in der CTE essentiell für die Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors?

Die Rezeptoraktivität von zehn Einzelmutanten mit den entsprechenden Ala-Substitutionen wurde analysiert. Es ergab sich in keinem Fall eine Änderung der ET-1-vermittelten IP₁-Akkumulation (Abb. 3-10). Demzufolge muss die kombinierte Substitution mehrerer Phosphorylierungsstellen zu einer gestörten Regulation der Mutante ET_A-10PD geführt haben.

2. Wieviele CTE-Phosphorylierungsstellen sind essentiell für die Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors?

In diesem Schritt wurde das Desensibilisierungsverhalten einer Serie von ET_A-Rezeptor-Mutanten untersucht. Ausgehend vom C-Terminus wurde die Anzahl an Mutationen in der CTE schrittweise erhöht. Eine Analyse der IP₁-Akkumulation zeigte, dass die Rezeptoraktivität der Mutanten ET_A-2PD, ET_A-3PD und ET_A-4PD mit der des Wildtyps vergleichbar war (Abb. 3-10). Das bedeutet, dass bis zu vier Phosphorylierungsstellen am distalen Ende des C-Terminus ohne eine Beeinträchtigung der Desensibilisierung entfernt werden konnten. Mit dem Entfernen der fünften Phosphorylierungsstelle (ET_A-5PD) wurde jedoch eine signifikante Reduktion der Rezeptordesensibilisierung induziert. Eine weitere

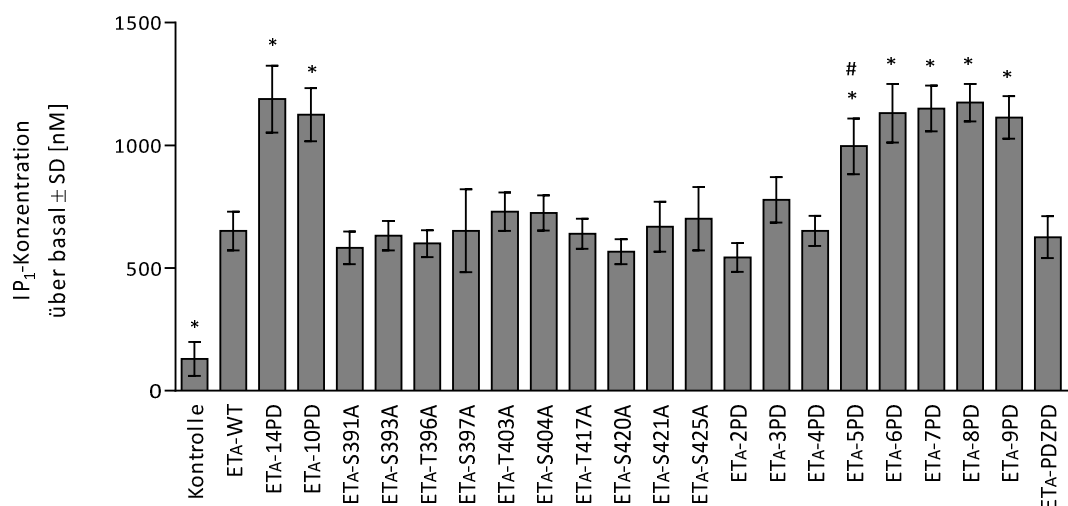


Abb. 3-10. Aktivität von ET_A-Rezeptor-Mutanten mit Mutationen im C-Terminus. HEK 293-Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit Rezeptor-DNA für 2 h mit und ohne 100 nM ET-1 inkubiert. Die IP₁-Konzentration im Zelllysat wurde mit dem *IP-One Tb Kit* gemessen. Der Versuch wurde dreimal mindestens in Vierfachbestimmung durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der IP₁-Konzentrationen über dem Basalwert ± SD. Der Basalwert war bei allen untersuchten Rezeptoren vergleichbar und ist nicht dargestellt. *, p < 0,001, *One Way Anova* mit *Benferroni's Post Test* gegenüber ET_A-WT.

Hemmung der Rezeptordesensibilisierung wurde bei der Mutante ET_A-6PD erzielt, welche sechs Ala-Substitutionen aufweist und deren Signal sich nicht von dem der Mutante ET_A-10PD unterschied. Ebenso war die IP₁-Akkumulation der Mutanten ET_A-7PD, ET_A-8PD und ET_A-9PD auf dem gleichen, maximalen Niveau.

3. Spielt die Lokalisierung der Phosphorylierungsstellen innerhalb der CTE eine Rolle in der Regulation des ET_A-Rezeptors?

In den oben beschriebenen Versuchen erfolgte die Substitution der CTE-Phosphorylierungsstellen ausgehend vom C-Terminus. Die Phosphorylierung distaler Ser/Thr-Reste scheint auf Grundlage dieser Daten nur in Kombination mit der Phosphorylierung proximaler Ser/Thr-Reste für die Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors von Bedeutung zu sein. Ob dies tatsächlich der Fall ist, sollte in einem weiteren Versuch mit einer Mutante geklärt werden, deren proximale Phosphorylierungsstellen komplett entfernt wurden, die aber sonst keine Mutationen aufweist (ET_A-PDZPD). Erstaunlicherweise zeigte diese Mutante eine dem Wildtyp entsprechende Desensibilisierung (Abb. 3-10). Die Rezeptor-Phosphorylierung, die in die Desensibilisierung involviert ist, ist also nicht auf einen Bereich innerhalb der CTE beschränkt, sondern kann in redundanter Weise im proximalen (im Falle von ET_A-4PD) oder im distalen (im Falle von ET_A-PDZPD) Bereich der CTE erfolgen.

4. Spielen die Aminosäuren T403 und S404 eine besondere Rolle in der Regulation des ET_A-Rezeptors?

Wie oben dargestellt, kann die Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors ohne Phosphorylierung der distalen Ser/Thr-Reste stattfinden (ET_A-4PD). Sie wird aber durch das zusätzliche Entfernen von T403 und S404 inhibiert (ET_A-5PD, ET_A-6PD). Um zu prüfen, ob die Anwesenheit von T403 und S404 hinreichend für eine physiologische Rezeptordesensibilisierung ist, wurden - ausgehend von ET_A-11PD - Mutanten generiert, bei denen eine oder zwei dieser Stellen wieder eingefügt wurden. Die beiden Mutanten ET_A-11PD-A404S und ET_A-11PD-A403T/A404S verhielten sich wie die Mutante ET_A-11PD (Abb. 3-11 A). Die wildtypische Rezeptor-Regulation konnte also alleine durch das Vorhandensein von T403 und S404 nicht wiederhergestellt werden. Des Weiteren sollte die Frage beantwortet werden, ob T403 und S404 eine besondere Rolle in der Desensibilisierung von ET_A-4PD spielen oder ob das Entfernen jeglicher Ser/Thr-Reste im proximalen Bereich zu einem Verlust der Desensibilisierung führt, wenn zusätzlich die distalen Phosphorylierungsstellen fehlen. Dies wurde mit Mutanten untersucht, die ausgehend von ET_A-4PD zusätzliche Punktmutationen im proximalen Bereich enthielten (Abb. 3-11 B). Die Mutanten ET_A-4PD-S391A, ET_A-4PD-S393A, ET_A-4PD-T396A, ET_A-4PD-S397A, ET_A-4PD-T403A und ET_A-5PD (jedoch nicht ET_A-4PD (Abb. 3-10)) wiesen eine gestörte Regulation auf, was sich in einer gegenüber dem Wildtyp signifikant erhöhten IP₁-Akkumulation zeigte. Das maximale Signal von ET_A-6PD wurde jedoch nicht erreicht. Es kann also

festgehalten werden, dass 1.) die Signaltransduktion des ET_A-Rezeptors bei alleinigem Vorhandensein von T403 und S404 und bei Abwesenheit der anderen C-terminalen Phosphorylierungsstellen nicht der wildtypischen Regulation unterliegt und dass 2.) bei Abwesenheit der distalen Phosphorylierungsstellen jeder proximale Ser/Thr-Rest essentiell für eine physiologische Rezeptor-Regulation ist.

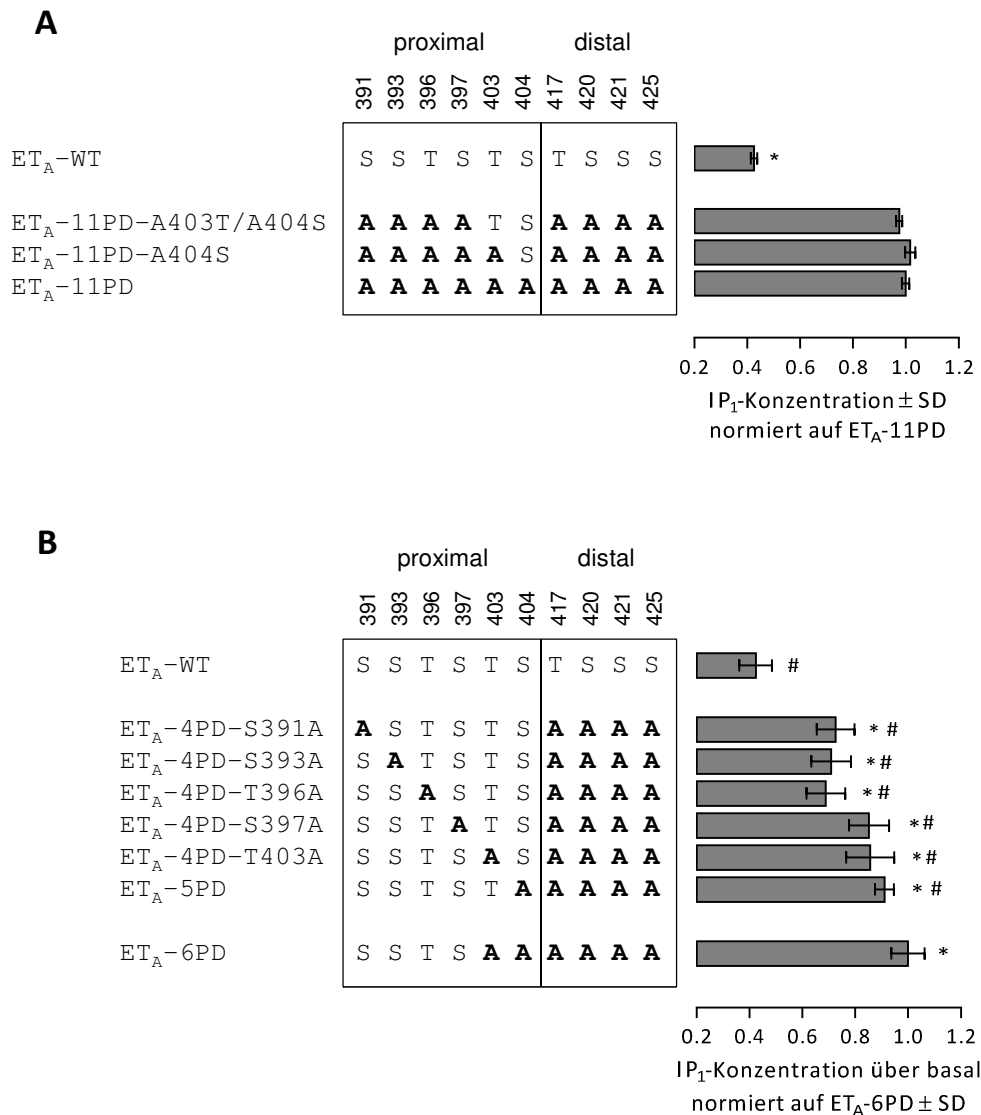


Abb. 3-11. Rolle von T403 und S404 in der Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors. Die PLC-Aktivitäten wurden entsprechend Abb. 3-10 ermittelt. Proximale und distale Ala-Substitutionen in der CTE des Rezeptors sind jeweils unterhalb der Positionsangabe fett gekennzeichnet. A) Die alleinige Anwesenheit von T403 und S404 ist nicht hinreichend, um die erhöhte PLC-Aktivität der Mutante ET_A-11PD zu kompensieren. Der Versuch wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt. *, p < 0,001, One Way Anova mit *Benferroni's Post Test* gegenüber ET_A-11PD. B) Bei vollständiger Substitution der distalen Phosphorylierungsstellen ist für eine dem Wildtyp entsprechende Rezeptor Regulation jede proximale Phosphorylierungsstelle notwendig. Der Versuch wurde zweimal mindestens in Dreifachbestimmung durchgeführt. * und #, p < 0,001, One Way Anova mit *Benferroni's Post Test* gegenüber ET_A-WT (*) bzw. ET_A-6PD(#).

5. Ist die vollständige Anwesenheit mindestens eines *Clusters* an CTE-Phosphorylierungsstellen essentiell für die physiologische ET_A-Rezeptor-Regulation?

Wie oben gezeigt, hat der jeweils komplette Austausch eines *Ser/Thr-Cluster*s keinen messbaren Effekt, wenn das andere *Ser/Thr-Cluster* vollständig erhalten bleibt. Liegt eine kombinierte Substitution von distalen *und* proximalen Phosphorylierungen vor (wie z.B. bei der Mutante ET_A-5PD), so hat dies jedoch einen Einfluss auf die Rezeptor-Desensibilisierung. In weiteren Versuchen sollten Hinweise gesammelt werden, ob die Regulation generell bereits durch die kombinierte Substitution von Phosphorylierungsstellen beider *Ser/Thr-Cluster* beeinträchtigt wird oder ob eher die Anzahl an Punktmutationen in der CTE entscheidend hierfür ist. Es wurden exemplarisch einige Mehrfachmutanten mit der Punktmutation S404A im proximalen *Ser/Thr-Cluster* und ein bis drei zusätzlichen Mutationen im distalen *Ser/Thr-Cluster* verwendet. Die IP₁-Akkumulation dieser Rezeptor-Mutanten war gegenüber der des wildtypischen Rezeptors erhöht (Abb. 3-12). Das Signal zeigte allerdings bei keiner dieser Mutanten die maximale Auslenkung wie bei ET_A-6PD. Die Desensibilisierung war (ähnlich wie bei den Fünffach-Mutanten aus Abb. 3-11 B) jeweils weniger stark beeinträchtigt. Unabhängig von der Gesamtanzahl an in der CTE verbliebenen Phosphorylierungsstellen scheint also die Unversehrtheit mindestens eines der beiden *Cluster* eine Voraussetzung für eine physiologische Rezeptor-Regulation zu sein.

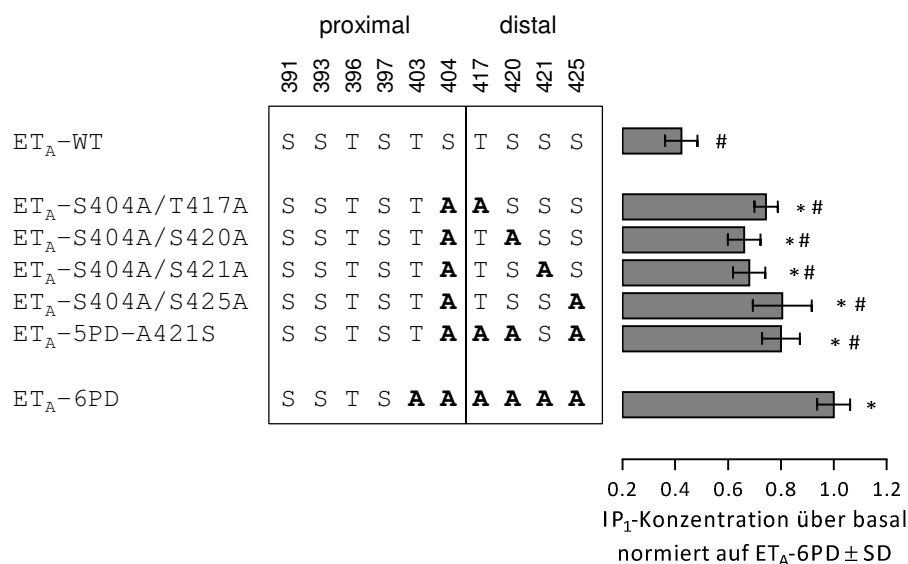


Abb. 3-12. Einfluss von wenigen Ala-Substitutionen auf das Signal des ET_A-Rezeptors. Die PLC-Aktivitäten wurden entsprechend Abb. 3-10 ermittelt. Proximale und distale Ala-Substitutionen in der CTE des Rezeptors sind jeweils unterhalb der Positionsangabe fett gekennzeichnet. Wenn eine Kombination aus proximalen und distalen Substitutionen vorliegt, führen selbst wenige Punktmutationen zu signifikant erhöhter PLC-Aktivität. Der Versuch wurde zweimal mindestens in Dreifachbestimmung durchgeführt. * und #, $p < 0,001$, *One Way Anova* mit *Benferroni's Post Test* gegenüber ET_A-WT (*) bzw. ET_A-6PD(#).

3.6.3 Phosphomimetik

Um zu belegen, dass die Regulation von ET_A -6PD aufgrund mangelnder Rezeptor-Phosphorylierung und nicht durch das Fehlen der Ser/Thr-Reste an sich gestört war, wurde die Mutante ET_A -6E verwendet (Abb. 3-13). Diese enthält sechs Glu-Substitutionen, um einen phosphorylierten Rezeptor zu imitieren. Mit ET_A -6E wurde im Vergleich zu ET_A -6PD eine geringere IP_1 -Akkumulation erreicht. Die Rezeptoraktivität war jedoch im Vergleich zu der des Wildtyps erhöht.

3.6.4 Koexpression von ET_A -Rezeptoren und GRK2

Es sollte der Einfluss von GRK2 auf die ET_A -Rezeptor-vermittelte PLC-Aktivität untersucht werden. Hierdurch sollte geprüft werden, inwieweit eine Phosphorylierung der CTE durch GRK2 an der Desensibilisierung des ET_A -Rezeptors beteiligt ist. Die Kinase wurde hierfür mit entweder ET_A -WT oder ET_A -6PD in HEK 293-Zellen koexprimiert und die ET-1-induzierte IP_1 -Akkumulation gemessen. Für diese Versuche kamen neben der wildtypischen GRK2 (GRK2-WT) die beiden Mutanten GRK2-D110A und GRK2-D110A/K220R zum Einsatz. Die Punktmutation D110A [81,107] in der RH-Domäne von GRK2 inhibiert die Bindung der Kinase an $G\alpha_q$ [106]. Die Mutation K220R hingegen befindet sich im aktiven Zentrum der Kinase und resultiert in einer katalytisch inaktiven GRK2-Mutante [243].

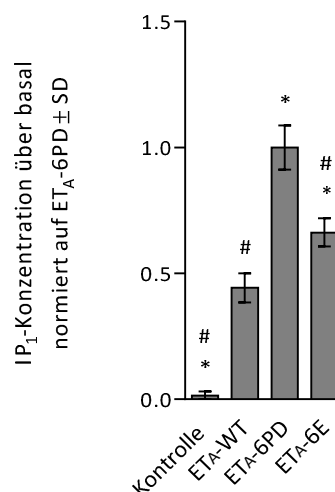


Abb. 3-13. Imitierung einer Rezeptor-Phosphorylierung. HEK 293-Zellen wurden mit Plasmid-DNA, welche für den wildtypischen ET_A -Rezeptor oder für die Mutanten ET_A -6PD und ET_A -6E kodierten, transfiziert. Kontrollzellen wurden mit dem Leervektor transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde für 2 h mit und ohne (basal) 100 nM ET-1 inkubiert. Die IP_1 -Konzentration im Zelllysat wurde mit dem *IP-One Tb Kit* gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus zwei unabhängigen Versuchen, die je mindestens in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. * und #, $p < 0,001$, *One Way Anova* mit *Benferroni's Post Test* gegenüber ET_A -WT (*) bzw. ET_A -6PD(#).

Humane GRK2 im pcDNA3-Vektor wurde freundlicherweise von Prof. Martin Lohse (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Ausgehend von diesem Konstrukt wurden die GRK2-Mutanten durch zielgerichtete Mutagenese gewonnen. Zunächst wurde GRK2-D110A und hieraus die Doppelmutante GRK2-D110A/K220R kloniert. Mittels *Western Blot* konnte belegt werden, dass beide Mutationen keinen Einfluss auf die Protein-Expressionsstärke von in HEK 293-Zellen heterolog exprimierter GRK2 haben (Abb. 3-14 A).

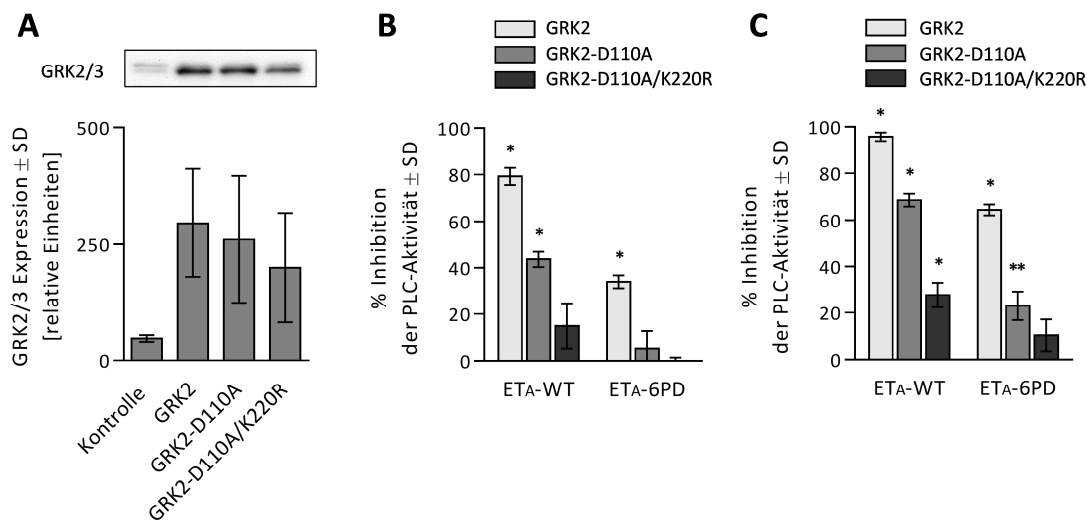


Abb. 3-14. Einfluss der Kinaseaktivität und der $G\alpha_q$ -Bindung von GRK2 auf das Signal des ET_A -Rezeptors. A) Zur Kontrolle der Proteinexpression wurde humane GRK2 sowie die beiden Mutanten GRK2-D110A und GRK2-D110A/K220R in HEK 293-Zellen zusammen mit dem ET_A -Rezeptor transient exprimiert und mit einem GRK2-spezifischen Antikörper im Zelllysat (7 μ g Gesamtprotein) nachgewiesen (oben). Die Auswertung der *Western Blot*-Experimente erfolgte densitometrisch (unten). In drei voneinander unabhängigen Versuchen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Proteinexpression der drei GRK2-Formen nachgewiesen werden (*One Way Anova* mit *Benferroni's Post Test*). Kontrollzellen wurden lediglich mit ET_A -Rezeptor-kodierender Plasmid-DNA transfiziert. B) HEK 293-Zellen wurden transient mit ET_A -WT bzw. ET_A -6PD und GRK2-Konstrukten wie angegeben kotransfiziert. Es kamen 0 (Kontrollzellen) oder 5 ng GRK2-kodierender Plasmid DNA pro cm^2 Wachstumsfläche zum Einsatz. Die Zellen wurden 30 min mit 0 (basal) oder mit 100 nM ET-1 stimuliert. Die IP_1 -Konzentration im Zelllysat wurde mit dem *IP-One Tb Kit* in Dreifachbestimmung gemessen. Von jedem Datenpunkt wurde der Basalwert nicht stimulierter Kontrollzellen abgezogen, um die PLC-Aktivität über dem Basalwert (PLC_{net}) zu erhalten. Die Inhibition der PLC-Aktivität in Prozent wurde wie folgt ermittelt: $100 \times (PLC_{net} \text{ von Kontrollzellen} - PLC_{net}) / (PLC_{net} \text{ von Kontrollzellen})$. Die Ergebnisse wurden mit den Werten von Kontrollzellen (= 0) verglichen. C) Für die Kotransfektion kamen 0 (Kontrollzellen) oder 25 ng GRK2-kodierender Plasmid-DNA pro cm^2 Wachstumsfläche zum Einsatz. Der Versuch und die Auswertung erfolgten ansonsten analog zu B). *, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$, *One Way Anova* mit *Benferroni's Post Test* gegenüber Kontrollzellen.

Die ET_A-WT- und die ET_A-6PD-vermittelte IP₁-Akkumulation wurde durch die Anwesenheit von heterolog exprimierter wildtypischer GRK2 um $79,3 \pm 3,6$ bzw. $34,0 \pm 2,8$ % reduziert (Abb. 3-14 B). GRK2-D110A inhibierte das Signal von ET_A-WT um $43,7 \pm 3,3$ %, hatte aber keinen signifikanten Einfluss auf die ET_A-6PD-vermittelte PLC-Aktivität. Dies lässt darauf schließen, dass hier zwei voneinander unabhängige, GRK2-vermittelte Mechanismen involviert sind, deren Effekte sich addieren. Einerseits trägt die Phosphorylierung des ET_A-Rezeptors zur Regulation bei (ca. 45 %). Außerdem wird ein zusätzlicher phosphorylierungsunabhängiger Mechanismus über die Bindung der Kinase an Gα_q realisiert (ca. 35 %). Konsequenterweise beeinträchtigte die Doppelmutante GRK2-D110A/K220R die Signale beider Rezeptoren in diesem experimentellen Ansatz nicht.

Eine Erhöhung der GRK2-Plasmidmenge um das Fünffache gegenüber den oben beschriebenen Experimenten führte zu ähnlichen Ergebnissen (Abb. 3-14 C). Die Hemmeffekte waren jedoch in allen Ansätzen stärker ausgeprägt: GRK2-WT reduzierte das Signal von ET_A-WT nahezu vollständig ($95,8 \pm 1,8$ % Inhibition) und das Signal von ET_A-6PD um $64,5 \pm 2,4$ %. GRK2-D110A inhibierte die IP₁-Akkumulation von ET_A-WT und ET_A-6PD zu $68,7 \pm 2,7$ bzw. $23,1 \pm 6,1$ %. Selbst GRK2-D110A/K220R reduzierte die ET_A-WT-induzierte PLC Aktivität noch um $27,7 \pm 5,3$ %. Die zusätzliche Signalreduktion kann nur teilweise durch die vermehrte GRK2-Expression erklärt werden. Insbesondere die Inhibition des ET_A-6PD-Signals durch GRK2-D110A und des ET_A-WT-Signals durch GRK2-D110A/K220R lässt auf einen weiteren (dritten) Desensibilisierungsmechanismus schließen, der erst bei einer größeren GRK2-Konzentration zum Tragen kommt.

Es konnte also die Existenz mindestens dreier voneinander unabhängiger GRK2-vermittelter Komponenten im Desensibilisierungsprozess des ET_A-Rezeptors nachgewiesen werden. Ein Mechanismus führt über die Kinaseaktivität von GRK2 und ein weiterer Mechanismus über die Bindung von GRK2 an Gα_q zur Inhibition der PLC-Aktivität. Der Mechanismus der dritten Komponente ist unbekannt.

3.6.5 GRK2-Knockdown

Der Einfluss von GRK2 auf die Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors in HEK 293-Zellen sollte durch einen *Knockdown* der endogenen GRK2 weiter analysiert werden. Hierfür wurde zunächst die siRNA-Behandlung optimiert. Es wurden 30 bis 150 nM GRK2-spezifische siRNA eingesetzt und nach 48 h die relative Konzentration der GRK2-mRNA mittels qRT-PCR ermittelt (Abb. 3-15 A). Bei einer siRNA-Konzentration von 75 nM war die Reduktion der GRK2-mRNA am effektivsten. Die GRK2-mRNA konnte gegenüber dem Kontrollansatz mit unspezifischer siRNA (ctr-siRNA) um $73 \pm 2,5$ % gesenkt werden. Auf Proteinebene konnte endogen exprimierte GRK2/3 in HEK 293-Zellen auf $12 \pm 2,8$ % gesenkt werden (Abb. 3-15 B).

Um den Einfluss des GRK2-*Knockdowns* auf die phosphorylierungsabhängige Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors zu untersuchen, wurden ET_A-WT und ET_A-6PD exprimierende Zellen mit GRK2-spezifischer siRNA behandelt und deren ET-1-induzierte IP₁-Akkumulation analysiert (Abb. 3-15 C). Wie erwartet wurden beide Signale durch den GRK2-*Knockdown* verstärkt. Die IP₁-Konzentration im ET_A-WT-Ansatz wurde von 635 ± 129 nM (ctr-siRNA) auf 961 ± 189 nM (GRK2-siRNA) angehoben. Die IP₁-Konzentration im Zelllysat der mit ET_A-6PD transfizierten Zellen erhöhte sich durch den GRK2-*Knockdown* von 1.111 ± 175 nM auf 1.481 ± 212 nM. Dies entsprach einer Steigerung des durch ET_A-WT und ET_A-6PD vermittelten Signals um 47 ± 6 bzw. 31 ± 4 % (Abb. 3-15 C). Die Auswirkung des *Knockdowns* auf beide Signale war signifikant unterschiedlich ($p < 0,001$, *Student's t-Test*).

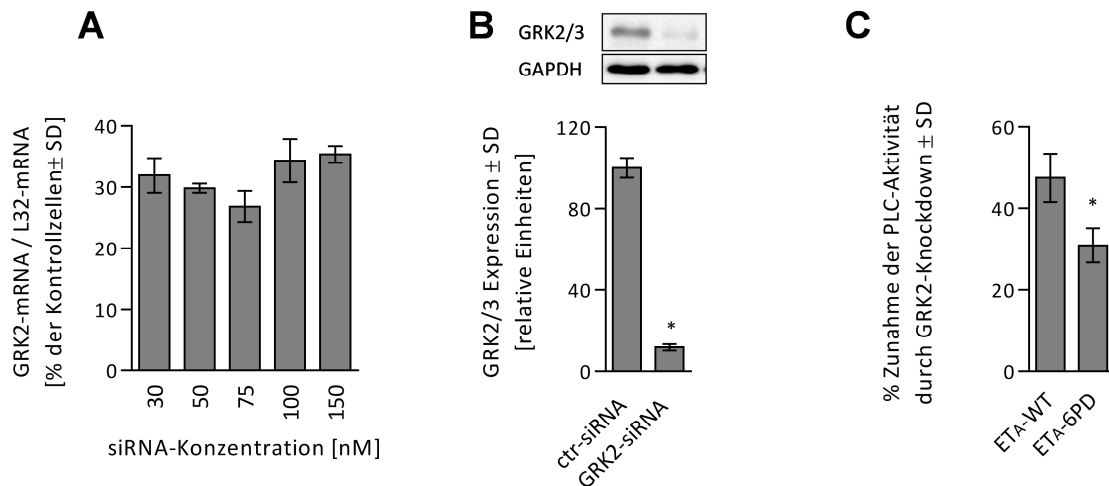


Abb. 3-15. Einfluss eines GRK2-*Knockdowns* auf das Signal des ET_A-Rezeptors. A) Für die Optimierung des *Knockdowns* wurden HEK 293-Zellen mit den angegebenen Konzentrationen an GRK2-spezifischer siRNA transfiziert und 48 h inkubiert. Für die Referenzprobe (100%) wurden Kontrollzellen mit 100 nM *Silencer® Negative Control siRNA* (ctr-siRNA) transfiziert. Aus dem Zelllysat wurde die mRNA isoliert. Die Quantifizierung der GRK2-mRNA erfolgte nach reverser Transkription durch qRT-PCR mit L32 als endogener Kontrolle in Doppelbestimmung. Gezeigt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten ± SD. B) Die Effizienz des *Knockdowns* wurde in einem *Western Blot*-Experiment ermittelt. HEK 293-Zellen wurden mit ET_A-WT-kodierender Plasmid-DNA und 75 nM GRK2-spezifischer siRNA transfiziert. Für die Referenzprobe (100 %) wurden Kontrollzellen mit Rezeptor-DNA und 75 nM ctr-siRNA transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und GRK2/3 mittels *Western Blot* im Zelllysat (7 µg Gesamtprotein) nachgewiesen (oben). Für die Ladekontrolle kam ein GAPDH-spezifischer Antikörper zum Einsatz. Die Quantifizierung erfolgte densitometrisch (unten). Gezeigt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten ± SD. C) Im *IP-One Tb-Assay* wurde der Einfluss eines GRK2-*Knockdowns* auf die ET_A-WT- und ET_A-6PD-vermittelte ET-1-induzierte PLC-Aktivität untersucht. Hierfür wurden 15.000 HEK 293-Zellen mit der Rezeptor-DNA und 75 nM GRK2-spezifischer siRNA transfiziert. Kontrollzellen wurden mit Rezeptor-DNA und 75 nM ctr-siRNA transfiziert. Nach 48 h wurde für 30 min mit 0 (Basalwert) und 100 nm ET-1 inkubiert. Der Basalwert wurde jeweils abgezogen, um die IP₁-Akkumulation über der Basalaktivität (IP_{1,net}) zu erhalten. Die prozentuale Zunahme der PLC-Aktivität durch den GRK2-*Knockdown* wurde wie folgt berechnet: 100 x ((IP_{1,net}/IP_{1,net} der Kontrollzellen)-1). Gezeigt ist der Mittelwert ± SD aus zwei Experimenten in je Dreifachbestimmung. *, $p < 0,001$, *Student's t-Test*.

3.7 Fluoreszenzmikroskopie

Um den ET_A-Rezeptor in der Fluoreszenzmikroskopie nachzuweisen, wurde dieser C-terminal mit mRuby, einem rot fluoreszierenden Protein, fusioniert, welches von eqFP611 aus *Entacmaea quadricolor* hergeleitet wurde [240]. In HEK 293-Zellen exprimiert, war der mRuby-gekoppelte ET_A-Rezeptor an der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 3-16 A). Ein großer Teil der Fluoreszenz stammte jedoch von intrazellulären Vesikeln. Ob es sich hierbei um neu synthetisierte Rezeptoren handelte, wurde mit dem Translationshemmer Cycloheximid untersucht. Eine Behandlung mit 20 ng/mL Cycloheximid hatte keine Auswirkung auf die intrazelluläre Fluoreszenz (Abb. 3-16 B). Des Weiteren wurden Membran-durchgängige Liganden des ET_A-Rezeptors zugegeben, um die Proteinfaltung zu unterstützen. Eine Inkubation mit dem ET_A-Rezeptor-spezifischen Antagonisten BQ123 (1 μM) und dem dualen ET_A/ET_B-Antagonisten Bosentan (1 μg/mL) zeigte jedoch ebenfalls keinen Effekt auf die intrazelluläre Fluoreszenz (Abb. 3-16 C-D).

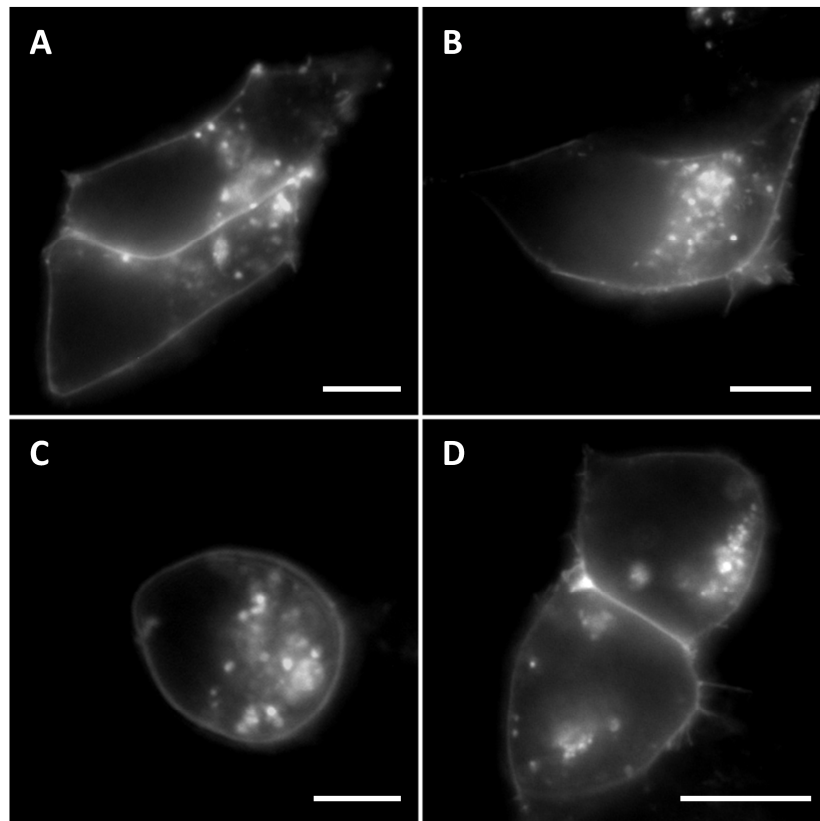


Abb. 3-16. Lokalisation des ET_A-Rezeptors in HEK 293-Zellen. Die Zellen wurden transient mit ET_A-WT-mRuby-kodierender Plasmid-DNA transfiziert. Gezeigt sind unbehandelte Zellen (A) sowie mit 20 ng/mL Cycloheximid für 3,5 h (B), mit 1 μM BQ123 für 3,5 h (C) und mit 1 μg/mL Bosentan für 24 h (D) behandelte Zellen. Die Bilder wurden mit einem Weitfeld-Mikroskop aufgenommen. Maßstab: 10 μm.

3.7.1 β -Arrestin 2-Translokation

β -Arrestine sind in die Desensibilisierung von GPCRs involviert und werden dementsprechend von Liganden-gebundenen Rezeptoren zur Zellmembran rekrutiert [244]. Um die ET_A -Rezeptor-vermittelte Translokation von β -Arrestin 2 zu untersuchen, wurde ET_A -WT-mRuby mit β -Arrestin 2-YFP in HEK 293-Zellen transient koexprimiert. Es konnte nach ET-1-Stimulation keine Translokation von β -Arrestin 2-YFP zur Zellmembran beobachtet werden (Abb. 3-17).

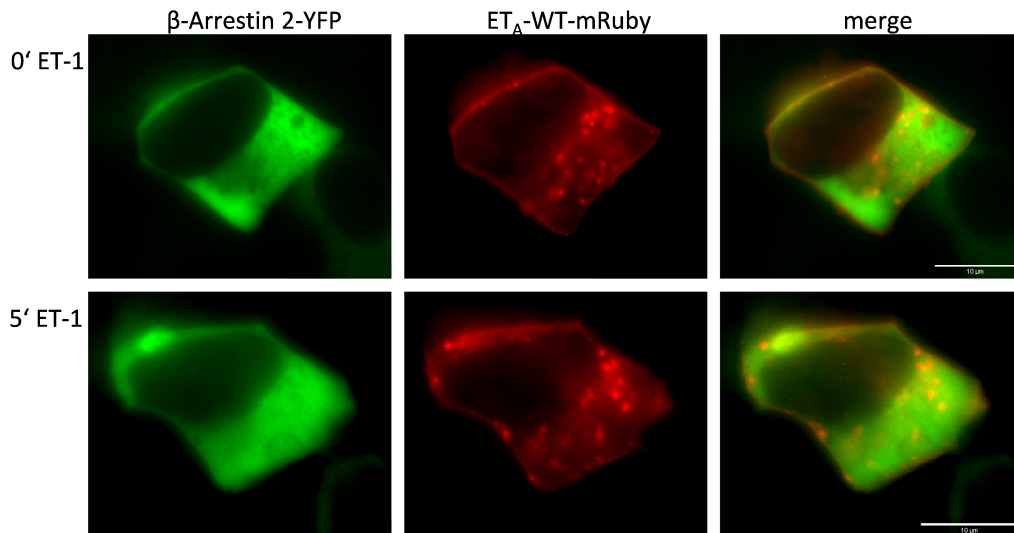


Abb. 3-17. β -Arrestin 2-Translokations-Experiment. ET_A -WT-mRuby und β -Arrestin 2-YFP wurden in HEK 293-Zellen transient koexprimiert. Die Lokalisation von β -Arrestin 2 wurde vor (oben) und 5 min nach (unten) einer Stimulation mit 100 nM ET-1 bei 37 °C in einem Weitfeld-Mikroskop beobachtet. In fünf unabhängigen Versuchen konnte keine Translokation von β -Arrestin 2 zur Zellmembran gesehen werden.

3.7.2 Rezeptor-Internalisierung

Der Einfluss der Phosphorylierungsstellen des ET_A -Rezeptors auf dessen Internalisierung sollte untersucht werden. Der mRuby-markierte ET_A -Rezeptor war in HEK 293-Zellen jedoch nicht nur auf der Zelloberfläche, sondern zu einem großen Teil auch in intrazellulären Vesikeln lokalisiert (Abb. 3-16). Daher war ein mikroskopischer Nachweis der Rezeptor-Internalisierung durch die Beobachtung des mRuby-Signals schwer zu realisieren. Um eine Agonisten-induzierte Internalisierung des Rezeptors eindeutig nachzuweisen, wurden die Zellen mit HiLyte Fluor 488-markiertem ET-1 (ET-1-HiLyte) behandelt. Zuvor wurde im *IP-One Tb-Assay* die ET-1-HiLyte-induzierte PLC-Aktivität überprüft. ET_A -WT-exprimierende HEK 293-Zellen konnten durch den fluoreszierenden Agonisten ebenso stimuliert werden wie durch das nicht markierte Molekül (Abb. 3-18 A). In Abb. 3-18 B ist zu erkennen, dass ET-1-HiLyte direkt nach Zugabe an die Zellmembran von ET_A -WT-exprimierenden HEK 293-Zellen gebunden hatte. Nicht transfizierte Zellen hingegen zeigten keine detektierbare ET-1-HiLyte-Bindung.

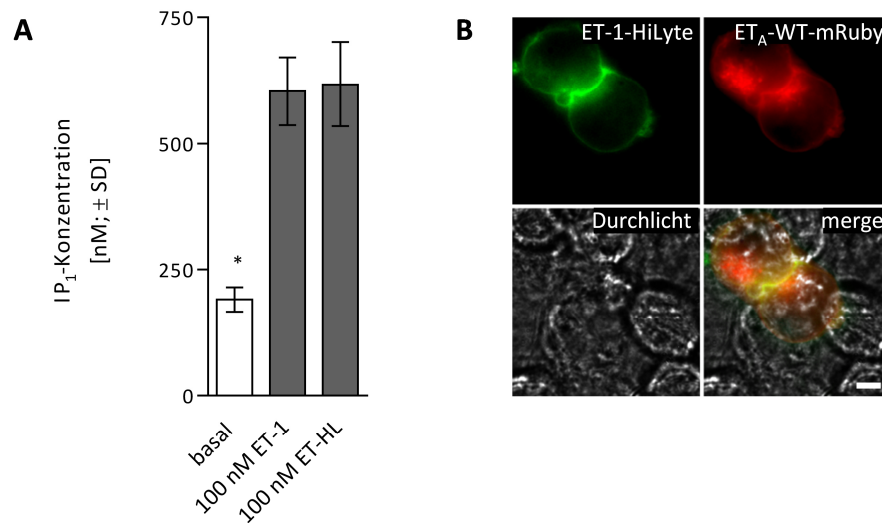


Abb. 3-18. Charakterisierung von HiLyte Fluor 488-markiertem ET-1. A) HEK 293-Zellen wurden mit ET_A-WT-kodierender Plasmid-DNA transient transfiziert und nach 24 h mit Stimulationspuffer (basal) mit 100 nM ET-1 oder mit 100 nM fluoreszenzgekoppeltem ET-1 (ET-1-HiLyte) inkubiert. *, $p < 0,001$, *One Way Anova* mit *Benferroni's Post Test* gegenüber ET-1. B) ET_A-WT-mRuby exprimierende HEK 293-Zellen wurden mit ET-1-HiLyte inkubiert. Die Bilder wurden unmittelbar nach Zugabe des Agonisten mit einem Weitfeld-Mikroskop aufgenommen. Maßstab: 10 μm.

Für die Analyse der Rezeptor-Internalisierung im konfokalen *Laser Scanning*-Mikroskop wurden ET_A-WT-mRuby und ET_A-14PD-mRuby-exprimierende HEK 293-Zellen bei 37 °C mit ET-1-HiLyte inkubiert (Abb. 3-19). Eine Bindung des Liganden an die Zelloberfläche wurde direkt nach der Zugabe festgestellt. Nach 15 min waren in beiden Ansätzen intrazelluläre Vesikel im grünen Kanal zu sehen, die eine Internalisierung der Agonisten-gebundenen Rezeptoren anzeigen. Die Anzahl der Vesikel stieg nach 30, 45 und 60 min jeweils weiter an. Das Entfernen der 14 untersuchten Phosphorylierungsstellen (einschließlich aller bisher identifizierten Ser/Thr-Phosphorylierungsstellen [218]) hatte keinen Einfluss auf die Rezeptor-Internalisierung. Hieraus kann gefolgert werden, dass die Internalisierung des ET_A-Rezeptors nicht phosphorylierungsabhängig ist.

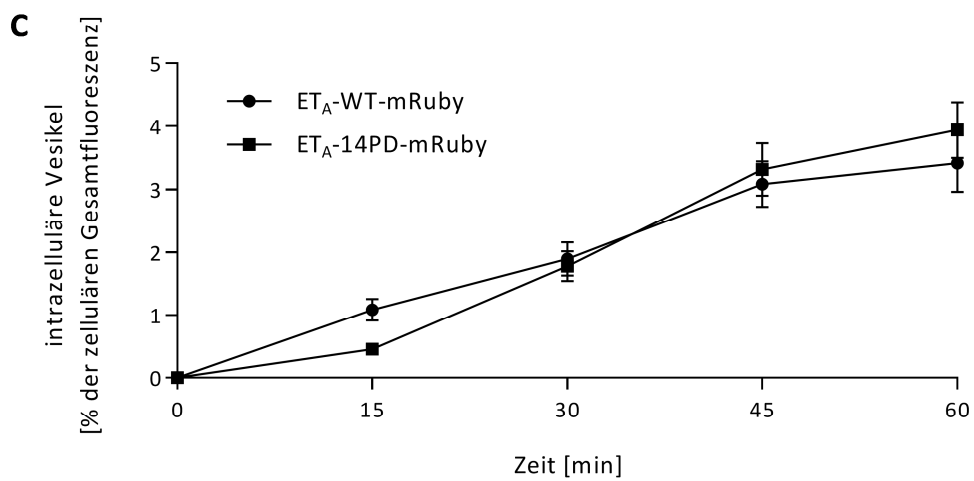
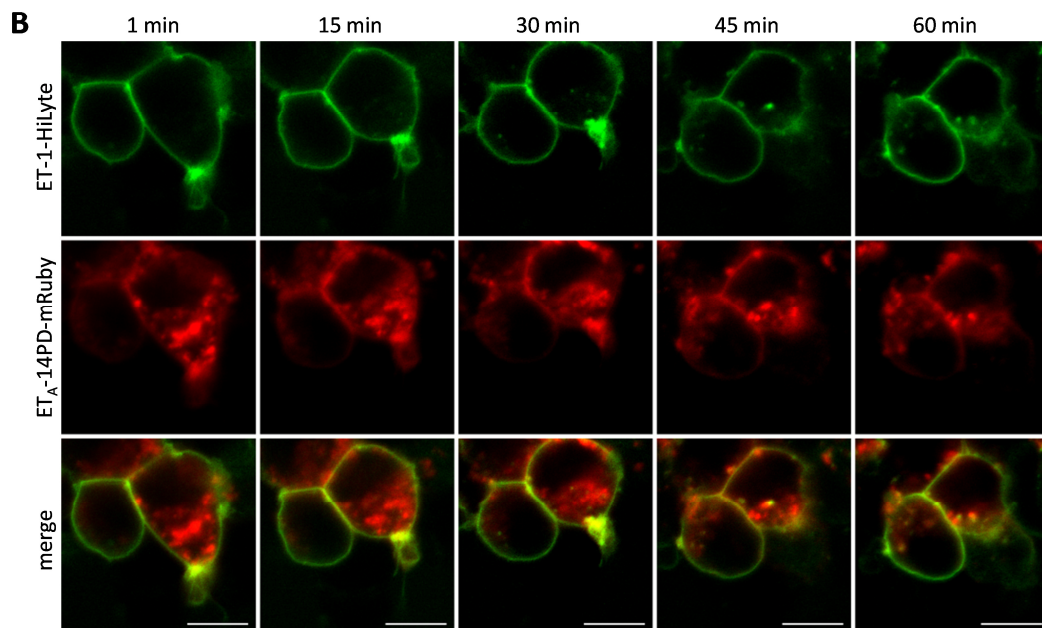
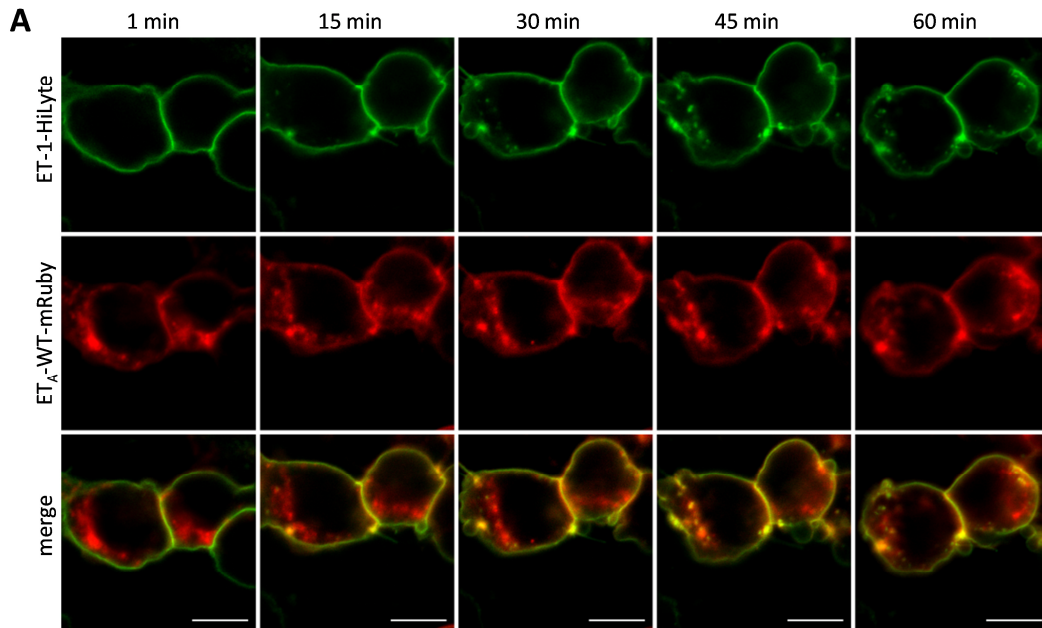


Abb. 3-19. Internalisierung des wildtypischen und eines phosphorylierungsdefizienten ET_A-Rezeptors. ET_A-WT-mRuby- (A) und ET_A-14PD-mRuby- (B) exprimierende HEK 293-Zellen wurden mit ET-1-HiLyte bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Internalisierung des fluoreszierenden Liganden wurde nach 1, 15, 30, 45 und 60 min im konfokalen *Laser Scanning*-Mikroskop beobachtet. Maßstab: 10 µm. C) Gezeigt ist die semiquantitative Auswertung der Internalisierung von ET_A-WT-mRuby und ET_A-14PD-mRuby mit der Software ImageJ. Nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz wurde die Signalintensität ET-1-HiLyte-positiver intrazellulärer Vesikel einer Zelle aufsummiert. Um etwaiges *Photobleaching* zu berücksichtigen, wurde dieser Wert jeweils auf die Gesamtfluoreszenz der Zelle normiert und mit 100 multipliziert, um den prozentualen Anteil der in intrazellulären Vesikeln befindlichen Fluoreszenzintensität zu erhalten. Das mRuby-Signal diente lediglich zur Kontrolle und wurde in die Auswertung nicht einbezogen. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM aus mindestens 25 Zellen pro Konstrukt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen ET_A-WT-mRuby und ET_A-14PD-mRuby festgestellt.

4 Diskussion

4.1 Experimentelle Grundlagen

4.1.1 Kontrolle der Rezeptor-Expression

Durch das Einfügen von Punktmutationen kann sich die Expressionsstärke transient exprimierter GPCRs in HEK 293-Zellen ändern [155]. Daher wurde in Kontroll-experimenten zunächst die Expression mutierter Rezeptoren untersucht. Die quantitative Analyse der Radioligandenbindung an Membranen von Rezeptor-exprimierenden HEK 293-Zellen zeigte, dass das Einbringen von bis zu 14 Punktmutationen keinen Einfluss auf die Expression des Rezeptors hatte, die zwischen $2,0 \pm 1,2$ und $2,3 \pm 1,1$ pmol pro mg Protein lag (Tab. 3-1). Die K_d -Werte für die Bindung des Liganden an die beiden untersuchten Rezeptoren entsprachen mit Werten zwischen 0,3 und 0,4 nM den Werten aus der Literatur für eine Bindung an den wildtypischen ET_A -Rezeptor mit 0,1 bis 0,4 nM [179,180,232,245,246].

Durch die quantitative Analyse der Bindungsstellen in Membranpräparationen wurde gezeigt, dass die Gesamtexpression von ET_A -WT und ET_A -14PD in HEK 293-Zellen vergleichbar ist. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass zwischen verschiedenen Rezeptor-Mutanten kinetische Unterschiede in der Proteinfaltung und/oder im Transport zur Plasmamembran bestehen. Trotz identischer Gesamt-expression verschiedener Mutanten ist es daher möglich, dass deren Rezeptordichte auf der Zelloberfläche variiert. Da jedoch alleine diese Oberflächenrezeptoren einer ET-1-Stimulation ausgesetzt sind und zum Signal beitragen, könnten Schlussfolgerungen aus der Analyse der PLC-Aktivität verfälscht sein, wenn die Dichte verschiedener Rezeptoren auf der Plasmamembran nicht verglichen wird.

Um die relative Oberflächenexpression der in dieser Arbeit verwendeten Rezeptoren zu bestimmen wurde zusätzlich zu den quantitativen Bindungsstudien die totale Bindung von 100 pM ^{125}I -ET-1 an intakte Zellen gemessen. Bei quantitativen Bindungsstudien wird die spezifische Bindung aus der totalen und der unspezifischen Bindung errechnet. Die unspezifische Bindung ist jedoch per Definition nicht vom Rezeptor abhängig. Es kann also die Annahme gemacht werden, dass diese für Zellen, die unterschiedliche Rezeptoren exprimieren, konstant ist. Somit konnte die Oberflächenexpression der verschiedenen Rezeptoren anhand der totalen Bindung des Radioliganden an intakte Zellen miteinander verglichen werden. Die geringfügige Bindung des Radioliganden an Kontrollzellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden, ergab sich, wie in Vorversuchen gezeigt werden konnte, hauptsächlich aus unspezifischer Bindung. Bei der Bestimmung der relativen

Bindung kam nur eine Radioliganden-Konzentration (100 pM) zum Einsatz. Dadurch war es technisch möglich, die Oberflächenexpression aller in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte zu vergleichen. Diese war bei allen Rezeptoren gleich (Abb. 3-4).

4.1.2 Analyse der homologen Rezeptor-Desensibilisierung

Der Nachweis einer homologen Desensibilisierung kann bei einigen GPCRs erbracht werden, indem nach einer Vorstimulation mit einem Agonisten die Antwort auf eine zweite Stimulation desensibilisierungsbedingt geringer ausfällt [247]. Da ET-1 mit einer K_d im subnanomolaren Bereich (Tab. 3-1) eine außergewöhnlich hohe Affinität für den ET_A-Rezeptor besitzt, bleibt der Ligand noch lange nach der initialen Bindung mit dem Rezeptor assoziiert [114]. Folglich kann beim ET_A-Rezeptor nur schwer eine Agonisten-induzierte Desensibilisierung gesehen werden, wenn das *Second Messenger*-Signal nach einem zweiten Stimulus untersucht wird. In dieser Arbeit wurde die Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors daher durch zwei alternative Herangehensweisen untersucht. Einerseits wurde versucht, die Desensibilisierung direkt in Ca^{2+} -*Imaging*-Experimenten zu analysieren und andererseits wurde die *Second Messenger*-Antwort während andauernder ET-1-Stimulation untersucht. Anhand der relativen Höhe des akkumulierten Signals konnte beim zweiten Ansatz indirekt auf die Regulation verschiedener Rezeptor-Mutanten rückgeschlossen werden.

4.1.2.1 Ca^{2+} -*Imaging*-Experimente

Die ET-1-Stimulation von mit ET_A-WT transfizierten HEK 293-Zellen führte wie erwartet zu einem transienten Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration (Abb. 3-5 A). Das rasche Abklingen der ET-1-induzierten Ca^{2+} -Antwort nach ca. 1 min wurde bereits mehrfach z.B. in HEK 293-Zellen [248,249] beschrieben. Nach dem Waschen und einer erneuten ET-1-Applikation erfolgte jeweils eine geringere Ca^{2+} -Antwort als die vorige (Abb. 3-5 A). Dieses Verhalten kann durch eine Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors erklärt werden und wurde bereits in Glattmuskelzellen beobachtet [217]. Auch das gänzliche Ausbleiben einer ET-1-induzierten Ca^{2+} -Antwort nach einer kontinuierlichen, fünfminütigen ET-1-Stimulation (Abb. 3-5 B) kann mit einer Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors erklärt werden.

Die Regulation des Ca^{2+} -Signals phosphorylierungsdefizienter ET_A-Rezeptoren wurde bisher noch nicht untersucht. In dieser Arbeit wurden bei wiederholtem und bei andauerndem Stimulus keine Unterschiede in der *Peak*-Amplitude oder im Desensibilisierungsverhalten zwischen der Mutante ET_A-14PD und dem Wildtyp festgestellt. Wie weiter unten diskutiert, bedeutet dies jedoch nicht, dass die Rezeptor-Phosphorylierung keinen Einfluss auf die Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors hat. Aufgrund methodischer und mechanistischer Unsicherheiten wurde der Einfluss der

Rezeptor-Phosphorylierung auf die Desensibilisierung zusätzlich durch die Analyse der *Second Messenger*-Produktion analysiert.

4.1.2.2 *Second Messenger*-basierte Analyse der Signaltransduktion

Für Endothelin-Rezeptoren wurde Zelltyp-spezifisch eine Kopplung an unterschiedliche G-Proteine nachgewiesen. Endotheline können über G_q die PLC aktivieren [186,187], und über G_s [188,189] oder G_i [190,192,193] einen stimulierenden oder inhibitorischen Effekt auf die AC ausüben. Zunächst sollte geklärt werden, welche G-Proteine in HEK 293-Zellen durch eine Stimulation des ET_A-Rezeptors aktivierbar sind.

Um die G_s-Kopplung des ET_A-Rezeptors zu analysieren, wurde die ET-1-induzierte cAMP-Akkumulation gemessen. Es stellte sich heraus, dass der wildtypische ET_A-Rezeptor im verwendeten System nicht an G_s gekoppelt war und eine solche Kopplung auch nicht durch das Entfernen von Phosphorylierungsstellen herbeigeführt wurde. Ebenso wurde die Inhibition der Isoprenalin-induzierten cAMP-Produktion untersucht und mit keinem verwendeten Rezeptor eine Kopplung an G_i festgestellt.

Weiterhin wurde die PLC-Aktivität analysiert, um eine G_q-Kopplung zu untersuchen. Da IP₃ eine geringe Halbwertszeit (< 30 s) besitzt und durch Phosphatasen in der Zelle über IP₁ rasch zu Myo-Inositol hydrolysiert wird, ist die direkte IP₃-Bestimmung schwer zu realisieren [250]. Daher wurde die Produktion dieses *Second Messengers* indirekt durch die Bestimmung der IP₁-Konzentration mit dem *IP-One Tb Kit* [251] analysiert. IP₁ ist in Gegenwart von Li⁺-Ionen, welche die Myoinositol-1-Phosphatase hemmen [252], stabil und kann mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen *Kits* von cisbio Bioassays quantifiziert werden. Durch die Analyse von IP₁ konnte eine Kopplung an G_q nachgewiesen werden. Die Stimulation ET_A-Rezeptor-exprimierender HEK 293-Zellen führte über einen Zeitraum von mindestens 2 h zu einem linearen Anstieg der IP₁-Akkumulation (Abb. 3-8). Dieser *Assay* konnte also für die Untersuchung der ET_A-Rezeptor-Desensibilisierung während kontinuierlicher Agonisten-Stimulation herangezogen werden. Eine verminderte Desensibilisierung sollte sich hierbei in einer Erhöhung des Signals ausdrücken.

4.2 Die Rolle der Phosphorylierung in der Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors

Die Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors wird durch die Kinase GRK2 vermittelt [114,217]. Ob jedoch phosphorylierungsabhängige oder -unabhängige Mechanismen involviert sind oder ob beides zutrifft, ist bisher ungeklärt [253]. Durch eine Inhibition der GRK2 wird die Phosphorylierung des ET_A-Rezeptors zusammen mit dessen Desensibilisierung gehemmt [114]. Das Modell eines phosphorylierungsabhängigen Desensibilisierungsmechanismus

scheint allerdings nicht auszureichen, um die ET_A-Rezeptor-Regulation vollständig zu beschreiben denn die katalytisch inaktive Mutante GRK2-K220R inhibierte die ET-1-induzierte PLC-Aktivität in ET_A-Rezeptor-exprimierenden HEK 293-Zellen in ähnlicher Weise wie die katalytisch aktive Wildtyp-Form [114].

4.2.1 Hinweise aus der *Second Messenger*- und Ca²⁺-Freisetzung

Durch die erhöhte IP₁-Akkumulation ET-1-stimulierter, phosphorylierungsdefizienter ET_A-Rezeptor-Mutanten konnte in dieser Arbeit die Existenz einer phosphorylierungsabhängigen ET_A-Rezeptor-Desensibilisierung gezeigt werden. (Abb. 3-9). Im Gegensatz dazu konnten bei Ca²⁺-*Imaging*-Experimenten keine Unterschiede in der Reduktion der ET_A-WT- und ET_A-14PD-vermittelten Signale festgestellt werden (Abb. 3-5). Zum einen könnten Gründe methodischer Art hierfür verantwortlich gewesen sein, da es sich um Einzelzell-Analysen handelte und die Zellantworten auf den ET-1-Stimulus mit einer Heterogenität behaftet waren. Durch die Betrachtung vieler Einzelzellen und der Mittelung der Signale wurde zwar versucht, dies zu kompensieren, jedoch reichte die Sensitivität dieser Methode nicht an die der IP₁-Bestimmung heran, bei der die PLC-Aktivität einer ganzen Zellpopulation gemessen wurde. Daher ist es möglich, dass geringe Änderungen im Desensibilisierungsverhalten durch die Analyse der Ca²⁺-Konzentration nicht abgebildet werden konnten. Die phosphorylierungsabhängige Desensibilisierung ist nur eine von mehreren Komponenten der ET_A-Rezeptor-Regulation (Kap. 4.5). Ihr Beitrag war eventuell zu gering, um mit einer Methode, die auf der Messung von Einzelzellen basiert, detektiert zu werden.

Weiterhin können Gründe mechanistischer Art zur Erklärung der Diskrepanz der Ergebnisse beider Experimente herangezogen werden. Der Anstieg der Ca²⁺-Konzentration ist der IP₃-Freisetzung nachgeschaltet. Der Ca²⁺-Ausstrom wird durch die Aktivierung des IP₃-sensitiven Ca²⁺-Kanals auf der Membran des ER induziert, wodurch das IP₃-Signal verstärkt wird. Es besteht eventuell ein nicht-linearer Zusammenhang zwischen der Intensität beider Signale. Außerdem wirkt IP₃ zunächst aktivierend und dann inhibitorisch auf den IP₃-sensitiven Ca²⁺-Kanal [254]. Eine Desensibilisierung dieses Kanals war also in jedem Fall (unabhängig von der Anwesenheit von Phosphorylierungsstellen im ET_A-Rezeptor) zu erwarten.

Obwohl die Messung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration den Vorteil einer Echtzeit-Analyse bietet, war diese Methode aus den genannten Gründen nicht geeignet, um die Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors zu untersuchen. Aus der erhöhten IP₁-Akkumulation ET-1-stimulierter phosphorylierungsdefizienter ET_A-Rezeptor-Mutanten kann geschlossen werden, dass eine Rezeptor-Phosphorylierung an der Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors beteiligt ist.

4.2.2 Hinweise aus der Koexpression von ET_A-Rezeptoren und GRK2

Eine Steigerung der PLC-Aktivität könnte prinzipiell auch durch eine verstärkte Kopplung des Rezeptors an das G-Protein induziert werden. Für den in dieser Arbeit, z.B. bei der Mutante ET_A-6PD, gesehenen Anstieg der PLC-Aktivität (Abb. 3-10) ist diese Möglichkeit jedoch auszuschließen. Es handelte sich um eine durch fehlende Phosphorylierungsstellen gestörte Desensibilisierung, die beim wildtypischen Rezeptor intakt war und durch die Kinaseaktivität endogen exprimierter GRK2 vermittelt wurde. Dies wurde durch Experimente belegt, in welchen HEK 293-Zellen ET_A-Rezeptoren und GRK2 koexprimierten (Abb. 3-14 B): Der Vergleich der Inhibition der ET_A-WT-vermittelten PLC-Aktivität durch GRK2-D110 und GRK2-D110A/K220R macht den Einfluss der GRK2-vermittelten Phosphorylierung auf die Signalinhibition deutlich. Die katalytisch aktive GRK2-Mutante (GRK2-D110A) inhibierte das ET_A-WT-Signal um etwa 45 %, während die Doppelmutante ohne Kinaseaktivität (GRK2-D110A/K220R) hier keinen signifikanten Einfluss ausübte. Auf die ohnehin phosphorylierungsunabhängige Inhibition des ET_A-6PD-Signals hatte die Mutation K220R jedoch keine Auswirkung. Zusätzlich zu der Desensibilisierung durch die endogene GRK2 führte die Kinaseaktivität der heterolog exprimierten GRK2-D110A beim wildtypischen Rezeptor also zu einer weiteren Inhibition der PLC-Aktivität, hatte jedoch keinen Einfluss auf die ET_A-6PD-vermittelte PLC-Aktivität. Der Unterschied im Signal von ET_A-WT und ET_A-6PD in Abb. 3-10 beruhte folglich auf der Kinaseaktivität von GRK2 und nicht auf einer verstärkten G-Protein-Kopplung des phosphorylierungsdefizienten Rezeptors.

Bei den oben genannten Experimenten wurde eine GRK2-Mutante verwendet, die katalytisch inaktiv war. Dies wurde durch die Punktmutation K220R erreicht. GRK2-K220R wird oftmals eingesetzt, um zu prüfen, ob eine Rezeptor-Phosphorylierung an der Desensibilisierung von GPCRs beteiligt ist. So konnte durch Verwendung dieser GRK2-Mutante für den α_{1B} -adrenergen Rezeptor [255], den Angiotensin II Typ 1A-Rezeptor [256], den δ opioiden Rezeptor [257] und den Calzitonin-Rezeptor [258] eine phosphorylierungsabhängige Inhibition des Signals nachgewiesen werden. Das Signal des Parathyroidhormon-Rezeptors [259], des Follikelstimulierendes Hormon (FSH)-Rezeptors [260], des Thyrotropin-Rezeptors [102], des D₂ Dopamin-Rezeptors [155,261] und des Histamin H₂-Rezeptors [105] hingegen wird auch durch die katalytisch inaktive Mutante GRK2-K220R inhibiert. Die Desensibilisierung dieser GPCRs ist demnach phosphorylierungsunabhängig.

4.2.3 Hinweise durch einen GRK2-Knockdown

Das Vorhandensein einer phosphorylierungsabhängigen Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors, welches durch eine heterologe Expression von GRK2-K220R nachgewiesen wurde (Abb. 3-14), konnte weiterhin durch den *Knockdown* von endogenem GRK2

bestätigt werden (Abb. 3-15). Die endogene Expression von GRK2 in HEK 293-Zellen wurde in dieser Arbeit (Abb. 3-14 A und 3-15 B) sowie an anderer Stelle [93] belegt. Das Signal der Mutante ET_A-6PD ließ sich durch den *Knockdown* zwar erhöhen, allerdings nicht in dem Ausmaß wie das wildtypische Signal. Für die Signalerhöhung der Mutante ET_A-6PD war die Beeinträchtigung von phosphorylierungsunabhängigen Desensibilisierungsmechanismen verantwortlich (siehe auch Kapitel 4.5). Da beim wildtypischen Rezeptor durch den *Knockdown* zusätzlich die phosphorylierungsabhängige Desensibilisierung gehemmt wurde, fiel hier die Signalerhöhung verstärkt aus.

Trotz der effektiveren Steigerung des wildtypischen Signals gegenüber dem Signal der Mutante ET_A-6PD ließ sich die IP₁-Akkumulation beider Rezeptoren durch den *Knockdown* nicht vollständig angleichen. Die ET_A-6PD-vermittelte PLC-Aktivität blieb gegenüber der durch den Wildtyp induzierten PLC-Aktivität erhöht (1.481 ± 212 gegenüber 961 ± 189 nM IP₁). Eine Erklärung für die Diskrepanz beider Signale könnte in dem unvollständigen *Knockdown* liegen. 12 % des GRK2-Proteins blieben trotz GRK2-*Knockdown* erhalten (Abb. 3-15 A). Die Kinaseaktivität dieser verbliebenen endogenen GRK2 beeinflusste lediglich das Signal des wildtypischen Rezeptors.

4.2.4 Hinweise aus der Imitierung der Rezeptor-Phosphorylierung

Durch die Verwendung der Mutante ET_A-6E mit sechs durch Glu-Reste ersetzten Ser/Thr-Resten sollte eine Rezeptor-Phosphorylierung imitiert werden, um zu zeigen, dass das erhöhte ET_A-6PD-Signal nicht durch die fehlenden Ser/Thr-Reste an sich, sondern durch die hieraus resultierende Phosphorylierungsdefizienz ausgelöst wurde. Bei einer bestmöglichen Imitierung des phosphorylierten Rezeptors sind eine konstitutive Desensibilisierung und daher ein im Vergleich zum Wildtyp reduziertes Signal zu erwarten. Ein solches Verhalten konnte beim Leukotrien B₄-Rezeptor 1 beobachtet werden. Hier wurde durch einen Austausch von Phosphorylierungsstellen durch Asp/Glu-Reste eine reduzierte Antwort auf eine Leukotrien B₄-Stimulation erzielt [134].

Tatsächlich konnte mit der Imitierung der ET_A-Rezeptor-Phosphorylierung in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das ET-1-induzierte Signal nicht mehr in dem Maße anstieg wie bei der Mutante ET_A-6PD (Abb. 3-13). Die negative Ladung im C-Terminus der ET_A-6E-Mutante glich also die Phosphorylierungsdefizienz von ET_A-6PD zum Teil wieder aus. Dennoch wurde das Signal durch die eingefügten einfach negativ geladenen Aminosäuren nicht unter das wildtypische Niveau abgesenkt, sondern es wurde eine teilweise reduzierte Desensibilisierung festgestellt. Dies zeigt, dass die eingebrachten negativen Ladungen nicht ausreichten, um eine Phosphorylierung mit je doppelter negativer Ladung vollwertig zu imitieren. Dadurch war unter Umständen eine für die phosphorylierungsabhängige Desensibilisierung essentielle Arrestinbindung beeinträchtigt bzw. es wurde

eine andere Arrestin-Konformation begünstigt als es beim phosphorylierten wildtypischen Rezeptor der Fall war. Auch beim Rhodopsin war die Substitution zweier für die Arrestinbindung verantwortlicher Phosphorylierungsstellen durch Glu nicht ausreichend, um eine Arrestinbindung zu initiieren [262]. Ebenso war die GRK-vermittelte Desensibilisierung des β_2 -adrenergen Rezeptors durch einen Asp-Austausch von putativen GRK-Phosphorylierungsstellen reduziert [263].

4.3 Mapping der involvierten Phosphorylierungsstellen

Durch die erhöhte PLC-Aktivität der Mutante ET_A-15PD sowie durch heterolog exprimierte GRK2-Mutanten konnte gezeigt werden, dass der ET_A-Rezeptor einer phosphorylierungsabhängigen GRK2-vermittelten Desensibilisierung unterliegt (Kapitel 4.2.). Es gibt jedoch bisher keine Daten über die Lokalisation von GRK2-Phosphorylierungsstellen im ET_A-Rezeptor. In dieser Arbeit wurden die in die Desensibilisierung involvierten Phosphorylierungsstellen ausfindig gemacht. Hierfür wurde, ausgehend von ET_A-15PD, die Anzahl der Substitutionen von Phosphoakzeptor-Aminosäuren schrittweise reduziert und die PLC-Aktivität der resultierenden Mutanten mit dem ET_A-15PD-Signal verglichen.

4.3.1 Untersuchung der Position 184

GRK2 katalysiert die Phosphorylierung von Ser- und Thr-Resten [100]. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass eine Regulation des ET_A-Rezeptors auch über Tyrosinkinasen vermittelt wird, wie es für andere GPCRs gezeigt wurde [264,265]. Für den μ -opioiden Rezeptor wurde eine Beteiligung der Phosphorylierung von Y166 im E/DRY-Motiv an der Desensibilisierung festgestellt [265]. Die beeinträchtigte Desensibilisierung der Mutante ET_A-15PD scheint jedoch nicht durch die Substitution des homologen Tyr an Position 184 gegen Phe verursacht worden zu sein. Darauf wies die PLC-Aktivität der Mutante ET_A-14PD mit intaktem E/DRY-Motiv hin (Abb. 3-10 A). Diese war ebenso wie die PLC-Aktivität der Mutante ET_A-15PD erhöht. Zusätzlich zeigte das Signal des Rezeptors mit der Punktmutation Y184F gegenüber dem wildtypischen Signal keine Erhöhung (Abb. 3-10 B).

Die PLC-Aktivität, die durch die Mutante ET_A-Y184F vermittelt wurde, war sogar signifikant niedriger als die im Wildtyp-Ansatz. Durch den Einsatz der beiden Mutanten ET_A-Y184D und ET_A-Y184E, welche eine Phosphorylierung an Position 184 imitieren sollten, wurde das Signal noch weiter reduziert. Daher kann ausgeschlossen werden, dass eine fehlende Tyr-Phosphorylierung ursächlich für den Rückgang der Aktivität von ET_A-Y184F war. Vielmehr ist anzunehmen, dass das Fehlen des hoch konservierten Y184 für den Verlust der Rezeptoraktivität ausschlaggebend war. Es wurde bereits für viele GPCRs gezeigt, dass eine Mutation des E/DRY-Motivs zu enormen Effizienzverlusten der

Signaltransduktion führen kann [34]. So führte z.B. beim Angiotensin II Typ 1-Rezeptor eine Substitution der ersten beiden Aminosäuren des E/DRY-Tripletts zu einer kompletten Entkopplung vom G-Protein. Auch die Substitution des Tyr hatte bei diesem Rezeptor einen Einfluss auf die PLC-Aktivität [266]. Ein weiteres Beispiel ist der M₁ muskarinische Acetylcholin-Rezeptor, bei dem eine Mutation im E/DRY-Motiv die Wirksamkeit von Acetylcholin um mehr als das Hundertfache reduzierte [30].

Es kann also festgehalten werden, dass Y184 nicht an der phosphorylierungsabhängigen Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors beteiligt war. Daher konnte die Suche nach den in der Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors involvierten Phosphorylierungsstellen auf die Phosphoakzeptor-Aminosäuren reduziert werden, die in der Mutante ET_A-14PD substituiert sind. Da die Eigenschaften des Rezeptors durch die Mutation an Position 184 substanziiell verändert waren, diese Effekte jedoch offensichtlich nicht auf einer Phosphorylierungsdefizienz beruhten, wurde in weiteren Versuchen darauf verzichtet, ET_A-Rezeptor-Mutanten mit einem Aminosäureaustausch an dieser Stelle zu verwenden. Auch bei der Analyse der ET_A-Rezeptor-Internalisierung (Kapitel 4.6) wurde auf die Mutante ET_A-14PD mit intaktem E/DRY-Motiv zurückgegriffen.

4.3.2 Untersuchung von Phosphorylierungsstellen in der dritten intrazellulären Schleife

Bei vielen GPCRs spielt die Phosphorylierung der ICL3 durch GRKs [267–270] sowie durch andere Kinasen [271–278] eine Rolle in der Desensibilisierung. Daher wurde geprüft, ob Mutanten des ET_A-Rezeptors mit fehlenden Phosphorylierungsstellen an den Positionen 289 und 295 in der ICL3 eine Beeinträchtigung der Regulation aufweisen. Für diese beiden Ser-Reste konnte durch Stannard *et al.* [218] mittels Massenspektrometrie eine Phosphorylierung nachgewiesen werden. Außerdem befindet sich T279, eine weitere potentiell phosphorylierbare Aminosäure, in der ICL3. Für diese Aminosäure wurde jedoch keine Phosphorylierung nachgewiesen [218], daher wurde T279 im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Da die PLC-Aktivitäten der beiden Einzelmutanten ET_A-S289A und ET_A-S295A sowie der Doppelmutante ET_A-S289A/S295A keine Auffälligkeit zeigten (Abb. 3-9 C), ist davon auszugehen, dass eine Phosphorylierung der ICL3 nicht in die Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors involviert ist. In Übereinstimmung hiermit war das Signal der Mutante ET_A-12PD ebenso erhöht wie das der Mutanten ET_A-14PD und ET_A-15PD (Abb. 3-9 A). Als Ursache für die gestörte Desensibilisierung blieben fehlende Phosphorylierungsstellen in der C-terminalen Domäne des Rezeptors zu untersuchen.

4.3.3 Untersuchung C-terminaler Phosphorylierungsstellen

Phosphorylierungen in der C-terminalen Domäne sind innerhalb der GPCRs weit verbreitet [279–282]. Auch der ET_A-Rezeptor enthält zwölf C-terminale Phosphorylierungsstellen. Zehn Ser/Thr-Phosphorylierungsstellen befinden sich in der Sequenz, die der Palmitoylierungsstelle folgt, in der CTE. Auf der Suche nach den Phosphorylierungsstellen, deren Abwesenheit bei der Mutante ET_A-12PD zur erhöhten PLC-Aktivität führte, wurden einmal alle C-terminalen (ET_A-11PD) und einmal die zehn in der CTE enthaltenen (ET_A-10PD) Ser/Thr-Reste gemeinsam entfernt. Die beeinträchtigte Desensibilisierung beider Mutanten lässt darauf schließen, dass die in die Desensibilisierung involvierte GRK2-vermittelte Phosphorylierung in der CTE geschieht (Abb. 3-9). Eine Häufung von Ser- und Thr-Resten in der CTE ist vielen GPCRs gemein. Die GRK-vermittelte Phosphorylierung von Ser/Thr-*Clustern* in diesem Bereich ist bei den Klasse B-Rezeptoren für die stabile Arrestin-Interaktion verantwortlich [137,283]. Auch bei Klasse A-Rezeptoren wie dem β_2 -adrenergen Rezeptor [281] und beim Rhodopsin [262] sind in der CTE lokalisierte Phosphorylierungsstellen in die Desensibilisierung eingebunden.

Die Untersuchung einzelner Phosphorylierungsstellen innerhalb der ET_A-Rezeptor-CTE mit Hilfe von Einzelmutanten ergab allerdings, dass keiner dieser zehn Ser/Thr-Reste für die Desensibilisierung des Rezeptors essentiell ist (Abb. 3-10). Eine sequenzielle Rezeptor-Phosphorylierung mit der initialen Phosphorylierung einer bestimmten Stelle ist demnach für die ET_A-Rezeptor-Regulation auszuschließen.

Die Phosphorylierungsstellen in der CTE des ET_A-Rezeptors können einem proximalen und einem distalen Ser/Thr-*Cluster* zugeteilt werden (Abb. 1-4). Das Vorhandensein aller Phosphorylierungsstellen eines der beiden *Cluster* ist für eine physiologische ET_A-Rezeptor-Desensibilisierung ausreichend. Dies ergaben weitere Versuche mit einer Serie von ET_A-Rezeptor-Mutanten, die in der CTE eine kombinierte Substitution von Ser/Thr-Resten gegen Ala-Reste enthielten (Abb. 3-10). Eine funktionelle Redundanz von Phosphorylierungsstellen wurde bereits für andere Rezeptoren beschrieben. So wird die Desensibilisierung und Internalisierung des C5a-Rezeptors durch eine Phosphorylierung an entweder der Position 327, 332, 334 oder 338 vermittelt, wie durch Mutanten mit jeweils nur einer der vier Phosphorylierungsstellen gezeigt werden konnte [284]. Des Weiteren wird die Internalisierung des M₂ muskarinischen Acetylcholin-Rezeptors über die Phosphorylierung eines von zwei redundanten Ser/Thr-*Clustern* eingeleitet [285].

Die Erhöhte Aktivität von Rezeptoren mit kombinierten Substitutionen von Ser/Thr-Resten in beiden *Clustern* wies darauf hin, dass das Vorhandensein mindestens eines kompletten *Clusters* eine Voraussetzung für die physiologische Regulation ist. Alle untersuchten Rezeptoren, bei denen beide *Cluster* gleichzeitig mutiert waren, wiesen eine eingeschränkte Desensibilisierung auf (Tab. 4-1). Bemerkenswerterweise war die Anzahl an verbleibenden Ser/Thr-Resten in der CTE nicht entscheidend. Auch bei nur zwei Ala-

Substitutionen war die phosphorylierungsabhängige Desensibilisierung beeinträchtigt, wenn beide *Cluster* betroffen waren. In dieser Arbeit wurden jedoch nur einige exemplarische Mutanten untersucht. Ein eindeutiger Beleg dafür, dass jede Kombination aus distalen und proximalen Ser/Thr-Substitutionen einen negativen Einfluss auf die phosphorylierungsabhängige Desensibilisierung hat, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erbracht werden. Hierfür wäre eine Vielzahl weiterer Mutanten zu untersuchen.

Tab. 4-1. Übersicht der Desensibilisierung phosphorylierungsdefizienter ET_A-Rezeptor-Mutanten. Gezeigt sind phosphorylierbare Ser (S)- und Thr (T)-Reste im proximalen (prox.) und distalen Bereich der CTE entsprechend der Reihenfolge in der Primärsequenz des ET_A-Rezeptors. Dazwischenliegende Aminosäuren sind nicht aufgeführt. Durch Ala substituierte Aminosäuren sind mit einem Punkt als Platzhalter gekennzeichnet. Intakte Ser/Thr-Cluster sind unterstrichen. P, Phosphorylierungsstellen in der CTE; Mut, Anzahl an Mutationen in der CTE; Des, Desensibilisierung; ++, Desensibilisierung ist nicht eingeschränkt; +, Zwischenformen; -, keine phosphorylierungsabhängige Desensibilisierung.

Rezeptor	P, prox.	P, distal	Mut	Des
ET _A -WT	<u>SSTSTS</u>	<u>TSSS</u>	0	++
ET _A -S391A	.STSTS	<u>TSSS</u>	1	++
ET _A -S393A	S.TSTS	<u>TSSS</u>	1	++
ET _A -T396A	SS.STS	<u>TSSS</u>	1	++
ET _A -S397A	SST.TS	<u>TSSS</u>	1	++
ET _A -T403A	SSTS.S	<u>TSSS</u>	1	++
ET _A -S404A	SSTST.	<u>TSSS</u>	1	++
ET _A -PDZPD	<u>TSSS</u>	6	++
ET _A -T417A	<u>SSTSTS</u>	.SSS	1	++
ET _A -S420A	<u>SSTSTS</u>	T.SS	1	++
ET _A -S421A	<u>SSTSTS</u>	TS.S	1	++
ET _A -S425A	<u>SSTSTS</u>	TSS.	1	++
ET _A -2PD	<u>SSTSTS</u>	TS..	2	++
ET _A -3PD	<u>SSTSTS</u>	T...	3	++
ET _A -4PD	<u>SSTSTS</u>	4	++
ET _A -S404A/T417A	SSTST.	.SSS	2	+
ET _A -S404A/S420A	SSTST.	T.SS	2	+
ET _A -S404A/S421A	SSTST.	TS.S	2	+
ET _A -S404A/S425A	SSTST.	TSS.	2	+
ET _A -5PD-A421S	SSTST.	..S.	4	+
ET _A -4PD-S391A	.STSTS	5	+
ET _A -4PD-S393A	S.TSTS	5	+
ET _A -4PD-T396A	SS.STS	5	+
ET _A -4PD-S397A	SST.TS	5	+
ET _A -4PD-T403A	SSTS.S	5	+
ET _A -5PD	SSTST.	5	+
ET _A -6PD	SSTS..	6	-
ET _A -7PD	SST...	7	-
ET _A -8PD	SS....	8	-
ET _A -11PD-A403T/A404STS	8	-
ET _A -9PD	S.....	9	-
ET _A -11PD-A404SS	9	-
ET _A -10PD	10	-

In den meisten GPCRs liegen die GRK-Phosphorylierungsstellen in *Clustern* vor [128]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die phosphorylierungsabhängige Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors nur bei der Anwesenheit eines vollständigen *Clusters* unbeeinträchtigt ist. Vermutlich muss ein komplettes *Cluster* phosphoryliert werden, damit β -Arrestine in der richtigen Art und Weise binden. Eine Mehrfach-Phosphorylierung ist auch eine Voraussetzung für die Arrestin-Bindung und Desensibilisierung beim Rhodopsin [127,286–288]. Interessanterweise befinden sich im Phosphatsensor von Arrestin mehrere positive Ladungen [128,289]. Dieses *Cluster* positiver Ladungen wechselwirkt bei einer stabilen Rezeptor-Arrestin-Interaktion mit dem *Cluster* an negativen Ladungen in der C-terminalen GPCR-Domäne [137].

Ob in der phosphorylierungsabhängigen Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors tatsächlich Arrestine involviert sind, ist jedoch unklar. Zur Aufklärung der Interaktion zwischen ET_A-Rezeptor und β -Arrestinen sollten weitere Experimente beitragen, die in Kapitel 4.4 diskutiert werden.

Zusammenfassend kann folgender Mechanismus für die phosphorylierungsabhängige Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors vorgeschlagen werden: Die vollständige Phosphorylierung entweder des proximalen (sechs Phosphorylierungen) oder des distalen Ser/Thr-*Clusters* (vier Phosphorylierungen) in der CTE durch GRK2 trägt - vermutlich durch die Rekrutierung von Arrestin - zu einer eigenständigen Komponente der Regulation des ET_A-Rezeptors bei.

4.4 Interaktion des ET_A-Rezeptors mit β -Arrestin

Die Agonisten-induzierte Phosphorylierung von GPCRs führt klassischerweise über eine Rekrutierung von β -Arrestinen zur Desensibilisierung des Rezeptors. Die Phosphorylierung des N-Formyl-Peptid-Rezeptors inhibiert die G-Protein-Kopplung jedoch unabhängig von β -Arrestinen [290]. Ob bei der im vorigen Kapitel diskutierten phosphorylierungsabhängigen Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors β -Arrestine beteiligt sind, sollte durch die Analyse der β -Arrestin 2-YFP Translokation untersucht werden. Bei diesem Versuch wird die ET-1-induzierte Translokation von β -Arrestin 2-YFP vom Zytosol zum in der Plasmamembran befindlichen ET_A-Rezeptor im Fluoreszenzmikroskop beobachtet.

In dieser Arbeit konnte keine Translokation von β -Arrestin 2-YFP nachgewiesen werden (Abb. 3-17). An anderen Stellen wurde jedoch bereits eine ET_A-Rezeptor- β -Arrestin 2-Interaktion durch die ET-1-induzierte Translokation von β -Arrestin 2-GFP zur Plasmamembran belegt [136,138,142]. Obwohl in einer Studie von Kara *et al.* eine Ko-Immünpräzipitation des FSH-Rezeptors mit endogenem Arrestin in HEK 293-Zellen erfolgreich

war, gelang es den Autoren leider ebenfalls nicht, die Arrestin-GFP-Rekrutierung zum aktivierten FSH-Rezeptor zu visualisieren [282].

Ein Grund, warum in dieser Arbeit die β -Arrestin 2-YFP-Translokation zum ET_A-Rezeptor nicht gesehen wurde, könnte in dem Verhältnis der Expressionsstärke beider Proteine gelegen haben. Bei der Bindung von Arrestin an GPCRs handelt es sich um eine 1:1-Stöchiometrie [291]. Bei einer starken zytosolischen β -Arrestin 2-YFP-Expression im Zytosol kann eine Rekrutierung zum schwach auf der Zelloberfläche exprimierten Rezeptor nicht detektiert werden, da die im Zytosol verbleibende Fluoreszenz das Signal an der Plasmamembran überstrahlt. Weitere Versuche sind also nötig, um die Expressionsstärke beider Proteine anzugleichen.

Bei in HEK 293-Zellen überexprimierten GPCRs ist eine geringe Oberflächenexpression bereits mehrfach beobachtet worden (persönliche Mitteilung durch Prof. Martin Lohse, Würzburg). Das Fluoreszenzsignal des mRuby-gekoppelten ET_A-Rezeptors stammte zu einem großen Teil aus intrazellulären Vesikeln (Abb. 3-16 A). Hierbei handelte es sich entweder um endozytierte oder um neusynthetisierte Rezeptoren, die sich noch im komplexen Faltungs- und Transportmechanismus befanden. Um letzteres zu überprüfen, wurde die Proteinbiosynthese mit dem Translationshemmer Cycloheximid gehemmt (Abb. 3-16 B). Durch Bindung eines membrandurchgängigen Antagonisten an den noch ungefalteten und/oder partiell gefalteten neusynthetisierten Rezeptor wurde außerdem versucht, den Faltungsprozess zu unterstützen (Abb. 3-16 C-D). Offensichtlich handelte es sich bei dem beobachteten intrazellulären mRuby-Signal nicht um neusynthetisierte Rezeptoren. Die Vesikelbildung ließ sich durch die Hemmung der Proteinbiosynthese nicht beeinflussen. Dementsprechend hatte auch der Einsatz der beiden hydrophoben Antagonisten BQ123 und Bosentan keinen Effekt auf die in Vesikeln lokalisierte Fluoreszenz. Diese dürfte also von endozytierten Rezeptoren stammen. Zukünftige Experimente mit einer spezifischen Färbung von Zell-Organellen wie z.B. den frühen und späten Endosomen können hier zur weiteren Klärung beitragen.

Durch eine Rekrutierung von β -Arrestin 2-GFP zur Plasmamembran konnte in früheren Studien zwar die ET-1-induzierte ET_A-Rezeptor- β -Arrestin 2-Interaktion belegt werden, dies konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht reproduziert werden. Daher kamen für dieses Experiment auch keine weiteren, mutierten Rezeptoren zum Einsatz. Der Einfluss der Phosphorylierungsdefizienz des ET_A-Rezeptors auf die β -Arrestin-Bindung konnte also nicht untersucht werden.

4.5 Phosphorylierungsunabhängige Desensibilisierung

Eine phosphorylierungsunabhängige GRK2-vermittelte Signalinhibition ist entweder auf die selektive Regulation von $G\alpha$ durch die RH-Domäne oder auf eine direkte Rezeptor-GRK2-Interaktion zurückzuführen [105]. Wie in Kapitel 3.6.4 beschrieben, ließ sich die GRK2-vermittelte phosphorylierungsabhängige Desensibilisierung des ET_A -Rezeptors durch die heterologe Expression von GRK2-D110A belegen, welche das Signal des wildtypischen aber nicht des phosphorylierungsdefizienten Rezeptors inhibierte. Eine weitere Inhibition sowohl des ET_A -WT- als auch des ET_A -6PD-vermittelten Signals wurde durch die heterologe Expression der wildtypischen GRK2 erreicht (Abb. 3-14 B). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass das Signal des ET_A -Rezeptors auch über die Bindung der RH-Domäne an $G\alpha_q$ reguliert wird.

Die Transfektion mit der fünffachen Menge an GRK2-kodierender Plasmid-DNA führte offensichtlich zu einer stärkeren GRK2-Expression, da hier die durch GRK2 induzierte Inhibition aller Signale verstärkt war. Die verstärkte GRK2-Expression deutet auf einen dritten, unbekanntem Desensibilisierungsmechanismus hin, der zur Inhibition des ET_A -WT- und ET_A -6PD-vermittelten Signals durch die Expression von GRK2-D110A/K220R bzw. GRK2-D110A führte (Abb. 3-14 C). Beides ist weder durch eine Rezeptor-Phosphorylierung noch durch eine $G\alpha_q$ -Bindung zu begründen. Für diesen Effekt scheint eine hohe GRK2-Expression erforderlich zu sein. Ähnliches wurde bei der Inhibition des α_{1B} -adrenergen Signals durch eine katalytisch inaktive GRK2-Mutante beobachtet. Mit 0,2 μ g GRK2-K220R-Plasmid-DNA pro 1 Mio. Zellen konnte keine Signalinhibition einer phosphorylierungsdefizienten Mutante des α_{1B} -adrenergen Rezeptors beobachtet werden. Eine phosphorylierungsunabhängige Desensibilisierung wurde jedoch beim Einsatz der dreifachen Plasmidmenge nachweisbar [255]. Bei dieser dritten regulatorischen Komponente der ET_A -Rezeptor-Signaltransduktion handelt es sich sehr wahrscheinlich um eine direkte Bindung der Kinase an den Rezeptor, wodurch dieser sterisch inhibiert wird. Eine ET_A -Rezeptor-GRK2-Assoziation wurde bereits durch Immunpräzipitation beider in HEK 293-Zellen rekombinant überexprimierter Proteine nachgewiesen [114]. Auch für den FSH-Rezeptor [260] und den D_2 Dopamin-Rezeptor [261] wurde eine direkte Assoziation zwischen GRK2 und Rezeptor als Regulationsmechanismus vorgeschlagen.

Die Signalverstärkung von ET_A -WT und ET_A -6PD, die durch einen *Knockdown* der endogenen GRK2 erzielt wurde, ist ein weiterer Beleg für das Nebeneinander von sowohl phosphorylierungsunabhängiger als auch -abhängiger Desensibilisierung. Erstere drückte sich durch die Signalerhöhung der Phosphorylierungsdefizienten Mutante ET_A -6PD aus. Der Fakt, dass das Signal des wildtypischen Rezeptors durch den *Knockdown* in größerem Maße erhöht wurde, zeigt, dass darüber hinaus ein weiterer Mechanismus existiert, der auf der Phosphorylierung des ET_A -Rezeptors beruht.

4.6 Internalisierung des ET_A-Rezeptors

Für die Analyse der Rezeptor-Internalisierung wurden ET_A-Rezeptor-Konstrukte verwendet, die zur Kontrolle der Rezeptor-Expression C-terminal mit einem fluoreszierenden Protein fusioniert waren. Der Fluoreszenztag hat keinen Einfluss auf die Internalisierung [221]. Es konnte gezeigt werden, dass die Internalisierung des ET_A-Rezeptors in HEK 293-Zellen unabhängig von den Phosphorylierungsstellen geschieht. Ähnliches wurde bereits mit einer verkürzten ET_A-Rezeptor-Mutante in CHO-Zellen festgestellt [232]. In dieser Studie beeinflusste das Fehlen der letzten 38 Aminosäuren (inklusive der CTE mit ihren zehn Phosphorylierungsstellen) die Rezeptor-Internalisierung nicht. Übereinstimmend hiermit wurde in CHO-Zellen ebenso kein Einfluss von GRK2 auf die Internalisierungskinetik festgestellt [221].

Eine Rezeptor-Arrestin-Interaktion konnte aus experimentellen Gründen zwar in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, es wurde aber in früheren Studien gezeigt, dass für die Internalisierung von GPCRs eine β -Arrestin-Bindung essentiell ist [77,292,293]. Insbesondere für den ET_A-Rezeptor ist eine Arrestin-abhängige Internalisierung in CHO-Zellen [221] und in HEK 293T-Zellen [142] belegt. Da die Internalisierung des ET_A-Rezeptors, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte (Abb. 3-19), phosphorylierungsunabhängig verläuft, liegt eine phosphorylierungsunabhängige Rezeptor-Arrestin-Interaktion nahe.

Es wurde lange angenommen, dass die Rezeptor-Phosphorylierung eine Voraussetzung für die Arrestin-Bindung ist [294]. In diesem Zusammenhang konnte z.B. anhand einer phosphorylierungsdefizienten Mutante des purinergen Rezeptors P2Y₁ in HEK 293-Zellen gezeigt werden, dass sowohl die β -Arrestin-Translokation als auch die Rezeptor-Internalisierung unterbunden wurde [295]. Auch beim β_2 -adrenergen Rezeptor wurde durch das Entfernen von Ser-Resten die Internalisierung zusammen mit der β -Arrestin-Translokation inhibiert [263].

Für eine Vielzahl von Rezeptoren wurde allerdings gezeigt, dass eine Phosphorylierung nicht essentiell für die β -Arrestin-Interaktion ist [83,131,155,283,296,297]. β -Arrestin kann über den Aktivierungs-Sensor auch mit dem nicht-phosphorylierten Rezeptor wechselwirken [128]. Bei der β -Arrestin-Wechselwirkung geht es jedoch nicht nur darum, ob eine Bindung stattfindet oder nicht. Die β -Arrestin-Bindung ist differenziell zu betrachten [298]. Dies wurde z.B. mit dem Protease-aktivierten Rezeptor 2 gezeigt. Dieser Rezeptor geht nach der Aktivierung eine stabile Bindung mit β -Arrestinen ein, welche auch nach der Internalisierung erhalten bleibt [299]. Durch eine Deletion des C-Terminus wurde diese stabile β -Arrestin-Interaktion aufgehoben, wodurch auch die ERK2-Aktivierung beeinträchtigt war [283]. Die β -Arrestin-vermittelte Rezeptor-Internalisierung

hingegen blieb unbeeinträchtigt, da hierfür vermutlich eine schwächere β -Arrestin-Interaktion benötigt ist, die trotz der Trunkierung gegeben war. Diese schwache β -Arrestin-Interaktion resultierte vermutlich aus einer verbleibenden Wechselwirkung mit den intrazellulären Schleifen.

Auch beim ET_A-Rezeptor scheint eine β -Arrestin-Interaktion trotz der Substitution von Phosphorylierungsstellen erhalten zu bleiben und die Rezeptor-Internalisierung zu vermitteln. Diese Wechselwirkung ist jedoch vermutlich schwächer als beim phosphorylierten wildtypischen Rezeptor und ist nicht in der Lage, den Rezeptor vom G-Protein zu entkoppeln. Die Internalisierung und die phosphorylierungsabhängige Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors könnten also unterschiedliche Anforderungen an eine Rezeptor- β -Arrestin-Interaktion haben. Anhand von phosphorylierungsdefizienten Mutanten des CC Chemokin-Rezeptor 5 [300], des N-Formylpeptid-Rezeptors [301] sowie des Somatostatin Subtyp 2A-Rezeptors [302] wurde bereits gezeigt, dass die beiden Prozesse Internalisierung und Desensibilisierung auch bei diesen GPCRs nicht unbedingt korrelieren und dass das klassische Paradigma, welches vor allem für den β_2 -adrenergen Rezeptor beschrieben wurde, nicht immer anzuwenden ist.² Auch für den Leukotrien B₄-Rezeptor besteht keine Korrelation beider Prozesse. Dessen Desensibilisierung wurde durch das Entfernen C-terminaler Phosphorylierungsstellen inhibiert, während die Rezeptor-Internalisierung unbeeinträchtigt war [134]. Dies entspricht der Diskrepanz, die zwischen der Desensibilisierung und der Internalisierung des ET_A-Rezeptors zu beobachten war.

Wie oben beschrieben, ist eine Voraussetzung für dieses Verhalten vermutlich die Komplexität der Rezeptor- β -Arrestin-Interaktion. Die Flexibilität von β -Arrestinen wird auch im Falle Liganden-abhängiger Signalmuster deutlich. Hier können verschiedene *Arrestin-biased* Agonisten durch Phosphorylierung an unterschiedlichen Stellen des Rezeptors verschiedene Konformationen des multifunktionellen Adapterproteins Arrestin und somit verschiedene funktionelle Konsequenzen hervorrufen [148,303,304]. Auch wurde beobachtet, dass eine Rezeptor-Phosphorylierung des Angiotensin II Typ 1A-Rezeptors [305] und des V2 Vasopressin-Rezeptors [306] durch GRK2 und GRK3 andere funktionelle Konsequenzen hat, als eine Phosphorylierung durch GRK5 oder GRK6. Letztere ist nicht in die Desensibilisierung involviert, sondern induziert eine β -Arrestin Konformation, die eine ERK1/2-Aktivierung zur Folge hat [149].

² Beim β_2 -adrenergen Rezeptor ist sowohl für die Desensibilisierung als auch für die Internalisierung eine Phosphorylierung obligatorisch. Beides wurde durch das Entfernen von Ser-Resten inhibiert [263].

4.7 Fazit

In dieser Arbeit konnte für den ET_A-Rezeptor ein Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von GRK2-Phosphorylierungsstellen in der CTE und der Fähigkeit zur Rezeptor-Desensibilisierung hergestellt werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch phosphorylierungsunabhängige Mechanismen zur Regulation des Endothelin-Signals beitragen und in die Rezeptor-Internalisierung involviert sind.

Die Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors ist ein vielschichtiger Vorgang. Drei verschiedene Funktionen der GRK2 sind hierin involviert (Abb. 4-1): Die Kinaseaktivität führt über eine Rezeptor-Phosphorylierung und sehr wahrscheinlich über eine Bindung von β -Arrestin zur phosphorylierungsabhängigen Desensibilisierung. Die phosphorylierungsunabhängige Desensibilisierung wird durch eine Interaktion der RH-Domäne mit $G\alpha_q$ und durch einen zweiten Mechanismus, der vermutlich eine direkte Rezeptor-

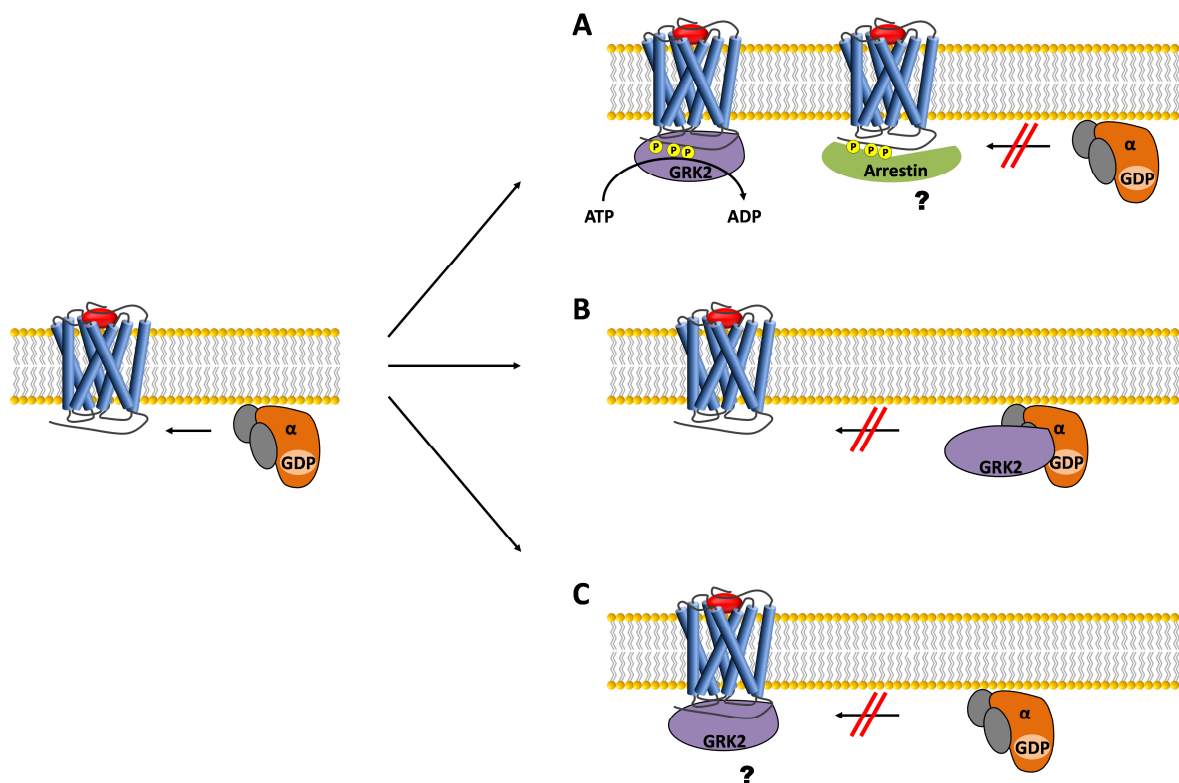


Abb. 4-1. Postulierte Phosphorylierungsabhängige und -unabhängige GRK2-vermittelte Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors. Der ET_A-Rezeptor kann auf vielfältige Weise reguliert werden. A) Nach der vollständigen Phosphorylierung mindestens eines Ser/Thr-Clusters in der CTE durch GRK2 wird der Rezeptor in einem nächsten Schritt (wahrscheinlich durch die Bindung von β -Arrestin) vom G-Protein entkoppelt. B) GRK2 interagiert über die RH-Domäne mit $G\alpha_q$ wodurch dessen Kopplung an den Rezeptor inhibiert wird. C) Der dritte Mechanismus beinhaltet vermutlich die direkte Bindung der Kinase an den Rezeptor und somit eine sterische Blockade für die G-Protein-Interaktion.

Assoziation beinhaltet, realisiert. Die Komplexität der ET_A-Rezeptor-Regulation mit einer Beteiligung verschiedener, voneinander unabhängiger Desensibilisierungsmechanismen könnte für eine Zelltyp-spezifische Feinabstimmung des Signals von Bedeutung sein. Deren Aufklärung könnte zur Entwicklung von gewebspezifisch wirkenden Pharmaka, z.B. für die Behandlung der pulmonaren Hypertonie beitragen.

Aus Studien vor allem an Rhodopsin und dem β_2 -adrenergen Rezeptor wurde für GPCRs ursprünglich ein Modell entwickelt, welches die Regulation eines G-Protein-vermittelten Signals durch GRK-Phosphorylierung und Arrestin-Bindung beinhaltet (Abb. 1-3). In letzter Zeit finden sich in der Literatur jedoch immer häufiger Begriffe wie G-Protein-unabhängige Signaltransduktion [145], funktionelle Selektivität [27], Zelltyp-spezifische [149] und Agonisten-spezifische [21] Phosphorylierungsmuster, Agonisten-selektive Desensibilisierung [307], phosphorylierungsunabhängige Desensibilisierung [73], phosphorylierungsunabhängige Rezeptor-Arrestin-Interaktion [297] und phosphorylierungsunabhängige Internalisierung [308], wodurch die Erforschung dieser Rezeptoren spannend bleibt. Der ET_A-Rezeptor (dessen Regulation gleich mehrere unabhängige Mechanismen beinhaltet) ist ein ausgezeichnetes Beispiel für die Diversität innerhalb der GPCR-Familie und dafür, dass sich Mechanismen der Signaltransduktion und der Regulation von GPCRs nicht auf einfache Paradigmen beschränken lassen.

4.8 Ausblick

4.8.1 Untersuchung der ET_A-Rezeptor-Desensibilisierung in Echtzeit

Schlussfolgerungen zur Desensibilisierung des ET_A-Rezeptors basierten in dieser Arbeit auf retrospektiven Analysen der G-Protein-Aktivierung. HEK 293-Zellen wurden nach der ET-1-Stimulation lysiert und deren *Second Messenger*-Produktion bestimmt. Durch eine Verifizierung dieser Experimente anhand der Untersuchung der Rezeptor-Aktivität in Echtzeit ließe sich deren Aussagekraft erhöhen.

Mit FRET-basierten Experimenten lassen sich Aktivierung und Signaltransduktion von GPCRs in Echtzeit untersuchen [60]. Eine direkte Methode zur Ermittlung der G-Protein-Kopplung eines Rezeptors besteht z.B. darin, die Aktivierung des heterotrimeren G-Proteins zu untersuchen. Dies kann realisiert werden, indem G α mit einem und G $\beta\gamma$ mit einem zweiten FRET-Partner gekoppelt werden [309–311]. Durch die Dissoziation des heterotrimeren G-Proteins nach der Aktivierung durch den Rezeptor nimmt das FRET-Signal ab. Bei Rezeptoren mit gestörter Desensibilisierung wäre zu erwarten, dass diese Abnahme des FRET-Signals mehr ausgeprägt ist und/oder länger anhält.

4.8.2 Untersuchung der Rezeptor- β -Arrestin-Interaktion

Ein Schlüsselereignis im Mechanismus der klassischen phosphorylierungsabhängigen Desensibilisierung ist die Bindung von β -Arrestin an den Rezeptor. Der Vergleich der β -Arrestin-Bindung an den wildtypischen und an einen phosphorylierungsdefizienten ET_A-Rezeptor könnte daher einen wichtigen Beitrag in der Aufklärung der phosphorylierungsabhängigen Desensibilisierung leisten. Deshalb wurde in dieser Arbeit versucht, die Translokation von β -Arrestin 2-YFP zum auf der Plasmamembran befindlichen, stimulierten ET_A-Rezeptor nachzuweisen. Dies gelang jedoch vermutlich aufgrund der geringen Rezeptor-Oberflächenexpression nicht.

In zukünftigen Experimenten könnte daher versucht werden, die Transfektion von Rezeptor und β -Arrestin zu optimieren, um deren Expressionsstärken besser aufeinander abzustimmen. Denkbar wäre z.B. eine Transfektion durch Elektroporation. Neben der angesprochenen Möglichkeit einer mikroskopischen Visualisierung fluoreszenz-markierter β -Arrestine [134,283,296,298] kann die Translokation von β -Arrestinen zur Plasmamembran auch durch eine Trennung der Membranfraktion durch Dichtegradientenzentrifugation nachgewiesen werden [284]. Des Weiteren könnten Methoden wie Ko-Immünpräzipitation [132,282,298,312] *Pulldown*-Experimente [132], Biacore-Messungen [132] FRET-Experimente [60,313] oder Split-YFP-Experimente zur Aufklärung der Rezeptor- β -Arrestin-Interaktion beitragen. Da β -Arrestine als Signalmoleküle fungieren und die Aktivierung von MAPK veranlassen, kann auch eine Analyse der ET-1-induzierten ERK1/2-Aktivierung mit pERK1/2-spezifischen Antikörpern zur Aufklärung der β -Arrestin-Involvierung beitragen. Für diese Experimente wäre eine Unterbindung der G-Protein-vermittelten ERK1/2-Aktivierung [314–317] z.B. durch den Einsatz eines PKC-Inhibitors wie Ro-31-8425 notwendig [146], damit lediglich die β -Arrestin-vermittelte ERK1/2-Aktivierung erfasst wird.

4.8.3 Trafficking des ET_A-Rezeptors

Die Internalisierung des ET_A-Rezeptors wurde in dieser Arbeit *semiquantitativ* mit Hilfe eines fluoreszierenden Agonisten im konfokalen *Laser Scanning*-Mikroskop untersucht. Um die Ergebnisse zu bestätigen, können weitere Methoden zur Analyse der Internalisierungskinetik von GPCRs angewendet werden. Dies kann z.B. durch die Bindung eines Radioliganden an Zellen geschehen [221,233]. Bei dieser Methode wird der Ligand nach einer variablen Inkubationszeit durch eine Säurebehandlung von der Zelloberfläche entfernt. Die verbleibende Radioaktivität resultiert aus der γ -Aktivität des an internalisierte Rezeptoren gebundenen Liganden.

Um den Internalisierungsmechanismus aufzuklären, können pharmakologische Inhibitoren der Caveolin- und der Clathrin-vermittelten Endozytose wie Nystatin und

Filipin bzw. Chlorpromazin eingesetzt werden [142,229]. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, die ET_A -Rezeptor-enthaltenen Vesikel mit Hilfe kommerziell erhältlicher Fluorophore, die unterschiedliche Zellkompartimente markieren, zu identifizieren, um das weitere Schicksal internalisierter Rezeptoren untersuchen und vergleichen zu können.

Literaturverzeichnis

1. Pawlak M, Lefebvre P, Staels B: General molecular biology and architecture of nuclear receptors. *Curr Top Med Chem* **2012**;12:486-504.
2. Isacoff EY, Jan LY, Minor DL: Conduits of life's spark: a perspective on ion channel research since the birth of neuron. *Neuron* **2013**;80:658-674.
3. Lemmon MA, Schlessinger J: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **2010**;141:1117-1134.
4. Oldham WM, Hamm HE: Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**;9:60-71.
5. Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin L, Schiöth HB: The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol* **2003**;63:1256-1272.
6. Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ: Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* **2002**;3:639-650.
7. Cangiano L, Dell'Orco D: Detecting single photons: a supramolecular matter? *FEBS Lett.* **2013**;587:1-4.
8. Mederos y Schnitzler M, Storch U, Gudermann T: AT1 receptors as mechanosensors. *Curr Opin Pharmacol* **2011**;11:112-116.
9. Lundstrom K: An Overview on GPCRs and Drug Discovery: Structure-Based Drug Design and Structural Biology on GPCRs. *Methods in Molecular Biology* **2009**:51-66.
10. Cheng Z, Garvin D, Paguio A, Stecha P, Wood K, Fan F: Luciferase Reporter Assay System for Deciphering GPCR Pathways. *Curr Chem Genomics* **2010**;4:84-91.
11. Schiöth HB, Fredriksson R: The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2005**;142:94-101.
12. Kristiansen K: Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol. Ther* **2004**;103:21-80.
13. Tota MR, Strader CD: Characterization of the binding domain of the beta-adrenergic receptor with the fluorescent antagonist carazolol. Evidence for a buried ligand binding site. *J. Biol. Chem.* **1990**;265:16891-16897.
14. Schwartz TW, Rosenkilde MM: Is there a 'lock' for all agonist 'keys' in 7TM receptors? *Trends Pharmacol. Sci.* **1996**;17:213-216.
15. Gether U: Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* **2000**;21:90-113.
16. Szkudlinski MW, Fremont V, Ronin C, Weintraub BD: Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiol. Rev.* **2002**;82:473-502.
17. Vischer HF, Granneman JCM, Noordam MJ, Mosselman S, Bogerd J: Ligand selectivity of gonadotropin receptors. Role of the beta-strands of extracellular leucine-rich repeats 3 and 6 of the human luteinizing hormone receptor. *J. Biol. Chem.* **2003**;278:15505-15513.
18. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR: Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* **1991**;64:1057-1068.
19. Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R: Proteinase-activated receptors. *Pharmacol. Rev.* **2001**;53:245-282.
20. Trzaskowski B, Latek D, Yuan S, Ghoshdastider U, Debinski A, Filipek S: Action of molecular switches in GPCRs--theoretical and experimental studies. *Curr. Med. Chem.* **2012**;19:1090-1109.
21. Liggett SB: Phosphorylation barcoding as a mechanism of directing GPCR signaling. *Sci Signal* **2011**;4:pe36.
22. Kenakin T: Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation. *FASEB J.* **2001**;15:598-611.
23. Warne T, Moukhametzianov R, Baker JG, Nehmé R, Edwards PC, Leslie AGW, Schertler GFX, Tate CG: The structural basis for agonist and partial agonist action on a $\beta(1)$ -adrenergic receptor. *Nature* **2011**;469:241-244.
24. Li JH, Hamdan FF, Kim S, Jacobson KA, Zhang X, Han S, Wess J: Ligand-specific changes in M3 muscarinic acetylcholine receptor structure detected by a disulfide scanning strategy. *Biochemistry* **2008**;47:2776-2788.

25. Zürn A, Zabel U, Vilardaga J, Schindelin H, Lohse MJ, Hoffmann C: Fluorescence resonance energy transfer analysis of alpha 2a-adrenergic receptor activation reveals distinct agonist-specific conformational changes. *Mol. Pharmacol* **2009**;75:534-541.
26. Khsai AW, Xiao K, Rajagopal S, Ahn S, Shukla AK, Sun J, Oas TG, Lefkowitz RJ: Multiple ligand-specific conformations of the β 2-adrenergic receptor. *Nat. Chem. Biol.* **2011**;7:692-700.
27. Urban JD, Clarke WP, Zastrow M von, Nichols DE, Kobilka B, Weinstein H, Javitch JA, Roth BL, Christopoulos A, Sexton PM, Miller KJ, Spedding M, Mailman RB: Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**;320:1-13.
28. Hoffmann C, Zürn A, Bünemann M, Lohse MJ: Conformational changes in G-protein-coupled receptors-the quest for functionally selective conformations is open. *Br. J. Pharmacol.* **2008**;153 Suppl 1:S358-66.
29. Gesty-Palmer D, Luttrell LM: Refining efficacy: exploiting functional selectivity for drug discovery. *Adv. Pharmacol.* **2011**;62:79-107.
30. Hulme EC: GPCR activation: a mutagenic spotlight on crystal structures. *Trends Pharmacol. Sci.* **2013**;34:67-84.
31. Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M: Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **2000**;289:739-745.
32. Ballesteros JA, Jensen AD, Liapakis G, Rasmussen SG, Shi L, Gether U, Javitch JA: Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6. *J. Biol. Chem.* **2001**;276:29171-29177.
33. Shapiro DA, Kristiansen K, Weiner DM, Kroeze WK, Roth BL: Evidence for a model of agonist-induced activation of 5-hydroxytryptamine 2A serotonin receptors that involves the disruption of a strong ionic interaction between helices 3 and 6. *J. Biol. Chem.* **2002**;277:11441-11449.
34. Rovati GE, Capra V, Neubig RR: The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Mol. Pharmacol* **2007**;71:959-964.
35. Hofmann KP, Scheerer P, Hildebrand PW, Choe H, Park JH, Heck M, Ernst OP: A G protein-coupled receptor at work: the rhodopsin model. *Trends Biochem. Sci.* **2009**;34:540-552.
36. Choe H, Park JH, Kim YJ, Ernst OP: Transmembrane signaling by GPCRs: insight from rhodopsin and opsin structures. *Neuropharmacology* **2011**;60:52-57.
37. Farrens DL, Altenbach C, Yang K, Hubbell WL, Khorana HG: Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science* **1996**;274:768-770.
38. Kobilka BK: G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**;1768:794-807.
39. Altenbach C, Kusnetzow AK, Ernst OP, Hofmann KP, Hubbell WL: High-resolution distance mapping in rhodopsin reveals the pattern of helix movement due to activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**;105:7439-7444.
40. Janz JM, Farrens DL: Rhodopsin activation exposes a key hydrophobic binding site for the transducin alpha-subunit C terminus. *J. Biol. Chem.* **2004**;279:29767-29773.
41. Huang C, Tesmer JGG: Recognition in the face of diversity: interactions of heterotrimeric G proteins and G protein-coupled receptor (GPCR) kinases with activated GPCRs. *J. Biol. Chem.* **2011**;286:7715-7721.
42. Sheikh SP, Zvyaga TA, Lichtarge O, Sakmar TP, Bourne HR: Rhodopsin activation blocked by metal-ion-binding sites linking transmembrane helices C and F. *Nature* **1996**;383:347-350.
43. Chien EYT, Liu W, Zhao Q, Katritch V, Han GW, Hanson MA, Shi L, Newman AH, Javitch JA, Cherezov V, Stevens RC: Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. *Science* **2010**;330:1091-1095.
44. Doré AS, Robertson N, Errey JC, Ng I, Hollenstein K, Tehan B, Hurrell E, Bennett K, Congreve M, Magnani F, Tate CG, Weir M, Marshall FH: Structure of the adenosine A(2A) receptor in complex with ZM241385 and the xanthines XAC and caffeine. *Structure* **2011**;19:1283-1293.
45. Jacobson KA, Costanzi S: New insights for drug design from the X-ray crystallographic structures of G-protein-coupled receptors. *Mol. Pharmacol.* **2012**;82:361-371.
46. Weis WI, Kobilka BK: Structural insights into G-protein-coupled receptor activation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**;18:734-740.
47. Unal H, Karnik SS: Domain coupling in GPCRs: the engine for induced conformational changes. *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**;33:79-88.
48. Chen CA, Manning DR: Regulation of G proteins by covalent modification. *Oncogene* **2001**;20:1643-1652.

49. Wedegaertner PB, Wilson PT, Bourne HR: Lipid modifications of trimeric G proteins. *J. Biol. Chem.* **1995**;270:503-506.
50. Hamm HE: The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem.* **1998**;273:669-672.
51. Gautam N, Downes GB, Yan K, Kisselev O: The G-protein betagamma complex. *Cell. Signal.* **1998**;10:447-455.
52. Downes GB, Gautam N: The G protein subunit gene families. *Genomics* **1999**;62:544-552.
53. Huang L, Shanker YG, Dubauskaite J, Zheng JZ, Yan W, Rosenzweig S, Spielman AI, Max M, Margolskee RF: Ggamma13 colocalizes with gustducin in taste receptor cells and mediates IP3 responses to bitter denatonium. *Nat. Neurosci.* **1999**;2:1055-1062.
54. Simon MI, Strathmann MP, Gautam N: Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **1991**;252:802-808.
55. McCudden CR, Hains MD, Kimple RJ, Siderovski DP, Willard FS: G-protein signaling: back to the future. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**;62:551-577.
56. Druey KM, Blumer KJ, Kang VH, Kehrl JH: Inhibition of G-protein-mediated MAP kinase activation by a new mammalian gene family. *Nature* **1996**;379:742-746.
57. Siderovski DP, Hessel A, Chung S, Mak TW, Tyers M: A new family of regulators of G-protein-coupled receptors? *Curr. Biol.* **1996**;6:211-212.
58. Katanaev VL, Chornomoretz M: Kinetic diversity in G-protein-coupled receptor signalling. *Biochem. J.* **2007**;401:485-495.
59. Berrera M, Dodoni G, Monterisi S, Pertegato V, Zamparo I, Zaccolo M: A toolkit for real-time detection of cAMP: insights into compartmentalized signaling. *Handb Exp Pharmacol* **2008**:285-298.
60. Lohse MJ, Nuber S, Hoffmann C: Fluorescence/bioluminescence resonance energy transfer techniques to study G-protein-coupled receptor activation and signaling. *Pharmacol. Rev.* **2012**;64:299-336.
61. Hein P, Frank M, Hoffmann C, Lohse MJ, Bünemann M: Dynamics of receptor/G protein coupling in living cells. *EMBO J.* **2005**;24:4106-4114.
62. Neubig RR, Gantz RD, Thomsen WJ: Mechanism of agonist and antagonist binding to alpha 2 adrenergic receptors: evidence for a precoupled receptor-guanine nucleotide protein complex. *Biochemistry* **1988**;27:2374-2384.
63. Galés C, van Durm JJ, Schaak S, Pontier S, Percherancier Y, Audet M, Paris H, Bouvier M: Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**;13:778-786.
64. Hein P, Bünemann M: Coupling mode of receptors and G proteins. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2009**;379:435-443.
65. Brushia RJ, Walsh DA: Phosphorylase kinase: the complexity of its regulation is reflected in the complexity of its structure. *Front. Biosci.* **1999**;4:D618-41.
66. Howe AK: Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**;1692:159-174.
67. Salazar NC, Chen J, Rockman HA: Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**;1768:1006-1018.
68. Lee KA: Transcriptional regulation by cAMP. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1991**;3:953-959.
69. Patel PA, Tilley DG, Rockman HA: Physiologic and cardiac roles of beta-arrestins. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2009**;46:300-308.
70. Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz RJ: Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function. *FASEB J.* **1990**;4:2881-2889.
71. Kimple AJ, Bosch DE, Giguère PM, Siderovski DP: Regulators of G-protein signaling and their Gα substrates: promises and challenges in their use as drug discovery targets. *Pharmacol. Rev.* **2011**;63:728-749.
72. Siderovski DP, Willard FS: The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *Int. J. Biol. Sci.* **2005**;1:51-66.
73. Ferguson SSG: Phosphorylation-independent attenuation of GPCR signalling. *Trends Pharmacol. Sci.* **2007**;28:173-179.
74. Morris GE, Nelson CP, Brighton PJ, Standen NB, Challiss RAJ, Willets JM: Arrestins 2 and 3 differentially regulate ETA and P2Y2 receptor-mediated cell signaling and migration in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **2012**;302:C723-34.
75. Butcher AJ, Kong KC, Prihandoko R, Tobin AB: Physiological role of G-protein coupled receptor phosphorylation. *Handb Exp Pharmacol* **2012**:79-94.
76. Krupnick JG, Benovic JL: The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1998**;38:289-319.

77. Luttrell LM, Lefkowitz RJ: The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J. Cell. Sci* **2002**;115:455-465.
78. Krasel C, Bünemann M, Lorenz K, Lohse MJ: Beta-arrestin binding to the beta2-adrenergic receptor requires both receptor phosphorylation and receptor activation. *J. Biol. Chem.* **2005**;280:9528-9535.
79. Benovic JL, Pike LJ, Cerione RA, Staniszewski C, Yoshimasa T, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ: Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein. *J. Biol. Chem.* **1985**;260:7094-7101.
80. Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ: G protein-coupled receptor kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**;67:653-692.
81. Willets JM, Challiss RAJ, Nahorski SR: Non-visual GRKs: are we seeing the whole picture? *Trends Pharmacol. Sci* **2003**;24:626-633.
82. Ohguro H, Palczewski K, Ericsson LH, Walsh KA, Johnson RS: Sequential phosphorylation of rhodopsin at multiple sites. *Biochemistry* **1993**;32:5718-5724.
83. Christophe T, Rabiet MJ, Tardif M, Milcent MD, Boulay F: Human complement 5a (C5a) anaphylatoxin receptor (CD88) phosphorylation sites and their specific role in receptor phosphorylation and attenuation of G protein-mediated responses. Desensitization of C5a receptor controls superoxide production but not receptor sequestration in HL-60 cells. *J. Biol. Chem* **2000**;275:1656-1664.
84. Kouhen OM, Wang G, Solberg J, Erickson LJ, Law PY, Loh HH: Hierarchical phosphorylation of delta-opioid receptor regulates agonist-induced receptor desensitization and internalization. *J. Biol. Chem* **2000**;275:36659-36664.
85. Weller M, Virmaux N, Mandel P: Light-stimulated phosphorylation of rhodopsin in the retina: the presence of a protein kinase that is specific for photobleached rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1975**;72:381-385.
86. Benovic JL, Strasser RH, Caron MG, Lefkowitz RJ: Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1986**;83:2797-2801.
87. Benovic JL, Onorato JJ, Arriza JL, Stone WC, Lohse M, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Caron MG, Lefkowitz RJ: Cloning, expression, and chromosomal localization of beta-adrenergic receptor kinase 2. A new member of the receptor kinase family. *J. Biol. Chem.* **1991**;266:14939-14946.
88. Ambrose C, James M, Barnes G, Lin C, Bates G, Altherr M, Duyao M, Groot N, Church D, Wasmuth JJ: A novel G protein-coupled receptor kinase gene cloned from 4p16.3. *Hum. Mol. Genet.* **1992**;1:697-703.
89. Kunapuli P, Benovic JL: Cloning and expression of GRK5: a member of the G protein-coupled receptor kinase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**;90:5588-5592.
90. Benovic JL, Gomez J: Molecular cloning and expression of GRK6. A new member of the G protein-coupled receptor kinase family. *J. Biol. Chem.* **1993**;268:19521-19527.
91. Hisatomi O, Matsuda S, Satoh T, Kotaka S, Imanishi Y, Tokunaga F: A novel subtype of G-protein-coupled receptor kinase, GRK7, in teleost cone photoreceptors. *FEBS Lett.* **1998**;424:159-164.
92. Weiss ER, Raman D, Shirakawa S, Ducceschi MH, Bertram PT, Wong F, Kraft TW, Osawa S: The cloning of GRK7, a candidate cone opsin kinase, from cone- and rod-dominant mammalian retinas. *Mol. Vis.* **1998**;4:27.
93. Gurevich EV, Tesmer JGG, Mushegian A, Gurevich VV: G protein-coupled receptor kinases: more than just kinases and not only for GPCRs. *Pharmacol. Ther* **2012**;133:40-69.
94. Jaber M, Koch WJ, Rockman H, Smith B, Bond RA, Sulik KK, Ross J, Lefkowitz RJ, Caron MG, Giros B: Essential role of beta-adrenergic receptor kinase 1 in cardiac development and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**;93:12974-12979.
95. Molnar C, Holguin H, Mayor F, Ruiz-Gomez A, Celis JF de: The G protein-coupled receptor regulatory kinase GPRK2 participates in Hedgehog signaling in Drosophila. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**;104:7963-7968.
96. Jiang X, Yang P, Ma L: Kinase activity-independent regulation of cyclin pathway by GRK2 is essential for zebrafish early development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**;106:10183-10188.
97. Lodowski DT, Tesmer VM, Benovic JL, Tesmer JGG: The structure of G protein-coupled receptor kinase (GRK)-6 defines a second lineage of GRKs. *J. Biol. Chem.* **2006**;281:16785-16793.
98. Palczewski K, Buczyłko J, Lebioda L, Crabb JW, Polans AS: Identification of the N-terminal region in rhodopsin kinase involved in its interaction with rhodopsin. *J. Biol. Chem.* **1993**;268:6004-6013.

99. Lodowski DT, Barnhill JF, Pyskadlo RM, Ghirlando R, Sterne-Marr R, Tesmer JGG: The role of G beta gamma and domain interfaces in the activation of G protein-coupled receptor kinase 2. *Biochemistry* **2005**;44:6958-6970.
100. Boguth CA, Singh P, Huang C, Tesmer JGG: Molecular basis for activation of G protein-coupled receptor kinases. *EMBO J.* **2010**;29:3249-3259.
101. Carman CV, Parent JL, Day PW, Pronin AN, Sternweis PM, Wedegaertner PB, Gilman AG, Benovic JL, Kozasa T: Selective regulation of Galpha(q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J. Biol. Chem.* **1999**;274:34483-34492.
102. Salles M, Mariggiò S, D'Urbano E, Iacovelli L, Blasi A de: Selective regulation of Gq signaling by G protein-coupled receptor kinase 2: direct interaction of kinase N terminus with activated galphaq. *Mol. Pharmacol.* **2000**;57:826-831.
103. Day PW, Carman CV, Sterne-Marr R, Benovic JL, Wedegaertner PB: Differential interaction of GRK2 with members of the G alpha q family. *Biochemistry* **2003**;42:9176-9184.
104. Ribeiro FM, Ferreira LT, Paquet M, Cregan T, Ding Q, Gros R, Ferguson SSG: Phosphorylation-independent regulation of metabotropic glutamate receptor 5 desensitization and internalization by G protein-coupled receptor kinase 2 in neurons. *J. Biol. Chem.* **2009**;284:23444-23453.
105. Fernandez N, Gottardo FL, Alonso MN, Monczor F, Shayo C, Davio C: Roles of phosphorylation-dependent and -independent mechanisms in the regulation of histamine H2 receptor by G protein-coupled receptor kinase 2. *J. Biol. Chem.* **2011**;286:28697-28706.
106. Tesmer VM, Kawano T, Shankaranarayanan A, Kozasa T, Tesmer JGG: Snapshot of activated G proteins at the membrane: the Galphaq-GRK2-Gbetagamma complex. *Science* **2005**;310:1686-1690.
107. Sterne-Marr R, Tesmer JGG, Day PW, Stracquatano RP, Cilente JE, O'Connor KE, Pronin AN, Benovic JL, Wedegaertner PB: G protein-coupled receptor Kinase 2/G alpha q/11 interaction. A novel surface on a regulator of G protein signaling homology domain for binding G alpha subunits. *J. Biol. Chem* **2003**;278:6050-6058.
108. Iwata K, Luo J, Penn RB, Benovic JL: Bimodal regulation of the human H1 histamine receptor by G protein-coupled receptor kinase 2. *J. Biol. Chem.* **2005**;280:2197-2204.
109. Penela P, Murga C, Ribas C, Lafarga V, Mayor F: The complex G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) interactome unveils new physiopathological targets. *Br. J. Pharmacol.* **2010**;160:821-832.
110. Evron T, Daigle TL, Caron MG: GRK2: multiple roles beyond G protein-coupled receptor desensitization. *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**;33:154-164.
111. Raveh A, Cooper A, Guy-David L, Reuveny E: Nonenzymatic rapid control of GIRK channel function by a G protein-coupled receptor kinase. *Cell* **2010**;143:750-760.
112. Ruiz-Gómez A, Mayor F: Beta-adrenergic receptor kinase (GRK2) colocalizes with beta-adrenergic receptors during agonist-induced receptor internalization. *J. Biol. Chem.* **1997**;272:9601-9604.
113. Shiina T, Arai K, Tanabe S, Yoshida N, Haga T, Nagao T, Kurose H: Clathrin box in G protein-coupled receptor kinase 2. *J. Biol. Chem.* **2001**;276:33019-33026.
114. Freedman NJ, Ament AS, Oppermann M, Stoffel RH, Exum ST, Lefkowitz RJ: Phosphorylation and desensitization of human endothelin A and B receptors. Evidence for G protein-coupled receptor kinase specificity. *J. Biol. Chem* **1997**;272:17734-17743.
115. Dhami GK, Anborgh PH, Dale LB, Sterne-Marr R, Ferguson SSG: Phosphorylation-independent regulation of metabotropic glutamate receptor signaling by G protein-coupled receptor kinase 2. *J. Biol. Chem.* **2002**;277:25266-25272.
116. Dhami GK, Dale LB, Anborgh PH, O'Connor-Halligan KE, Sterne-Marr R, Ferguson SSG: G Protein-coupled receptor kinase 2 regulator of G protein signaling homology domain binds to both metabotropic glutamate receptor 1a and Galphaq to attenuate signaling. *J. Biol. Chem.* **2004**;279:16614-16620.
117. Benovic JL, Kühn H, Weyand I, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ: Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**;84:8879-8882.
118. Gurevich EV, Gurevich VV: Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling pathways. *Genome Biol.* **2006**;7:236.
119. Gurevich VV, Dion SB, Onorato JJ, Ptasienski J, Kim CM, Sterne-Marr R, Hosey MM, Benovic JL: Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. Direct binding studies of wild type and mutant arrestins with rhodopsin, beta 2-adrenergic, and m2 muscarinic cholinergic receptors. *J. Biol. Chem.* **1995**;270:720-731.

120. Shinohara T, Dietzschold B, Craft CM, Wistow G, Early JJ, Donoso LA, Horwitz J, Tao R: Primary and secondary structure of bovine retinal S antigen (48-kDa protein). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**;84:6975-6979.
121. Yamaki K, Takahashi Y, Sakuragi S, Matsubara K: Molecular cloning of the S-antigen cDNA from bovine retina. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**;142:904-910.
122. Murakami A, Yajima T, Sakuma H, McLaren MJ, Inana G: X-arrestin: a new retinal arrestin mapping to the X chromosome. *FEBS Lett.* **1993**;334:203-209.
123. Craft CM, Whitmore DH, Wiechmann AF: Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family. *J. Biol. Chem.* **1994**;269:4613-4619.
124. Attramadal H, Arriza JL, Aoki C, Dawson TM, Codina J, Kwatra MM, Snyder SH, Caron MG, Lefkowitz RJ: Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J. Biol. Chem.* **1992**;267:17882-17890.
125. Sterne-Marr R, Gurevich VV, Goldsmith P, Bodine RC, Sanders C, Donoso LA, Benovic JL: Polypeptide variants of beta-arrestin and arrestin3. *J. Biol. Chem.* **1993**;268:15640-15648.
126. Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ: beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* **1990**;248:1547-1550.
127. Gurevich VV, Benovic JL: Visual arrestin interaction with rhodopsin. Sequential multisite binding ensures strict selectivity toward light-activated phosphorylated rhodopsin. *J. Biol. Chem.* **1993**;268:11628-11638.
128. Gurevich VV, Gurevich EV: The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther* **2006**;110:465-502.
129. Mukherjee S, Palczewski K, Gurevich V, Benovic JL, Banga JP, Hunzicker-Dunn M: A direct role for arrestins in desensitization of the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor in porcine ovarian follicular membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**;96:493-498.
130. Min L, Ascoli M: Effect of activating and inactivating mutations on the phosphorylation and trafficking of the human lutropin/choriogonadotropin receptor. *Mol. Endocrinol.* **2000**;14:1797-1810.
131. Le Min, Galet C, Ascoli M: The association of arrestin-3 with the human lutropin/choriogonadotropin receptor depends mostly on receptor activation rather than on receptor phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2002**;277:702-710.
132. Mukherjee S, Gurevich VV, Preninger A, Hamm HE, Bader M, Fazleabas AT, Birnbaumer L, Hunzicker-Dunn M: Aspartic acid 564 in the third cytoplasmic loop of the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor is crucial for phosphorylation-independent interaction with arrestin2. *J. Biol. Chem.* **2002**;277:17916-17927.
133. Galliera E, Jala VR, Trent JO, Bonecchi R, Signorelli P, Lefkowitz RJ, Mantovani A, Locati M, Haribabu B: beta-Arrestin-dependent constitutive internalization of the human chemokine decoy receptor D6. *J. Biol. Chem.* **2004**;279:25590-25597.
134. Jala VR, Shao W, Haribabu B: Phosphorylation-independent beta-arrestin translocation and internalization of leukotriene B4 receptors. *J. Biol. Chem* **2005**;280:4880-4887.
135. Tobin AB: G-protein-coupled receptor phosphorylation: where, when and by whom. *Br. J. Pharmacol.* **2008**;153 Suppl 1:S167-76.
136. Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS: Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. Biol. Chem* **2000**;275:17201-17210.
137. Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG: Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis*. *J. Biol. Chem.* **2001**;276:19452-19460.
138. Zhang J, Barak LS, Anborgh PH, Laporte SA, Caron MG, Ferguson SS: Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes. *J. Biol. Chem* **1999**;274:10999-11006.
139. Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG: Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J. Biol. Chem.* **1999**;274:32248-32257.
140. Perry SJ, Baillie GS, Kohout TA, McPhee I, Magiera MM, Ang KL, Miller WE, McLean AJ, Conti M, Houslay MD, Lefkowitz RJ: Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins. *Science* **2002**;298:834-836.
141. Nelson CD, Perry SJ, Regier DS, Prescott SM, Topham MK, Lefkowitz RJ: Targeting of diacylglycerol degradation to M1 muscarinic receptors by beta-arrestins. *Science* **2007**;315:663-666.

142. Hamdan FF, Rochdi MD, Breton B, Fessart D, Michaud DE, Charest PG, Laporte SA, Bouvier M: Unraveling G protein-coupled receptor endocytosis pathways using real-time monitoring of agonist-promoted interaction between beta-arrestins and AP-2. *J. Biol. Chem* **2007**;282:29089-29100.
143. Moore CAC, Milano SK, Benovic JL: Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu. Rev. Physiol.* **2007**;69:451-482.
144. Violin JD, Lefkowitz RJ: Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **2007**;28:416-422.
145. DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy SK: Beta-arrestins and cell signaling. *Annu. Rev. Physiol.* **2007**;69:483-510.
146. Ahn S, Shenoy SK, Wei H, Lefkowitz RJ: Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *J. Biol. Chem.* **2004**;279:35518-35525.
147. Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, Caron MG, Lefkowitz RJ: Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* **1999**;283:655-661.
148. Rajagopal S, Rajagopal K, Lefkowitz RJ: Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov* **2010**;9:373-386.
149. Tobin AB, Butcher AJ, Kong KC: Location, location, location...site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signalling. *Trends Pharmacol. Sci.* **2008**;29:413-420.
150. Shenoy SK, Lefkowitz RJ: β -Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends Pharmacol. Sci.* **2011**;32:521-533.
151. Nobles KN, Xiao K, Ahn S, Shukla AK, Lam CM, Rajagopal S, Strachan RT, Huang T, Bressler EA, Hara MR, Shenoy SK, Gygi SP, Lefkowitz RJ: Distinct phosphorylation sites on the $\beta(2)$ -adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of β -arrestin. *Sci Signal* **2011**;4:ra51.
152. Shukla AK, Xiao K, Lefkowitz RJ: Emerging paradigms of β -arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. *Trends Biochem. Sci.* **2011**;36:457-469.
153. Butcher AJ, Prihandoko R, Kong KC, McWilliams P, Edwards JM, Bottrill A, Mistry S, Tobin AB: Differential G-protein-coupled receptor phosphorylation provides evidence for a signaling bar code. *J. Biol. Chem.* **2011**;286:11506-11518.
154. Lohse MJ: Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**;1179:171-188.
155. Cho D, Zheng M, Min C, Ma L, Kurose H, Park JH, Kim K: Agonist-induced endocytosis and receptor phosphorylation mediate resensitization of dopamine D(2) receptors. *Mol. Endocrinol.* **2010**;24:574-586.
156. Vasudevan NT, Mohan ML, Goswami SK, Naga Prasad SV: Regulation of β -adrenergic receptor function: an emphasis on receptor resensitization. *Cell Cycle* **2011**;10:3684-3691.
157. Pierce KL, Maudsley S, Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ: Role of endocytosis in the activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade by sequestering and nonsequestering G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**;97:1489-1494.
158. Ceresa BP, Schmid SL: Regulation of signal transduction by endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**;12:204-210.
159. Hirst J, Robinson MS: Clathrin and adaptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**;1404:173-193.
160. Takei K, McPherson PS, Schmid SL, Camilli P de: Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP- γ S in nerve terminals. *Nature* **1995**;374:186-190.
161. Hinshaw JE, Schmid SL: Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* **1995**;374:190-192.
162. Marchese A, Chen C, Kim Y, Benovic JL: The ins and outs of G protein-coupled receptor trafficking. *Trends Biochem. Sci.* **2003**;28:369-376.
163. Hynes TR, Mervine SM, Yost EA, Sabo JL, Berlot CH: Live cell imaging of Gs and the beta2-adrenergic receptor demonstrates that both alphas and beta1gamma7 internalize upon stimulation and exhibit similar trafficking patterns that differ from that of the beta2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **2004**;279:44101-44112.
164. Ferguson SS, Downey WE, Colapietro AM, Barak LS, Ménard L, Caron MG: Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* **1996**;271:363-366.
165. Goodman OB, Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, Keen JH, Benovic JL: Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* **1996**;383:447-450.

166. Krupnick JG, Goodman OB, Keen JH, Benovic JL: Arrestin/clathrin interaction. Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxy terminus. *J. Biol. Chem.* **1997**;272:15011-15016.
167. Gaidarov I, Krupnick JG, Falck JR, Benovic JL, Keen JH: Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding. *EMBO J.* **1999**;18:871-881.
168. Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Ménard L, Caron MG: Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J. Biol. Chem.* **1996**;271:18302-18305.
169. Liang W, Curran PK, Hoang Q, Moreland RT, Fishman PH: Differences in endosomal targeting of human (beta)1- and (beta)2-adrenergic receptors following clathrin-mediated endocytosis. *J. Cell. Sci.* **2004**;117:723-734.
170. Yamada E: The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* **1955**;1:445-458.
171. Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG: Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **1992**;68:673-682.
172. Boivin B, Villeneuve LR, Farhat N, Chevalier D, Allen BG: Sub-cellular distribution of endothelin signaling pathway components in ventricular myocytes and heart: lack of preformed caveolar signalosomes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2005**;38:665-676.
173. Henley JR, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA: Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J. Cell Biol.* **1998**;141:85-99.
174. Oh P, McIntosh DP, Schnitzer JE: Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J. Cell Biol.* **1998**;141:101-114.
175. Claing A, Laporte SA, Caron MG, Lefkowitz RJ: Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog. Neurobiol.* **2002**;66:61-79.
176. Anderson RG: The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**;67:199-225.
177. Nichols BJ, Lippincott-Schwartz J: Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol.* **2001**;11:406-412.
178. Chini B, Parenti M: G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there? *J. Mol. Endocrinol.* **2004**;32:325-338.
179. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S: Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* **1990**;348:730-732.
180. Maguire JJ, Kuc RE, Pell VR, Green A, Brown M, Kumar S, Wehrman T, Quinn E, Davenport AP: Comparison of human ETA and ETB receptor signalling via G-protein and β -arrestin pathways. *Life Sci.* **2012**;91:544-549.
181. Sakurai T, Yanagisawa M, Takawa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T: Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* **1990**;348:732-735.
182. Waggoner WG, Genova SL, Rash VA: Kinetic analyses demonstrate that the equilibrium assumption does not apply to [¹²⁵I]endothelin-1 binding data. *Life Sci* **1992**;51:1869-1876.
183. Sokolovsky M: Endothelin receptor subtypes and their role in transmembrane signaling mechanisms. *Pharmacol. Ther.* **1995**;68:435-471.
184. Goligorsky MS, Tsukahara H, Magazine H, Andersen TT, Malik AB, Bahou WF: Termination of endothelin signaling: role of nitric oxide. *J. Cell. Physiol.* **1994**;158:485-494.
185. Wang J, Chiou WJ, Gagne GD, Wu-Wong JR: Internalization of type-A endothelin receptor. *J. Cardiovasc. Pharmacol* **2000**;36:S61-5.
186. Griendling KK, Tsuda T, Alexander RW: Endothelin stimulates diacylglycerol accumulation and activates protein kinase C in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **1989**;264:8237-8240.
187. Takawa Y, Kasuya Y, Takawa N, Kudo M, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T, Yamashita K: Endothelin receptor is coupled to phospholipase C via a pertussis toxin-insensitive guanine nucleotide-binding regulatory protein in vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* **1990**;85:653-658.
188. Eguchi S, Hirata Y, Imai T, Marumo F: Endothelin receptor subtypes are coupled to adenylate cyclase via different guanyl nucleotide-binding proteins in vasculature. *Endocrinology* **1993**;132:524-529.
189. Rebsamen MC, Church DJ, Morabito D, Vallotton MB, Lang U: Role of cAMP and calcium influx in endothelin-1-induced ANP release in rat cardiomyocytes. *Am. J. Physiol.* **1997**;273:E922-31.
190. Eguchi S, Hirata Y, Marumo F: Endothelin subtype B receptors are coupled to adenylate cyclase via inhibitory G protein in cultured bovine endothelial cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1993**;22 Suppl 8:S161-3.

191. Khac LD, Naze S, Harbon S: Endothelin receptor type A signals both the accumulation of inositol phosphates and the inhibition of cyclic AMP generation in rat myometrium: stimulation and desensitization. *Mol. Pharmacol.* **1994**;46:485-494.
192. Tomić M, van Goor F, He M, Zivadinovic D, Stojilkovic SS: Ca(2+)-mobilizing endothelin-A receptors inhibit voltage-gated Ca(2+) influx through G(i/o) signaling pathway in pituitary lactotrophs. *Mol. Pharmacol.* **2002**;61:1329-1339.
193. Hilal-Dandan R, He H, Martin JL, Brunton LL, Dillmann WH: Endothelin downregulates SERCA2 gene and protein expression in adult rat ventricular myocytes: regulation by pertussis toxin-sensitive Gi protein and cAMP. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2009**;296:H728-34.
194. Andric SA, Zivadinovic D, Gonzalez-Iglesias AE, Lachowicz A, Tomic M, Stojilkovic SS: Endothelin-induced, long lasting, and Ca²⁺ influx-independent blockade of intrinsic secretion in pituitary cells by G_z subunits. *J. Biol. Chem.* **2005**;280:26896-26903.
195. Gohla A, Schultz G, Offermanns S: Role for G(12)/G(13) in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction. *Circ. Res.* **2000**;87:221-227.
196. Kitamura K, Shiraishi N, Singer WD, Handlogten ME, Tomita K, Miller RT: Endothelin-B receptors activate Galph13. *Am. J. Physiol.* **1999**;276:C930-7.
197. Bertram R, Tabak J, Toporikova N, Freeman ME: Endothelin action on pituitary lactotrophs: one receptor, many GTP-binding proteins. *Sci. STKE* **2006**;2006:pe4.
198. Kohan DE, Rossi NF, Inscho EW, Pollock DM: Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. *Physiol. Rev.* **2011**;91:1-77.
199. Schneider MP, Boesen EI, Pollock DM: Contrasting actions of endothelin ET(A) and ET(B) receptors in cardiovascular disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2007**;47:731-759.
200. Kawanabe Y, Nauli SM: Endothelin. *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**;68:195-203.
201. Masaki T, Kimura S, Yanagisawa M, Goto K: Molecular and cellular mechanism of endothelin regulation. Implications for vascular function. *Circulation* **1991**;84:1457-1468.
202. Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF: Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **1985**;248:C550-6.
203. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **1988**;332:411-415.
204. Kedzierski RM, Yanagisawa M: Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2001**;41:851-876.
205. Schiffrin EL: State-of-the-Art lecture. Role of endothelin-1 in hypertension. *Hypertension* **1999**;34:876-881.
206. Kohan DE: The renal medullary endothelin system in control of sodium and water excretion and systemic blood pressure. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2006**;15:34-40.
207. Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T: Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Pflugers Arch.* **1988**;413:108-110.
208. Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T: Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria. *Am. J. Physiol.* **1988**;255:H970-3.
209. Proven A, Roderick HL, Conway SJ, Berridge MJ, Horton JK, Capper SJ, Bootman MD: Inositol 1,4,5-trisphosphate supports the arrhythmogenic action of endothelin-1 on ventricular cardiac myocytes. *J. Cell. Sci.* **2006**;119:3363-3375.
210. Sakai S, Miyauchi T, Kobayashi M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y: Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature* **1996**;384:353-355.
211. Sugden PH, Clerk A: Endothelin signalling in the cardiac myocyte and its pathophysiological relevance. *Curr Vasc Pharmacol* **2005**;3:343-351.
212. Rubin LJ, Hooper MM, Klepetko W, Galiè N, Lang IM, Simonneau G: Current and future management of chronic thromboembolic pulmonary hypertension: from diagnosis to treatment responses. *Proc Am Thorac Soc* **2006**;3:601-607.
213. Barton M, Yanagisawa M: Endothelin: 20 years from discovery to therapy. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2008**;86:485-498.
214. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T: The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**;86:2863-2867.
215. Vinge LE, Andressen KW, Attramadal T, Andersen GØ, Ahmed MS, Peppel K, Koch WJ, Freedman NJ, Levy FO, Skomedal T, Osnes J, Attramadal H: Substrate specificities of g protein-coupled receptor

- kinase-2 and -3 at cardiac myocyte receptors provide basis for distinct roles in regulation of myocardial function. *Mol. Pharmacol.* **2007**;72:582-591.
216. Poppel K, Jacobson A, Huang X, Murray JP, Oppermann M, Freedman NJ: Overexpression of G protein-coupled receptor kinase-2 in smooth muscle cells attenuates mitogenic signaling via G protein-coupled and platelet-derived growth factor receptors. *Circulation* **2000**;102:793-799.
217. Morris GE, Nelson CP, Standen NB, Challiss RAJ, Willets JM: Endothelin signalling in arterial smooth muscle is tightly regulated by G protein-coupled receptor kinase 2. *Cardiovasc. Res.* **2010**;85:424-433.
218. Stannard C, Lehenkari P, Godovac-Zimmermann J: Functional diversity of endothelin pathways in human lung fibroblasts may be based on structural diversity of the endothelin receptors. *Biochemistry* **2003**;42:13909-13918.
219. Chun M, Lin HY, Henis YI, Lodish HF: Endothelin-induced endocytosis of cell surface ETA receptors. Endothelin remains intact and bound to the ETA receptor. *J. Biol. Chem.* **1995**;270:10855-10860.
220. Cramer H, Müller-Esterl W, Schroeder C: Subtype-specific desensitization of human endothelin ETA and ETB receptors reflects differential receptor phosphorylation. *Biochemistry* **1997**;36:13325-13332.
221. Bremnes T, Paasche JD, Mehlum A, Sandberg C, Bremnes B, Attramadal H: Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. *J. Biol. Chem* **2000**;275:17596-17604.
222. Oksche A, Boese G, Horstmeyer A, Furkert J, Beyermann M, Bienert M, Rosenthal W: Late endosomal/lysosomal targeting and lack of recycling of the ligand-occupied endothelin B receptor. *Mol. Pharmacol.* **2000**;57:1104-1113.
223. Claing A, Perry SJ, Achiriloaie M, Walker JK, Albanesi JP, Lefkowitz RJ, Premont RT: Multiple endocytic pathways of G protein-coupled receptors delineated by GIT1 sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**;97:1119-1124.
224. Houndolo T, Boulay P, Claing A: G protein-coupled receptor endocytosis in ADP-ribosylation factor 6-depleted cells. *J. Biol. Chem.* **2005**;280:5598-5604.
225. Chun M, Liyanage UK, Lisanti MP, Lodish HF: Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**;91:11728-11732.
226. Teixeira A, Chaverot N, Schröder C, Strosberg AD, Couraud PO, Cazaubon S: Requirement of caveolae microdomains in extracellular signal-regulated kinase and focal adhesion kinase activation induced by endothelin-1 in primary astrocytes. *J. Neurochem.* **1999**;72:120-128.
227. Yamaguchi T, Murata Y, Fujiyoshi Y, Doi T: Regulated interaction of endothelin B receptor with caveolin-1. *Eur. J. Biochem.* **2003**;270:1816-1827.
228. Oh P, Horner T, Witkiewicz H, Schnitzer JE: Endothelin induces rapid, dynamin-mediated budding of endothelial caveolae rich in ET-B. *J. Biol. Chem.* **2012**;287:17353-17362.
229. Okamoto Y, Ninomiya H, Miwa S, Masaki T: Cholesterol oxidation switches the internalization pathway of endothelin receptor type A from caveolae to clathrin-coated pits in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **2000**;275:6439-6446.
230. Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, Ishikawa K, Yano M, Nishikibe M: Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**;199:1461-1465.
231. Kelland NF, Kuc RE, McLean DL, Azfer A, Bagnall AJ, Gray GA, Gulliver-Sloan FH, Maguire JJ, Davenport AP, Kotelevtsev YV, Webb DJ: Endothelial cell-specific ETB receptor knockout: autoradiographic and histological characterisation and crucial role in the clearance of endothelin-1. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2010**;88:644-651.
232. Paasche JD, Attramadal T, Sandberg C, Johansen HK, Attramadal H: Mechanisms of endothelin receptor subtype-specific targeting to distinct intracellular trafficking pathways. *J. Biol. Chem* **2001**;276:34041-34050.
233. Paasche JD, Attramadal T, Kristiansen K, Oksvold MP, Johansen HK, Huitfeldt HS, Dahl SG, Attramadal H: Subtype-specific sorting of the ETA endothelin receptor by a novel endocytic recycling signal for G protein-coupled receptors. *Mol. Pharmacol.* **2005**;67:1581-1590.
234. Romero G, Zastrow M von, Friedman PA: Role of PDZ proteins in regulating trafficking, signaling, and function of GPCRs: means, motif, and opportunity. *Adv. Pharmacol.* **2011**;62:279-314.
235. Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D: Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**;87:4645-4649.
236. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R: Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **1977**;36:59-74.
237. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1977**;74:5463-5467.

238. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* **2001**;25:402-408.
239. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY: A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **1985**;260:3440-3450.
240. Kredel S, Oswald F, Nienhaus K, Deuschle K, Röcker C, Wolff M, Heilker R, Nienhaus GU, Wiedenmann J: mRuby, a bright monomeric red fluorescent protein for labeling of subcellular structures. *PLoS ONE* **2009**;4:e4391.
241. Krupinski J, Lehman TC, Frankenfield CD, Zwaagstra JC, Watson PA: Molecular diversity in the adenylyl cyclase family. Evidence for eight forms of the enzyme and cloning of type VI. *J. Biol. Chem.* **1992**;267:24858-24862.
242. Behr B: Neue Mutanten des humanen β 1-adrenergen Rezeptors zeigen für die Rezeptoraktivierung relevante Aminosäuren. *Dissertation*. Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Institut für Pharmakologie der Universität Würzburg; 2006.
243. Kong G, Penn R, Benovic JL: A beta-adrenergic receptor kinase dominant negative mutant attenuates desensitization of the beta 2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem* **1994**;269:13084-13087.
244. Barki-Harrington L, Rockman HA: Beta-arrestins: multifunctional cellular mediators. *Physiology (Bethesda)* **2008**;23:17-22.
245. Elshourbagy NA, Korman DR, Wu HL, Sylvester DR, Lee JA, Nuthalaganti P, Bergsma DJ, Kumar CS, Nambi P: Molecular characterization and regulation of the human endothelin receptors. *J. Biol. Chem.* **1993**;268:3873-3879.
246. Zemanová L, Schenk A, Hunt N, Nienhaus GU, Heilker R: Endothelin receptor in virus-like particles: ligand binding observed by fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biochemistry* **2004**;43:9021-9028.
247. Osorio-Espinoza A, Escamilla-Sánchez J, Aquino-Jarquín G, Arias-Montaña J: Homologous desensitization of human histamine H3 receptors expressed in CHO-K1 cells. *Neuropharmacology* **2013**;77:387-397.
248. Dai X, Galligan JJ: Differential trafficking and desensitization of human ET(A) and ET(B) receptors expressed in HEK 293 cells. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **2006**;231:746-751.
249. Hatae N, Aksentijevich N, Zemkova HW, Kretschmannova K, Tomic M, Stojilkovic SS: Cloning and functional identification of novel endothelin receptor type A isoforms in pituitary. *Mol. Endocrinol.* **2007**;21:1192-1204.
250. Zhang JY, Kowal DM, Nawoschik SP, Dunlop J, Pausch MH, Peri R: Development of an improved IP(1) assay for the characterization of 5-HT(2C) receptor ligands. *Assay Drug Dev Technol* **2010**;8:106-113.
251. Bergsdorf C, Kropp-Goerkis C, Kaehler I, Ketscher L, Boemer U, Parczyk K, Bader B: A one-day, dispense-only IP-One HTRF assay for high-throughput screening of Galphaq protein-coupled receptors: towards cells as reagents. *Assay Drug Dev Technol* **2008**;6:39-53.
252. Hallcher LM, Sherman WR: The effects of lithium ion and other agents on the activity of myo-inositol-1-phosphatase from bovine brain. *J. Biol. Chem.* **1980**;255:10896-10901.
253. Gao Y: Desensitization of vascular endothelin receptors by G protein-coupled receptor kinase 2. *Cardiovasc. Res.* **2010**;85:405-406.
254. Hajnóczky G, Thomas AP: The inositol trisphosphate calcium channel is inactivated by inositol trisphosphate. *Nature* **1994**;370:474-477.
255. Diviani D, Lattion AL, Larbi N, Kunapuli P, Pronin A, Benovic JL, Cotecchia S: Effect of different G protein-coupled receptor kinases on phosphorylation and desensitization of the alpha1B-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **1996**;271:5049-5058.
256. Oppermann M, Freedman NJ, Alexander RW, Lefkowitz RJ: Phosphorylation of the type 1A angiotensin II receptor by G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **1996**;271:13266-13272.
257. Pei G, Kieffer BL, Lefkowitz RJ, Freedman NJ: Agonist-dependent phosphorylation of the mouse delta-opioid receptor: involvement of G protein-coupled receptor kinases but not protein kinase C. *Mol. Pharmacol.* **1995**;48:173-177.
258. Horie K, Insel PA: Retrovirally mediated transfer of a G protein-coupled receptor kinase (GRK) dominant-negative mutant enhances endogenous calcitonin receptor signaling in Chinese hamster ovary cells. GRK inhibition enhances expression of receptors and receptor mRNA. *J. Biol. Chem.* **2000**;275:29433-29440.
259. Dicker F, Quitterer U, Winstel R, Honold K, Lohse MJ: Phosphorylation-independent inhibition of parathyroid hormone receptor signaling by G protein-coupled receptor kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**;96:5476-5481.

260. Reiter E, Marion S, Robert F, Troispoux C, Boulay F, Guillou F, Crepieux P: Kinase-inactive G-protein-coupled receptor kinases are able to attenuate follicle-stimulating hormone-induced signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**;282:71-78.
261. Namkung Y, Dipace C, Urizar E, Javitch JA, Sibley DR: G protein-coupled receptor kinase-2 constitutively regulates D2 dopamine receptor expression and signaling independently of receptor phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2009**;284:34103-34115.
262. Zhang L, Sports CD, Osawa S, Weiss ER: Rhodopsin phosphorylation sites and their role in arrestin binding. *J. Biol. Chem.* **1997**;272:14762-14768.
263. Vaughan DJ, Millman EE, Godines V, Friedman J, Tran TM, Dai W, Knoll BJ, Clark RB, Moore RH: Role of the G protein-coupled receptor kinase site serine cluster in beta2-adrenergic receptor internalization, desensitization, and beta-arrestin translocation. *J. Biol. Chem.* **2006**;281:7684-7692.
264. Fan G, Shumay E, Malbon CC, Wang H: c-Src tyrosine kinase binds the beta 2-adrenergic receptor via phospho-Tyr-350, phosphorylates G-protein-linked receptor kinase 2, and mediates agonist-induced receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* **2001**;276:13240-13247.
265. Clayton CC, Bruchas MR, Lee ML, Chavkin C: Phosphorylation of the mu-opioid receptor at tyrosine 166 (Tyr3.51) in the DRY motif reduces agonist efficacy. *Mol. Pharmacol.* **2010**;77:339-347.
266. Gáborik Z, Jagadeesh G, Zhang M, Spät A, Catt KJ, Hunyady L: The role of a conserved region of the second intracellular loop in AT1 angiotensin receptor activation and signaling. *Endocrinology* **2003**;144:2220-2228.
267. Tsuga H, Kameyama K, Haga T, Kurose H, Nagao T: Sequestration of muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes. Facilitation by G protein-coupled receptor kinase (GRK2) and attenuation by a dominant-negative mutant of GRK2. *J. Biol. Chem.* **1994**;269:32522-32527.
268. Kim KM, Valenzano KJ, Robinson SR, Yao WD, Barak LS, Caron MG: Differential regulation of the dopamine D2 and D3 receptors by G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestins. *J. Biol. Chem.* **2001**;276:37409-37414.
269. Pao CS, Benovic JL: Structure/function analysis of alpha2A-adrenergic receptor interaction with G protein-coupled receptor kinase 2. *J. Biol. Chem.* **2005**;280:11052-11058.
270. Lowther KM, Uliasz TF, Götz KR, Nikolaev VO, Mehlmann LM: Regulation of Constitutive GPR3 Signaling and Surface Localization by GRK2 and β -arrestin-2 Overexpression in HEK293 Cells. *PLoS ONE* **2013**;8:e65365.
271. Lee MJ, Thangada S, Paik JH, Sapkota GP, Ancellin N, Chae SS, Wu M, Morales-Ruiz M, Sessa WC, Alessi DR, Hla T: Akt-mediated phosphorylation of the G protein-coupled receptor EDG-1 is required for endothelial cell chemotaxis. *Mol. Cell* **2001**;8:693-704.
272. Budd DC, Willars GB, McDonald JE, Tobin AB: Phosphorylation of the Gq/11-coupled m3-muscarinic receptor is involved in receptor activation of the ERK-1/2 mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **2001**;276:4581-4587.
273. Trester-Zedlitz M, Burlingame A, Kobilka B, Zastrow M von: Mass spectrometric analysis of agonist effects on posttranslational modifications of the beta-2 adrenoceptor in mammalian cells. *Biochemistry* **2005**;44:6133-6143.
274. Gardner LA, Tavalin SJ, Goehring AS, Scott JD, Bahouth SW: AKAP79-mediated targeting of the cyclic AMP-dependent protein kinase to the beta1-adrenergic receptor promotes recycling and functional resensitization of the receptor. *J. Biol. Chem.* **2006**;281:33537-33553.
275. Torrecilla I, Spragg EJ, Poulin B, McWilliams PJ, Mistry SC, Blaukat A, Tobin AB: Phosphorylation and regulation of a G protein-coupled receptor by protein kinase CK2. *J. Cell Biol.* **2007**;177:127-137.
276. Wu S, Birnbaumer M, Guan Z: Phosphorylation analysis of G protein-coupled receptor by mass spectrometry: identification of a phosphorylation site in V2 vasopressin receptor. *Anal. Chem.* **2008**;80:6034-6037.
277. Gehret AU, Hinkle PM: Importance of regions outside the cytoplasmic tail of G-protein-coupled receptors for phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem. J.* **2010**;428:235-245.
278. Hoff M, Balfanz S, Ehling P, Gensch T, Baumann A: A single amino acid residue controls Ca²⁺ signaling by an octopamine receptor from *Drosophila melanogaster*. *FASEB J.* **2011**;25:2484-2491.
279. Bouvier M, Hausdorff WP, Blasi A de, O'Dowd BF, Kobilka BK, Caron MG, Lefkowitz RJ: Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature* **1988**;333:370-373.
280. Fredericks ZL, Pitcher JA, Lefkowitz RJ: Identification of the G protein-coupled receptor kinase phosphorylation sites in the human beta2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **1996**;271:13796-13803.

281. Seibold A, Williams B, Huang ZF, Friedman J, Moore RH, Knoll BJ, Clark RB: Localization of the sites mediating desensitization of the beta(2)-adrenergic receptor by the GRK pathway. *Mol. Pharmacol.* **2000**;58:1162-1173.
282. Kara E, Crépieux P, Gauthier C, Martinat N, Piketty V, Guillou F, Reiter E: A phosphorylation cluster of five serine and threonine residues in the C-terminus of the follicle-stimulating hormone receptor is important for desensitization but not for beta-arrestin-mediated ERK activation. *Mol. Endocrinol.* **2006**;20:3014-3026.
283. Stalheim L, Ding Y, Gullapalli A, Paing MM, Wolfe BL, Morris DR, Trejo J: Multiple independent functions of arrestins in the regulation of protease-activated receptor-2 signaling and trafficking. *Mol. Pharmacol.* **2005**;67:78-87.
284. Pollok-Kopp B, Hüttenrauch F, Rethorn S, Oppermann M: Dynamics of protein kinase C-mediated phosphorylation of the complement C5a receptor on serine 334. *J. Biol. Chem.* **2007**;282:4345-4353.
285. Pals-Rylaarsdam R, Hosey MM: Two homologous phosphorylation domains differentially contribute to desensitization and internalization of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* **1997**;272:14152-14158.
286. Gurevich VV, Benovic JL: Visual arrestin binding to rhodopsin. Diverse functional roles of positively charged residues within the phosphorylation-recognition region of arrestin. *J. Biol. Chem.* **1995**;270:6010-6016.
287. Mendez A, Burns ME, Roca A, Lem J, Wu LW, Simon MI, Baylor DA, Chen J: Rapid and reproducible deactivation of rhodopsin requires multiple phosphorylation sites. *Neuron* **2000**;28:153-164.
288. Vishnivetskiy SA, Raman D, Wei J, Kennedy MJ, Hurley JB, Gurevich VV: Regulation of arrestin binding by rhodopsin phosphorylation level. *J. Biol. Chem.* **2007**;282:32075-32083.
289. Kieselbach T, Irrgang KD, Ruppel H: A segment corresponding to amino acids Val170-Arg182 of bovine arrestin is capable of binding to phosphorylated rhodopsin. *Eur. J. Biochem.* **1994**;226:87-97.
290. Bennett TA, Foutz TD, Gurevich VV, Sklar LA, Prossnitz ER: Partial phosphorylation of the N-formyl peptide receptor inhibits G protein association independent of arrestin binding. *J. Biol. Chem.* **2001**;276:49195-49203.
291. Bayburt TH, Vishnivetskiy SA, McLean MA, Morizumi T, Huang C, Tesmer JJG, Ernst OP, Sligar SG, Gurevich VV: Monomeric rhodopsin is sufficient for normal rhodopsin kinase (GRK1) phosphorylation and arrestin-1 binding. *J. Biol. Chem.* **2011**;286:1420-1428.
292. Ferguson SS: Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* **2001**;53:1-24.
293. Krasel C, Zabel U, Lorenz K, Reiner S, Al-Sabah S, Lohse MJ: Dual role of the beta2-adrenergic receptor C terminus for the binding of beta-arrestin and receptor internalization. *J. Biol. Chem.* **2008**;283:31840-31848.
294. Gurevich VV, Gurevich EV: The molecular acrobatics of arrestin activation. *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**;25:105-111.
295. Reiner S, Ziegler N, Leon C, Lorenz K, Hayn K von, Gachet C, Lohse MJ, Hoffmann C: beta-Arrestin-2 interaction and internalization of the human P2Y1 receptor are dependent on C-terminal phosphorylation sites. *Mol. Pharmacol.* **2009**;76:1162-1171.
296. Richardson MD, Balius AM, Yamaguchi K, Freilich ER, Barak LS, Kwatra MM: Human substance P receptor lacking the C-terminal domain remains competent to desensitize and internalize. *J. Neurochem.* **2003**;84:854-863.
297. Klenk C, Vetter T, Zürn A, Vilardaga J, Friedman PA, Wang B, Lohse MJ: Formation of a ternary complex among NHERF1, beta-arrestin, and parathyroid hormone receptor. *J. Biol. Chem.* **2010**;285:30355-30362.
298. Jones BW, Hinkle PM: Arrestin binds to different phosphorylated regions of the thyrotropin-releasing hormone receptor with distinct functional consequences. *Mol. Pharmacol.* **2008**;74:195-202.
299. Déry O, Thoma MS, Wong H, Grady EF, Bunnnett NW: Trafficking of proteinase-activated receptor-2 and beta-arrestin-1 tagged with green fluorescent protein. beta-Arrestin-dependent endocytosis of a proteinase receptor. *J. Biol. Chem.* **1999**;274:18524-18535.
300. Hüttenrauch F, Nitzki A, Lin F, Höning S, Oppermann M: Beta-arrestin binding to CC chemokine receptor 5 requires multiple C-terminal receptor phosphorylation sites and involves a conserved Asp-Arg-Tyr sequence motif. *J. Biol. Chem.* **2002**;277:30769-30777.
301. Potter RM, Maestas DC, Cimino DF, Prossnitz ER: Regulation of N-formyl peptide receptor signaling and trafficking by individual carboxyl-terminal serine and threonine residues. *J. Immunol.* **2006**;176:5418-5425.

302. Liu Q, Dewi DA, Liu W, Bee MS, Schonbrunn A: Distinct phosphorylation sites in the SST2A somatostatin receptor control internalization, desensitization, and arrestin binding. *Mol. Pharmacol* **2008**;73:292-304.
303. Whalen EJ, Rajagopal S, Lefkowitz RJ: Therapeutic potential of β -arrestin- and G protein-biased agonists. *Trends Mol Med* **2011**;17:126-139.
304. Reiter E, Ahn S, Shukla AK, Lefkowitz RJ: Molecular mechanism of β -arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* **2012**;52:179-197.
305. Kim J, Ahn S, Ren X, Whalen EJ, Reiter E, Wei H, Lefkowitz RJ: Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**;102:1442-1447.
306. Ren X, Reiter E, Ahn S, Kim J, Chen W, Lefkowitz RJ: Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and beta-arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**;102:1448-1453.
307. Kelly E, Bailey CP, Henderson G: Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br. J. Pharmacol.* **2008**;153 Suppl 1:S379-88.
308. Gärtner F, Seidel T, Schulz U, Gummert J, Milting H: Desensitization and Internalization of Endothelin Receptor A: Impact of G Protein-coupled Receptor Kinase 2 (GRK2)-mediated Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2013**;288:32138-32148.
309. Bünemann M, Frank M, Lohse MJ: Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**;100:16077-16082.
310. Hein P, Rochais F, Hoffmann C, Dorsch S, Nikolaev VO, Engelhardt S, Berlot CH, Lohse MJ, Bünemann M: Gs activation is time-limiting in initiating receptor-mediated signaling. *J. Biol. Chem.* **2006**;281:33345-33351.
311. Adjobo-Hermans MJW, Goedhart J, van Weeren L, Nijmeijer S, Manders EMM, Offermanns S, Gadella TWJ: Real-time visualization of heterotrimeric G protein Gq activation in living cells. *BMC Biol.* **2011**;9:32.
312. Milasta S, Evans NA, Ormiston L, Wilson S, Lefkowitz RJ, Milligan G: The sustainability of interactions between the orexin-1 receptor and beta-arrestin-2 is defined by a single C-terminal cluster of hydroxy amino acids and modulates the kinetics of ERK MAPK regulation. *Biochem. J.* **2005**;387:573-584.
313. Frölich N, Dees C, Paetz C, Ren X, Lohse MJ, Nikolaev VO, Zenk MH: Distinct pharmacological properties of morphine metabolites at G(i)-protein and β -arrestin signaling pathways activated by the human μ -opioid receptor. *Biochem. Pharmacol.* **2011**;81:1248-1254.
314. Liebmann C: Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell. Signal.* **2001**;13:777-785.
315. Wettschureck N, Offermanns S: Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol. Rev.* **2005**;85:1159-1204.
316. Heineke J, Molkentin JD: Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**;7:589-600.
317. Heitzler D, Durand G, Gallay N, Rizk A, Ahn S, Kim J, Violin JD, Dupuy L, Gauthier C, Piketty V, Crépieux P, Poupon A, Clément F, Fages F, Lefkowitz RJ, Reiter E: Competing G protein-coupled receptor kinases balance G protein and β -arrestin signaling. *Mol. Syst. Biol.* **2012**;8:590.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

^{125}I -ET-1	mit ^{125}I markiertes ET-1
A	Alanin
AC	Adenylylzyklase
Ala	Alanin
AM	Acetoxymethyl
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp	Ampicillin
Arg	Arginin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i>
B_{max}	Anzahl spezifischer Bindungsstellen
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	<i>cyclic Adenosine Monophosphate</i>
CCD	<i>Charge-coupled Device</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CTE	C-terminale Extremität
D	Aspartat
DAG	Diacylglycerol
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	<i>Deoxyribonucleotide Triphosphate</i>
DPSS	<i>Diode pumped solid State</i>
E	Glutamat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECE	<i>Endothelin-converting Enzyme</i>
ECL	<i>extracellular Loop</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular Signal regulated Kinase</i>
ET-1	Endothelin 1
ET-1-HiLyte	mit HiLyte Fluor TM 488 markiertes ET-1
ET-2	Endothelin 2
ET-3	Endothelin 3
F	Phenylalanin
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	<i>fetal Calf Serum</i>
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
FSH	follikelstimulierendes Hormon

G Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GAP	<i>GTPase-activating Protein</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>Guanosid Exchange Factor</i>
Glu	Glutamat
GPCR	<i>G Protein-coupled Receptor</i>
GRK	GPCR-Kinase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEK	<i>Human embryonic Kidney</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HTRF	<i>Homogeneous Time-resolved Fluorescence</i>
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
ICL	<i>intracellular Loop</i>
IgG	Immunglobulin G
IP ₁	Myoinositol-1-Phosphat
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
Kan	Kanamycin
kb	Kilo-Basen
K _d	Dissoziationskonstante
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCS	<i>multiple Cloning Site</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PH	Pleckstrin Homologie
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
Phe	Phenylalanin
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
qRT-PCR	quantitative <i>Real Time</i> -PCR
R	Arginin
RGS	<i>Regulator of G Protein Signaling</i>
RH	RGS-Homologie
RhoA	<i>Ras homology Gene Family, Member A</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Serin

SD	<i>Standard Deviation</i>
SDS	<i>Sodium Dodecylsulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	<i>Standard Error of Mean</i>
Ser	Serin
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SOEing-PCR	<i>Splicing-by-Overlap-Extension-PCR</i>
T	Threonin
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris buffered Saline</i>
TBST	TBS-Tween 20
TE	Tris-EDTA
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
UNG	Uracil-DNA Glykosylase
UV	ultraviolett
v/v	<i>Volume per Volume</i>
w/v	<i>Weight per Volume</i>
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin
YFP	<i>yellow fluorescent Protein</i>

verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz	Verwendung (K, Klonierung; QCL, QuikChange Lightning; S, Sequenzierung; SP, SOEing-PCR)
EosFP_Seq_rev	ATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGG	S
ETA_A403T_a	CACTGGATGGCTGTTCCGTTTCATGGGGACCGA	QCL (pLPCX-ETA-5PD)
ETA_A403T_A404S_a	TGGTTCTTCCACTGGATGCTTGTCCGTTTCATGGGGACCGC	SP (pLPCX-ETA-11PD-A403T/A404S)
ETA_A403T_A404S_s	GCGGTCCCATGAACGGAACAAGCATCCAGTGAAGAACCA	SP (pLPCX-ETA-11PD-A403T/A404S)
ETA_A403T_s	TCGGTCCCATGAACGGAACAGCCATCCAGTG	QCL (pLPCX-ETA-5PD)
ETA_A404S_a	GTTCTTCCACTGGATGCTTGTCCGTTTCATGGGG	SP (pLPCX-ETA-11PD-A404S)
ETA_A404S_s	CCCATGAACGGAGCAAGCATCCAGTGAAGAAC	SP (pLPCX-ETA-11PD-A404S)
ETA_A417T_a	ATGGGCGGCCGGTCTGTGTTGTGTTGTTTTG	QCL (pLPCX-ETA-3PD)
ETA_A417T_a2	ATGGCTGGCCGGTCTGTGTTGTGTTGTTTTG	QCL (pLPCX-ETA-5PD-A417T/A421S)
ETA_A417T_s	CAAAACAACCACAACACAGACCGGGCCGCCAT	QCL (pLPCX-ETA-3PD)
ETA_A417T_s2	CAAAACAACCACAACACAGACCGGGCCGCCAT	QCL (pLPCX-ETA-5PD-A417T/A421S)
ETA_A420S_a2	CTGTCCTTATGGCTGCTCCGGTCTGCGTTGTG	QCL (pLPCX-ETA-S404A/T417A)
ETA_A420S_NotI_r	AAGCGGCCGCTCAGTTCATGGCGTCTTATGGCTGCT	K (pLPCX-ETA-S404A/S425A)
ETA_A420S_s2	CACAACGCAGACCGGAGCAGCCATAAGGACAG	QCL (pLPCX-ETA-S404A/T417A)
ETA_A421S_a	GGCGTCTTATGGCTGGCCGGTCTGCG	QCL (pLPCX-ETA-5PD-A421S)

ETA_A421S_s	CGCAGACCGGGCCAGCCATAAGGACGCC	QCL (pLPCX-ETA-5PD-A421S)
ETA_A425S_a2	GCCGCTCAGTTCATGCTGCTTATGGCTGGC	QCL (pLPCX-ETA-5PD-A421S/A425S)
ETA_A425S_s2	GCCAGCCATAAGGACAGCATGAACTGAGCGGC	QCL (pLPCX-ETA-5PD-A421S/A425S)
ETA_AgeI_r	ACCGGTCCGTTTCATGCTGCTTATGGCTGCTC	K (ETA-mRuby)
ETA_NotI_r	GCGGCCGCCATAAAAGCTAGCCATGTACTTGAAAGC	K (pLPCX-ETA-WT); SP (pLPCX-ETA-Y184E, pLPCX-ETA-S404A, pLPCX-ETA-S420A, pLPCX-ETA-S404A/S420A)
ETA_S295A_a	ACGCTGCTTAAGATGTTTCAGCGAGGGCAATTCTCAAGCTG	QCL (pLPCX-ETA-S295A)
ETA_S295A_s	CAGCTTGAGAATTGCCCTCGCTGAACATCTTAAGCAGCGT	QCL (pLPCX-ETA-S295A)
ETA_S382A_a	CAGCAGCAGCAGAGGCATGCTGGAACAATTTTTAAAT	QCL (pLPCX-ETA-11PD)
ETA_S382A_s	ATTTAAAAATTGTTCCAGGCATGCTCTGCTGCTGCTG	QCL (pLPCX-ETA-11PD)
ETA_S391A_a2	GGTCATCAGACTTTTGGCCTGGTAACAGCAGCAGC	SP (pLPCX-ETA-4PD-S391A)
ETA_S391A_s2	GCTGCTGCTGTTACCAGGCCAAAAGTCTGATGACC	SP (pLPCX-ETA-4PD-S391A)
ETA_S393A_a	GACCGAGGTCATCAGAGCTTTGGACTGGTAACAGCAGC	QCL (pLPCX-ETA-S393A, pLPCX-ETA-4PD-S393A)
ETA_S393A_a2	GCGGCCCATCAGAGCTTTGGACTGGTAACAGCAGC	QCL (pLPCX-ETA-9PD)
ETA_S393A_s	GCTGCTGTTACCAGTCCAAAGCTCTGATGACCTCGGTC	QCL (pLPCX-ETA-S393A, pLPCX-ETA-4PD-S393A)
ETA_S393A_s2	CTGCTGTTACCAGTCCAAAGCTCTGATGGCCGCG	QCL (pLPCX-ETA-9PD)
ETA_S397A	CAAAAGTCTGATGACCGCGGTCCCATGAACGG	QCL (pLPCX-ETA-S397A, pLPCX-ETA-7PD, pLPCX-ETA-4PD-S397A)
ETA_S397A_a	CCGTTTCATGGGGACCGCGGTCATCAGACTTTTG	QCL (pLPCX-ETA-S397A, pLPCX-ETA-7PD, pLPCX-ETA-4PD-S397A)
ETA_S404A_a	GGTTCCTTCCACTGGATGGCTGTTCCGTTTCATGGGGA	SP (pLPCX-ETA-S404A); QCL (pLPCX-ETA-S404A/S421A)
ETA_S404A_s	TCCCCATGAACGGAACAGCCATCCAGTGGGAAGAACC	SP (pLPCX-ETA-S404A); QCL (pLPCX-ETA-S404A/S421A)
ETA_S420A	CCACAACACAGACCGGGCCAGCCATAAGGACAGC	SP (pLPCX-ETA-S420A, pLPCX-ETA-S404A/S420A)
ETA_S420A_a	GCTGCTTATGGCTGGCCCGGTCTGTGTTGTGG	SP (pLPCX-ETA-S420A, pLPCX-ETA-S404A/S420A)
ETA_S421A_a	CATGCTGCTTATGGGCGCTCCGGTCTGTGTTG	QCL (pLPCX-ETA-S421A)
ETA_S421A_a3	CATGGCGTCTTATGGGCGCTCCGGTCTGTGTTG	QCL (pLPCX-ETA-2PD)
ETA_S421A_s	CAACACAGACCGGAGCGCCATAAGGACAGCATG	QCL (pLPCX-ETA-S421A)
ETA_S421A_s3	CAACACAGACCGGAGCGCCATAAGGACGCCATG	QCL (pLPCX-ETA-2PD)
ETA_S425A_a	GGGTGGTCAGTTCATGGCGTCTTATGGCTGCTC	QCL (pLPCX-ETA-S425A)
ETA_S425A_s	GAGCAGCCATAAGGACGCCATGAACTGACCACCC	QCL (pLPCX-ETA-S425A)
ETA_T396A_a	TTCATGGGGACCGAGGCCATCAGACTTTTGGAC	QCL (pLPCX-ETA-T396A, pLPCX-ETA-4PD-T396A)
ETA_T396A_s	GTCCAAAAGTCTGATGGCCTCGGTCCCATGAA	QCL (pLPCX-ETA-T396A, pLPCX-ETA-4PD-T396A)
ETA_T403A	GTCCCATGAACGGAGCAAGCATCCAGTGGAA	QCL (pLPCX-ETA-T403A), SP (pLPCX-ETA-4PD-T403A)
ETA_T403A_a	TCCACTGGATGCTTGTCCGTTTCATGGGGAC	QCL (pLPCX-ETA-T403A), SP (pLPCX-ETA-4PD-T403A)
ETA_T417A_a	GGTGTCTCCGGTCTGCGTTGTGTTGTTTTG	QCL (pLPCX-ETA-T417A)
ETA_T417A_s	CAAAAACAACCACAACGCAGACCGGAGCAGCC	QCL (pLPCX-ETA-T417A)
ETA_Y184D_a	GGAGGCAACTGCTCTGTCCCTGTCAACTAAGAG	QCL (pLPCX-ETA-Y184D)
ETA_Y184D_s	CTCTTAGTGTGGACAGGGACAGAGCAGTTGCCTCC	QCL (pLPCX-ETA-Y184D)

ETA_Y184E_a	CAGGAGGCAACTGCTCTCTCCCTGTCAACACTAAGAG	SP (pLPCX-ETA-Y184E)
ETA_Y184E_s	CTCTTAGTGTTGACAGGGAGAGAGCAGTTGCCTCCTG	SP (pLPCX-ETA-Y184E)
ETA_Y184F	GGAGGCAACTGCTCTGAACCTGTCAACACTAAG	QCL (pLPCX-ETA-Y184F)
ETA_Y184F_s	CTTAGTGTTGACAGGTTTACAGAGCAGTTGCCTCC	QCL (pLPCX-ETA-Y184F)
ETA12f	ACAACATTGCCACAGCAGA	S
ETA14f	ATGACTTTGGCGTATTTCTTTGCAAG	S
ETA16_f	CGAGATGGACAAGAACCGATGTGA	S
ETA1f	CTCCATCTGGATCCTGTCTTTATCCT	S; SP (pLPCX-ETA-4PD-S391A, pLPCX-ETA-4PD-T403A, pLPCX-ETA-11PD-A403T/A404S, pLPCX-ETA-S404A/S420A); K (pLPCX-ETA-S404A/S425A)
ETA3np_Agel_r	AAGACCGGTCCGTTTCATGGCGTCTTATGGGCG	K (ETA-14PD-mRuby)
ETA3PD_NotI_r	AAGCGGCCGCTCAGTTCATGGCGTCTTATGGGCG	SP (pLPCX-ETA-4PD-S391A, pLPCX-ETA-4PD-T403A, pLPCX-ETA-11PD-A403T/A404S)
ETA6f	GCCACATCAAAATTCATGGAG	S
GRK2_1f	GCCCTTGGTGGAATTCTATGAGGAG	S
GRK2_1r	GGATGCTGGGCTCGGGC	S
GRK2_2f	CTCAACATCCACCTGACCATGAATGA	S
GRK2_3f	CCAGCACGGGGTCTTCTCAGAG	S
GRK2_4f	CCTTCGGCAGCACAAAGA	S
GRK2_5f	TTGGCTCCTTCGATGAGGAG	S
GRK2_6f	CCCGCAGAGCCTGCTGA	S
GRK2_hs_D110A_as	CCTTCATGATGTATGAGGCGAAGATCTCCCGGCT	QCL (GRK2-D110A)
GRK2_hs_D110A_s	AGCCGGGAGATCTTCGCTCATACATCATGAAGG	QCL (GRK2-D110A)
GRK2_hs_K220R_as	GCTTTTGTCCAGGCACCTCATGGCGTACATCTTG	QCL (GRK2-D110A/K220R)
GRK2_hs_K220R_s	CAAGATGTACGCCATGAGGTGCCTGGACAAAAAGC	QCL (GRK2-D110A/K220R)
h-GRK2_for	GCCATTCAATTGTCTGCATGT	qRT-PCR (GRK2)
h-GRK2_rev	CCGTTTCATGAGGTCCAGGAT	qRT-PCR (GRK2)
h-GRK2_sonde	FAM-ATACGCGTTCCACACGCCAGACAA-TAMRA	qRT-PCR (GRK2)
h-L32_for	AAGTTCATCCGGCACCAGTC	qRT-PCR (Ribosomales Protein L32)
h-L32_rev	TGGCCCTTGAATCTTCTACGA	qRT-PCR (Ribosomales Protein L32)
h-L32_sonde	FAM-CCCAGAGGCATTGACAACAGGG-TAMRA	qRT-PCR (Ribosomales Protein L32)
mRuby_Mitte_rev	GTAAACGAGACAGCCATCCTCAAGG	S
mRuby_Ügang_rev	GCCGTTGACCGAACCTTCCAG	S
pLPCX_f	AGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATC	S
pLPCX_r	ACCTACAGGTGGGGTCTTTCATTCCC	S
S289Af	GAAGGAATGGCGCCTTGAAGATT	SOEing-PCR (pLPCX-ETA-S289A)
S289Ar	AATTCTCAAGGCGCCATTCCTTC	SOEing-PCR (pLPCX-ETA-S289A)
S391Af	GCTGTTACCAGGCCAAAAAGTCTGATG	SOEing-PCR (pLPCX-ETA-S391A)
S391Ar	TCATCAGACTTTTGGCCTGGTAACAGC	SOEing-PCR (pLPCX-ETA-S391A)
XhoI_ETA_f	CTCGAGTATTTCTCAAATTTGCCTCAAGATGGA	K (pLPCX-ETA-WT); SP (pLPCX-ETA-Y184E, pLPCX-ETA-S404A, pLPCX-ETA-S420A)

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1.	Signaltransduktion G_s -gekoppelter Rezeptoren.....	9
Abb. 1-2.	Signaltransduktion G_q -gekoppelter Rezeptoren.....	10
Abb. 1-3.	„Klassische“ Rezeptor Desensibilisierung.....	12
Abb. 1-4.	Posttranslationale Modifizierungen des ET_A -Rezeptors.....	19
Abb. 2-1.	Optimierung der Transfektion von HEK 293-Zellen.....	31
Abb. 3-1.	<i>Western-Blot</i> -Analyse zur Kontrolle der ET_A -Rezeptor-Expression.....	37
Abb. 3-2.	In dieser Arbeit verwendete Mutanten des ET_A -Rezeptors	39
Abb. 3-3.	Klonierungs-Strategie für die Gewinnung von ET_A -Rezeptor-Mutanten.....	40
Abb. 3-4.	Oberflächenexpression der verwendeten ET_A -Rezeptor-Mutanten	41
Abb. 3-5.	Ca^{2+} - <i>Imaging</i> -Experimente	43
Abb. 3-6.	Optimierung der cAMP-Bestimmung	44
Abb. 3-7.	Kopplung des ET_A -Rezeptors an $G\alpha_s$ und $G\alpha_i$	45
Abb. 3-8.	Optimierung der IP_1 -Bestimmung	47
Abb. 3-9.	Einfluss von Punktmutationen in der zweiten und dritten intrazellulären Schleife des ET_A -Rezeptors auf die PLC-Aktivität	49
Abb. 3-10.	Aktivität von ET_A -Rezeptor-Mutanten mit Mutationen im C-Terminus.....	50
Abb. 3-11.	Rolle von T403 und S404 in der Desensibilisierung des ET_A -Rezeptors	52
Abb. 3-12.	Einfluss von wenigen Ala-Substitutionen auf das Signal des ET_A -Rezeptors....	53
Abb. 3-13.	Imitierung einer Rezeptor-Phosphorylierung.....	54
Abb. 3-14.	Einfluss der Kinaseaktivität und der $G\alpha_q$ -Bindung von GRK2 auf das Signal des ET_A -Rezeptors.....	55
Abb. 3-15.	Einfluss eines GRK2- <i>Knockdowns</i> auf das Signal des ET_A -Rezeptors.....	57
Abb. 3-16.	Lokalisation des ET_A -Rezeptors in HEK 293-Zellen	58
Abb. 3-17.	β -Arrestin 2-Translokations-Experiment	59
Abb. 3-18.	Charakterisierung von HiLyte Fluor 488-markiertem ET-1.....	60
Abb. 3-19.	Internalisierung des wildtypischen und eines phosphorylierungsdefizienten ET_A -Rezeptors	62
Abb. 4-1.	Postulierte Phosphorylierungsabhängige und -unabhängige GRK2-vermittelte Desensibilisierung des ET_A -Rezeptors	78

Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1.	Übersicht über die verwendeten Geräte.....	21
Tab. 2-2.	Übersicht über die verwendeten Puffer, Medien und Lösungen.....	22
Tab. 2-3.	Übersicht über die verwendeten Reagenziensätze.....	23
Tab. 2-4.	Übersicht über die verwendeten Enzyme	24
Tab. 2-5.	Übersicht über die verwendeten Antikörper	23
Tab. 2-6.	Übersicht über die in dieser Arbeit eingesetzten bzw. als Ausgangsplasmid für Klonierungen verwendeten Konstrukte.....	24
Tab. 2-7.	Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme.....	25
Tab. 2-8.	PCR mit der Pfu-Polymerase.....	26
Tab. 2-9.	Kolonie-Kontroll-PCR	26
Tab. 2-10.	Quantitative <i>Real-Time</i> -PCR	30
Tab. 2-11.	Kenndaten der zur Fluoreszenzmikroskopie eingesetzten Filtersets.....	36
Tab. 3-1.	Charakterisierung der Bindung von ¹²⁵ I-ET-1 an ET _A -WT und ET _A -14PD	38
Tab. 4-1.	Übersicht der Desensibilisierung phosphorylierungsdefizienter ET _A -Rezeptor Mutanten.....	72