



universität
wien

MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

„Erzwungener Export des V2-Vasopressinrezeptors durch
Stabilisierung des Rezeptorproteins und durch Hemmung
der HSP90-ATPase“

verfasst von

Florian Puhm, BSc

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 066 830

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Masterstudium Molekulare Mikrobiologie und Immunbiologie

Betreut von:

Ao.Univ.Prof.Dr. Christian Nanoff

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG	1
DER VASOPRESSIN 2 REZEPTOR (V2R) – ÜBERBLICK.....	1
<i>V1a, V1b Rezeptoren</i>	1
STRUKTUR DES V2R	2
<i>Domänen des V2R</i>	2
Aminoterminus (N-Terminus)	2
Extrazelluläre Schleifen (extracellular loops, ECL)	3
Transmembrandomäne (transmembrane domain).....	3
Intrazelluläre Schleifen (intracellular loops, ICL)	4
Helix 8.....	4
Carboxyl-Terminus (C-Terminus)	5
Konformationsänderung bei der Aktivierung eines GPCR.....	5
<i>Systematische Analyse der Rezeptorstruktur</i>	8
FTIR (fourier-transform infrared) Analyse.....	8
Disulfidquervernetzung (<i>cross-linking</i>), Komplexierung von Metallionen	8
Site-directed spin labeling (SDSL).....	8
Ortspezifische/Gerichtete Mutagenese (site-directed mutagenesis)	9
Kristallstrukturanalyse.....	9
Gibt es eine Kristallstruktur des V2R?	10
Kernspinresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)	10
Molekulare Modellierung (<i>molecular modeling</i>).....	11
BIOSYNTHESE DES V2R	12
<i>Inserierung in die ER-Membran</i>	12
<i>Posttranslationelle Modifikationen</i>	12
N-Glykosylierung	12
O-Glykosylierung.....	13
Untersuchung der N- und O-Glykosylierung	13
Bildung von Disulfidbrücken	14
S-Palmitoylierung.....	14
Detektion von Palmitoylierung	15
INTRAZELLULÄRE RETENTION DES V2 REZEPTORS.....	16
<i>Identifikation destabilisierender Mutationen</i>	16
<i>Pharmakologische Chaperone und Alternativen</i>	17
<i>Evidenz für Qualitätskontrolle im ER</i>	19
Molekulare Chaperone	19
HSP70 und HSP40 Proteine.....	19
HSP90 Chaperone	21
<i>Evidenz für Qualitätskontrolle im ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC)</i>	22
Was ist das ERGIC	22
Qualitätskontrolle im ERGIC	22

<i>ERAD (ER-associated degradation)</i>	23
<i>ER-Stress und UPR (unfolded protein response)</i>	23
Signalwege der UPR.....	24
FUNKTION DES V2R	26
<i>G Protein abhängige Effekte</i>	26
Regulation von G Proteinen	26
Adenylatzyklasen und Protein Kinase A (PKA)	27
Untersuchung der Gs-Proteinkopplung	27
Aquaporine (AQP)	28
Aquaporin-2 (AQP-2)	28
<i>Arrestine und Internalisierung</i>	29
Bestimmung der Rezeptorinternalisierung und des Recyclings.....	30
Untersuchung der MAPK-Aktivierung.....	31
<i>Agonisten und Antagonisten</i>	31
Arginin-Vasopressin (AVP) und Oxytocin (OT).....	31
Synthetische Agonisten und Antagonisten.....	32
Bestimmung allosterischer Interaktionen	33
PHARMAKOTHERAPEUTISCHE SIGNIFIKANZ DES V2R	34
<i>Angeborener Renaler Diabetes Insipidus (NDI)</i>	34
<i>Inadäquate Antidiurese (syndrome of inappropriate antidiuresis, SIAD)</i>	34
<i>Von-Willebrand-Syndrom (VWD, Von-Willebrand-disease)</i>	34
Plasminogen-Aktivierung	35
Wirkung von Vasopressinrezeptoren in SCLC (small-cell lung carcinoma) und MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) Zellen	36
FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER MASTERARBEIT	37
METHODEN UND MATERIALIEN	38
PLASMIDE	38
ANTIKÖRPER.....	38
OLIGONUKLEOTIDE.....	39
ZELLKULTUR.....	39
<i>Kultivierung</i>	39
<i>Einfrieren zur Lagerung</i>	40
<i>Ernte von Zelllysaten</i>	40
<i>Transfektionsmethoden</i>	40
Polymer-DNA Komplexe	40
Alternativen.....	41
DNA Kalziumphosphat Präzipitate	41
DNA Lipid/Liposom Komplexe, Lipid-basierende Transfektion	41
Transfektion mit JetPEI von Polyplus	41
Transfektion mit JetPRIME von Polyplus	41
Generierung stabiler Linien nach Transfektion mit TurboFect von Fermentas.....	42
GENERIERUNG VON KOMPLEMENTÄRE DNA (CDNA) MIT REVERSE-TRANSCRIPTION PCR (RT-PCR) UND SPEZIFISCHE AMPLIFIKATION MIT PCR	42

<i>Extraktion der mRNA</i>	42
<i>reverse-transcription PCR (rtPCR)</i>	43
<i>Semi-quantitative PCR</i>	44
Horizontale Agarose-Gelelektrophorese	45
Protokoll.....	45
Auswertung mittels densitometrischer Analyse	45
Experimentelle Induktion von ER-Stress.....	46
DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS, FLUORESCENCE-ACTIVATED CELL SORTING)	47
<i>Experimentelle Bestimmung der Oberflächenexpression von V2R Konstrukten</i>	48
Auswertung der FACS-Daten	48
Auswertung des Pharmakochaperoning-Effekts von V2R-Antagonisten, Konzentrations-Wirkungsbeziehung	50
IMMUNZYTOCHEMIE	51
BESTIMMUNG DER cAMP-BILDUNG	52
<i>Messung von radioaktiv-markiertem cAMP</i>	52
Stimulation der Zellen	53
Chromatographie	53
Herstellen und Regeneration von DOWEX AG 50W-X4 bzw. Aluminiumoxid Säulchen.....	53
Isolierung des cAMP	53
Verwendung unterschiedlicher Zelltypen	54
Endogener Vasopressinrezeptor in HELA-Zellen.....	54
Waschschritt vor der Rezeptorstimulation	54
(KO-)IMMUNPRÄZIPITATION	55
<i>Ernte der Zellmembranen</i>	56
Solubilisation der Membranen mit Chaps oder n-Dodecyl- β -D-maltpyranoside (DDM).....	56
<i>Immunpräzipitation der solubilisierten Proben</i>	57
QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON PROTEINMENGEN.....	58
<i>Bicinchonische Säure (Bicinchonic Acid, BCA) in 96-Napf-Platten</i>	58
<i>Konzentrationsbestimmung nach Bradford</i>	58
AUFTRENNUNG VON PROTEINEN UND DARSTELLUNG MITTELS IMMUNOBLOTTING	59
<i>SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid Gel-Elektrophorese)</i>	59
<i>Immunoblot (Westernblot)</i>	60
ERGEBNISSE	61
LOKALISATION VON V2 REZEPTOR MUTANTEN	61
ESCORT DES V2 REZEPTORS ZUR PLASMAMEMBRAN DURCH ANTAGONISTEN	65
ESCORTEFFEKT VON SR121463 UND TOLVAPTAN AM WILDTYPISCHEN -V2R UND AN DEN MUTANTEN 273 UND 318	67
EFFEKT DES HSP90-INHIBITORS 17-DMAG	69
KANN DIE SIGNALGEBUNG EINER RETINIERTEN V2R MUTANTE DURCH PHARMAKOCHAPERONE WIEDERHERGESTELLT WERDEN?.....	71
IMMUNPRÄZIPITATION UNTERSCHIEDLICHER V2R-KONSTRUKTE: FLAG-V2R UND FLAG-V2R-GFP	74
REIFUNG DES V2R DURCH PHARMAKOCHAPERONE	77
KOIMMUNPRÄZIPITATION DER MOLEKULAREN CHAPERONE HSP90 UND HSP70 MIT DEM V2R	81

UNTERSCHIEDE IN DER TRANSIENTEN UND STABILEN EXPRESSION DES V2R	85
DETEKTION VON HSP90 UND HSP90-ASSOZIIERTEN CHAPERONEN.....	87
DISKUSSION	89
DER V2R WIRD DURCH FUSION MIT GFP UND PHARMAKOCHAPERONE STABILISIERT	89
17-DMAG ERHÖHT DIE OBERFLÄCHENEXPRESSION DES V2R.....	91
QUELLENVERZEICHNIS	93
ANHANG.....	108
LEBENS LAUF	108
ZUSAMMENFASSUNG.....	109
ABSTRACT	111
ABKÜRZUNGS LISTE.....	113

Einleitung

Der Vasopressin 2 Rezeptor (V2R) – Überblick

Der Vasopressin 2 Rezeptor (V2R) ist ein 371 Aminosäuren langes Polypeptid [66] und gehört zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) bzw. zur Familie der Rhodopsin-artigen-Klasse-A Rezeptoren. Durch einen Vergleich der Peptidsequenz der Transmembrandomäne ergeben sich als nächste Verwandte der Vasopressin 1a (V1aR), Vasopressin 1b (V1bR) und Oxytocinrezeptor. [69] Ihre Gene (*AVPR1A*, *-1B*, *-2* und *OXTR*) sind an unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert, auf dem X-Chromosom befindet sich lediglich das V2R-Gen. Der V2R repräsentiert ein Typ IV-Transmembranprotein und besteht aus 7 Transmembransegmenten (*transmembrane segments* TM1 bis TM7), die über 3 extrazelluläre und 3 intrazelluläre Schleifen (*extracellular loops* ECL1-ECL3 bzw. *intracellular loops* ICL1-ICL3) verbunden sind. Der N-Terminus befindet sich extrazellulär und der C-Terminus intrazellulär. Der endogene Ligand des V2R ist Arginin-Vasopressin (AVP); der V2-Rezeptor koppelt an stimulatorisches G Protein (Gs). Bei Aktivierung wird Adenylylzyklase stimuliert, die ATP (Adenosintriphosphat) in cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) umwandelt. In weiterer Folge kommt es an Epithelzellen des Sammelrohrs der Niere zur Insertion von Wasserkanälen (Aquaporinen) in die Plasmamembran und fördert so die Aufnahme von Wasser und Rückresorption von Wasser aus dem Harn. Für diese Reaktion ist Kalziumeinstrom erforderlich, der ebenfalls der V2R-Aktivierung folgt. Durch Phosphorylierung und anschließende Interaktion mit β -Arrestin wird der V2R internalisiert und desensibilisiert. [58]

V1a, V1b Rezeptoren

Die Vasopressinrezeptorsubtypen, V1a und V1b sind im Gegensatz zum V2 Rezeptor an das G Protein Gq gekoppelt und aktivieren Phospholipase C, Proteinkinase C und erhöhen die intrazelluläre Kalziumkonzentration. Der V1aR wird in vaskulären glatten Muskelzellen, Hepatozyten, Blutplättchen, Gehirn- und Uteruszellen exprimiert und ist verantwortlich für den "Vasopressor"-Effekt (Erhöhung des Blutdrucks) von AVP. Weitere wichtige Funktionen sind die Regulation von Glykogenolyse und Blutgerinnung. Der V1bR wird in der Neurohypophyse exprimiert und reguliert die Sezernierung des adrenocorticotrophen Hormons (ACTH). [94]

Struktur des V2R

Der V2R ist 371 Aminosäuren lang. [66] Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgt von N- nach C-Terminus. Typisch für einen GPCR besteht V2R aus folgenden Anteilen [66]:

Domäne	Aminosäuren [66]
N-Terminus, extrazellulär	1 bis 38
Transmembransegment I (TM1)	39 bis 63
Intrazelluläre Schleife I	64 bis 77
Transmembransegment II (TM2)	78 bis 98
Extrazelluläre Schleife I	99 bis 113
Transmembransegment III	114 bis 135
Intrazelluläre Schleife II	136 bis 159
Transmembransegment IV	160 bis 180
Extrazelluläre Schleife II	181 bis 200
Transmembransegment V	201 bis 220
Intrazelluläre Schleife III	221 bis 271
Transmembransegment VI	272 bis 293
Extrazelluläre Schleife III	294 bis 308
Transmembransegment VII	309 bis 328
Helix 8 *	329 bis 342
C-Terminus, intrazellulär	329 bis 371

* Helix 8 enthält eine amphipatische Sequenz nach dem Muster „HxxxHxxHH“ (x sind beliebige und H hydrophobe Seitenketten) [106] und ist für den V2R nicht auf Uniprot.org beschrieben. In der Kristallstruktur des Rhodopsinrezeptors und anderer Rezeptoren wurde eine solche Helix im C-Terminus allerdings identifiziert. [107]

Domänen des V2R

Aminoterminus (N-Terminus)

Nach Translokation in das endoplasmatische Retikulum wird der N-Terminus mit einem mannosereichen Oligosaccharid-N-Acetylglukosid an das Asparagin Position 22 verbunden (N-Glykosylierung bzw. *N-linked glycosylation*). Der V2R kann an Serin/Threonin O-glykosyliert werden, wobei die exakte Position der O-Glykosylierung nicht bestimmt wurde. Die Affinität für

AVP wird nicht durch einen Mangel an O-Glykosylierung beeinflusst. [7]

Extrazelluläre Schleifen (extracellular loops, ECL)

Durch eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen C112 und C192) sind ECL1 und ECL2 verbunden. Eine Mutation des C112 oder C192 führt zu einer drastischen Reduktion von Oberflächenexpression und Bindungsaffinitäten für AVP. Fehlen der Disulfidbrücke destabilisiert den Rezeptor während des Faltungsprozesses und es reduziert sich die Zahl der Rezeptoren, die vom Ort der Biosynthese an die Zelloberfläche verbracht wird. Ebenso vermindert ist die Fähigkeit Gs zu stimulieren. [23] Auch verschiedene andere Punktmutationen in den Extrazellulären Schleifen können sich auf die Bindungsaffinität für AVP auswirken und/oder zur intrazellulären Retention des Rezeptors führen. [8][11][24]

Transmembrandomäne (transmembrane domain)

An den Vasopressin/Oxytocin-Rezeptoren erfolgt die Bindung des Agonisten laut Computermodell über Glutamine (Q) und Lysine (K) innerhalb des von TM (Transmembransegment) 2 - TM7 [11] und ECL2 [11][59] gebildeten Ringes in einer 15Å tiefen Bucht auf der extrazellulären Seite. [9][11] Das Computermodell schlägt die Seitenketten Q92, Q96 in TM1, K116, Q119 in TM3, Q174, Q180 in TM4 und Q291 in TM6 als Kontaktpunkte vor, aber eine eindeutige Bestimmung steht aus.

Bei Mutation von K100D (in ECL1) , A110W, M120V, L175Y, R202S oder F307I verringert sich die Bindungsaffinität der nichtpeptidischen Vasopressinrezeptorantagonisten SR121463B (Sativaptan), SR49059 (Relcovaptan), SSR149415, OPC21268, OPC41061 (Tolvaptan), OPC31260. Obwohl laut Computermodell AVP Kontakt zu K100, M120, L175 und F307 haben soll, wird durch die genannten Mutationen (zu unähnlichen Aminosäuren) die Affinität für AVP nicht verändert. [9] Das heißt, dass diese Kontaktpunkte eine untergeordnete Bedeutung als Andockstellen für AVP haben. Da die molekularen Bindungsstellen für AVP und der Antagonisten jedoch überlappen, funktionieren alle der genannten Liganden als kompetitive Antagonisten.

Das NPXXY-Motiv (NPWIY im V2R) im TM7 ist wichtig für die Desensibilisierung des Rezeptors durch Clathrin vermittelte Endozytose, die Bindung von AVP und die G-Protein Kopplung. So wurde gezeigt, dass die Mutation Y325F die Internalisierung des Rezeptors verhindert [13], die Mutation P322H die Fähigkeit Adenylatzyklase zu stimulieren stark

einschränkt und die Mutation P322S die Affinität für AVP verringert. [11] Wahrscheinlich ist dieses Prolin für die Konformationsänderung bei der Aktivierung des V2R von Bedeutung [11], so wie es auch für den muskarinischen Acetylcholinrezeptor 3 (m3AChR) vorgeschlagen wurde. [41] Die neuesten Befunde sprechen am ehesten dafür, dass Prolin als „Helixbrecher“ die Sekundärstruktur des NPXXY-Motivs zu einer ausgedehnten Bewegung der Tyrosinseitenkette in Richtung auf TM5 befähigt. Das NPXXY Tyrosin bildet im aktiven Zustand den Brückenkopf einer Wasserbrücke zu Tyrosin in TM5; dieses Tyrosin ist im V2R offensichtlich nicht konserviert [102] Die Bedeutung bzw. Konfiguration der Wasserbrücke ist nicht klar. Die Rezeptoraktivierung ist selbst in einer Tyrosin-zu-Alaninmutante vollständig erhalten. [103]

Intrazelluläre Schleifen (intracellular loops, ICL)

Der ICL3 ist wichtig für die Kopplung des G Proteins Gs mit dem V2R. [11][12] Die Substitution des ICL3 des Gq-gekoppelten V1aR durch die ICL3 Sequenz des V2R ermöglicht die Kopplung von Gs und dem V1aR. Die Substitution des V2R-ICL2 durch V1aR-ICL2 ermöglicht die Aktivierung von Gq durch den V2R ohne die Gs Kopplung zu beeinträchtigen. [11] Speziell Q225 und E231 im ICL3, die Länge des mittleren Teils des ICL3 und die Helix 8 des V2R sind für die Gs Kopplung relevant. [18]

Affinitätschromatographie mit immobilisierten GPCR-Segmenten wie zum Beispiel einer zyklischen Form des ICL3 (bezeichnet als i3cyc), wurde angewendet um alternativ zur Koimmunpräzipitation mögliche Bindungspartner von GPCRs zu ermitteln. Mit dieser Methode wurde gC1qR (p33/p32) als Bindungspartner identifiziert. [69] Eine weitere Untersuchung mittels NMR, gestützt durch den strukturellen Vergleich mit Rhodopsin, vermutet den Arginin-Cluster R243-R252 im ICL3 als gC1qR Erkennungssequenz. [12] Zwar befindet sich gC1qR im ER, aber vor allem in den Mitochondrien, und beeinflusst die Zellproliferation [14][60], die Relevanz für den V2R ist jedoch ungeklärt. So hat beispielsweise die Mutation der Sequenz G245-G354 zu Alaninen keinen Effekt auf die Gs Kopplung. [18]

Helix 8

Die Aminosäuren E335, L339 und, zu einem geringeren Grad L340 sind Teil des VSSELRSL Motivs am N-terminalen Ende der Helix 8. Dieses Motiv ist nach dem Muster HxxxHxxHH (H für hydrophob, x für beliebige Seitenkette) gebildet und wichtig für den Export des V2R zur Plasmamembran. [16][19] Durch die Mutationen E335Q und L339T wird der Rezeptor im ER retiniert. [16] Bei der Mutation L339T kommt es wahrscheinlich zu einer Destabilisierung der

ringförmigen Rezeptorkonfiguration, da L339 eine Verbindung zu L62 des ICL1 herstellt. Mutation von L62 (Substitution oder Deletion) führt ebenfalls zur intrazellulären Retention des V2R. [19] Auch die Mutationen F328T oder F328A, S329A, V332A und L336T oder L336A führen zur Retention. [15] Offensichtlich ist die Struktur der Helix 8 darin optimiert die Konformation der cytoplasmatischen Transmembrandomäne zu stabilisieren, eine Voraussetzung für eine stabile, exportkompetente Struktur von Rezeptoren. [103] Molecular Modeling am Cannabinoid CB1-Rezeptor hat bestätigt, dass in der Membranumgebung die Einführung von Helix 8 die freie Energie der Rezeptorstruktur minimiert. [70]

Am C-terminalen Ende der Helix 8 befinden sich 2 palmitoylierte Cysteine (C341, C342), die den C-Terminus in der Membran verankern. [9][55] Fehlt diese Palmitoylierung reduziert sich die Oberflächenexpression des V2R vermutlich infolge gehemmter Internalisierung [55][104] Der Umkehrschluss, dass Einführung einer Palmitoylierung in den Rezeptor-C-Terminus (des nicht-palmitoylierten A_{2A}-Adenosinrezeptors) die Oberflächenexpression steigert, trifft hingegen nicht notwendigerweise zu. [105]

Carboxyl-Terminus (C-Terminus)

Der C-Terminus wird von GPCR Kinasen (GRKs) in Abhängigkeit des gebundenen Agonisten (z.B. AVP) phosphoryliert. Arrestine binden an phosphorylierte GPCRs, verhindern die Aktivierung von G Proteinen und initiieren die Internalisierung des Rezeptors. [3][10] Als Erkennungssequenz für GRKs gelten diacidische Motive gefolgt von einem Serin. Der V2R hat ein solches DE-Motiv und wurde zusammen mit GRK5 immunpräzipitiert. [21] Phosphorylierung der Serine und Threonine der Positionen 345 bis 364 reguliert die Internalisierung und das Recycling des Rezeptors an die Plasmamembran. [20]

Das RGR-Motiv im C-Terminus des V2R bindet aktives Kalzium-ligiertes Calmodulin. Die Bindung korreliert mit der Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration, die der Aktivierung des V2R z.B. im Sammelrohrepithel folgt. [17]

Konformationsänderung bei der Aktivierung eines GPCR

In welcher Reihenfolge und auf welche Art sich die Bindungsstelle des G Proteins öffnet, wurde im Rhodopsinrezeptor mittels FTIR (*fourier-transform infrared*) Analyse untersucht. Hierfür wurde an bestimmten Stellen des Rhodopsinrezeptors eine Aminosäure mit dem synthetischen P-azido-L-Phenylalanin (azF) substituiert. Kommt es zur Positionsvariation des azF und einer

damit verbundenen Polarisationsänderung, ändert sich auch das durch FTIR erhaltene Spektrum des Rhodopsinrezeptors. Die Untersuchung hat gezeigt, dass die vollständige Aktivierung in 2 Stufen abläuft. Von intrazellulärer Seite aus betrachtet befinden sich TM5 mit TM3 und TM3 mit TM6 im inaktiven Zustand in Kontakt. In Stufe 1 schwächt die Rezeptoraktivierung zunächst die Verbindung TM5-TM3. Dies führt zu einer leichten Kippbewegung des TM5 und einer Rotation des TM6 im Uhrzeigersinn. In Stufe 2 kommt es zu einer größeren Bewegung des TM5 und TM6, die Verbindung TM3-TM6 wird unterbrochen und eine neue Interaktion zwischen TM5 und TM6 (bzw. zwischen TM5 und dem NPXXY-Motiv in TM7) entsteht. Durch diese Konformationsänderung öffnet sich eine eingewölbte Bindungsstelle für den Carboxyterminus der G Protein α -Untereinheit. [68]

Die Verwendung anderer Methoden, wie Kristallographie, Disulfidquervernetzung (*cross-linking*), FRET (*Förster* bzw. *fluorescence resonance energy transfer*), SDSL (*site-directed spin labeling*) zur Untersuchung der Konformationsänderung eines GPCR [51] stützt die mit FTIR erhaltenen Ergebnisse. Auch beim muskarinischen Acetylcholinrezeptor 3 (m3AChR) und dem β 2-Adrenorezeptor (β 2-AR) rotiert das TM6 im Uhrzeigersinn und entfernt sich vom TM3 durch eine Kippbewegung. Werden die Enden des TM6 und TM3 durch Quervernetzung (Disulfidbrücken oder Komplexierung mit Metallionen) künstlich verbunden, ist diese Bewegung und die Aktivierung des Rezeptors gehemmt. Die Annäherung von TM6 und TM5 ist ebenfalls für den m3AChR und den β 2-AR sichtbar. Änderungen in der Position von TM1 zu TM7 oder Helix8, die anhand von Ergebnissen der Disulfidquervernetzung vorhergesagt wurden, wurden in den Kristallstrukturen aktivierter Rezeptoren nicht bestätigt. Helix8 und TM1 sind nach dem heutigen Wissenstand nicht unmittelbar an der G-Proteinaktivierung beteiligt. [41]

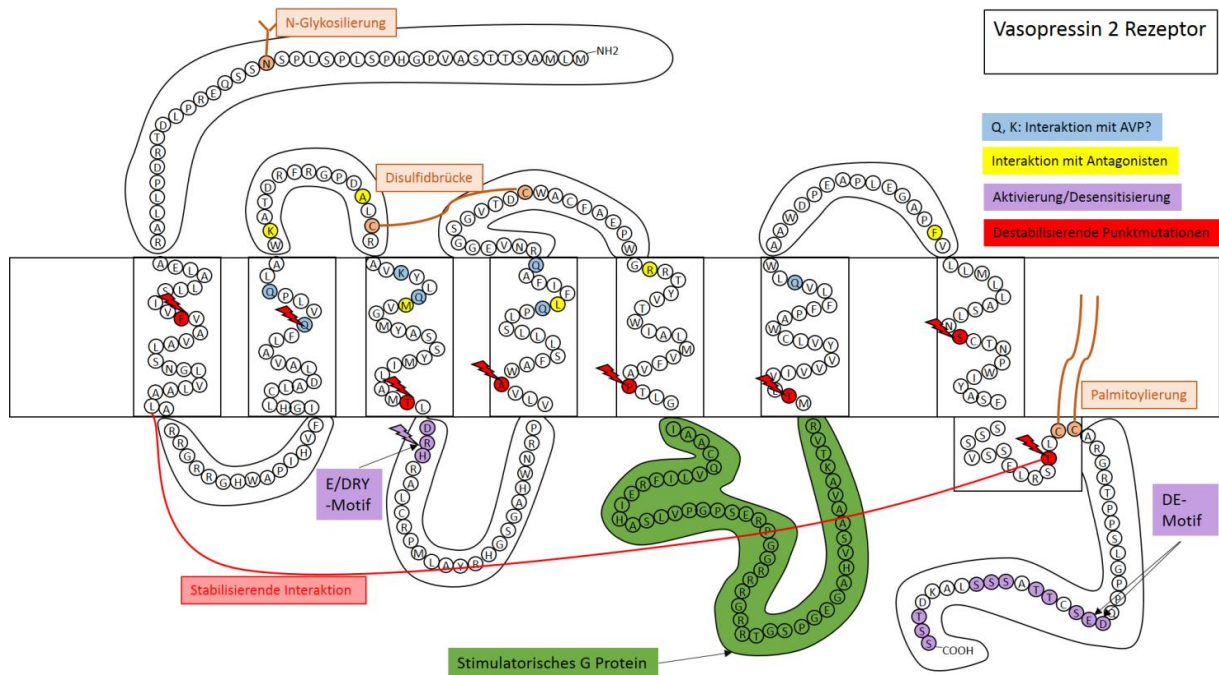


Abbildung (1.1), Topologie des Vasopressin 2 Rezeptors: Schematische Darstellung der Position der Aminosäuren (extrazellulär, transmembranär, intrazellulär) des V2R, wie auf uniprot.org beschrieben. Posttranslationelle Modifikationen (N-Glykosylierung, Disulfidbrücke, Palmitoylierung) sind in orange gezeigt. [7][9][23][55] Aminosäuren, die als Kontaktpunkte für Antagonisten dienen, sind in gelb, vorgeschlagene Bindungsstellen für Vasopressin in hellblau dargestellt. [9][11][59] Der ICL3 (in grün) wird als wichtigste Interaktionsstelle mit dem stimulatorischen G Protein Gs gezeigt. [11][12] In rot sind ausgewählte Positionen eingezeichnet, die bei Mutation zur intrazellulären Retention des Rezeptors führen und im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden. In violett sind Seitenketten markiert, deren Mutation zur konstitutiven Aktivierung des V2R führen kann (E/DRY-Motiv bzw. DRH, [10]) bzw. die Phosphorylierung und Arrestin-vermittelte Internalisierung fördern [21].)

Systematische Analyse der Rezeptorstruktur

FTIR (fourier-transform infrared) Analyse

FTIR ist eine spektroskopische Methode bei der infrarote Strahlung von einer Probe absorbiert wird. Das erhaltene Absorptionsspektrum ist einzigartig für jedes Molekül bzw. jede Molekülstruktur [75]. Das Verfahren, erprobt in der Analyse von organischen Stoffen, kann zur Strukturbestimmung von Proteinen adaptiert werden, vorausgesetzt das Polypeptid ist an vorbestimmten Stellen durch Infrarotsonden markiert. [68]

Disulfidquervernetzung (*cross-linking*), Komplexierung von Metallionen

Die Geschwindigkeit der Bildung einer Disulfidbrücke ist abhängig von konformationeller Flexibilität, sowie von Abstand und Orientierung zweier Cysteine zu einander. Durch die Substitution bestimmter Aminosäuren mit Cystein kann untersucht werden ob sich der Abstand zwischen zwei Domänen verringert oder vergrößert. [51] Beispielsweise kann so die Entstehung einer Disulfidbrücke zwischen den beiden eingeführten Cysteinen nach Bindung des Agonisten an den GPCR zeigen, welche Domänen des GPCR bei der Aktivierung miteinander in Kontakt treten. Für eine brauchbare Aussage muss die Spezifität der Quervernetzung durch multiple Substitutionen geprüft werden. Um Disulfidquervernetzung zwischen Rezeptorsegmenten zu detektieren, kann eine enzymatisch-spaltbare Sequenz im ICL3 eingeführt werden. Nach Auftrennung unter nicht-denaturierenden Bedingungen sollte ein Rezeptor, der nicht durch die Disulfidbrücke zusammengehalten wird, in 2 Teile zerfallen sein. Konkret wurde diese Technik zur Untersuchung des M3-Rezeptors durch Einführung einer durch Faktor Xa spaltbaren Sequenz im ICL3 angewandt. [41]

Eine ähnliche Methode ist die Substitution bestimmter Positionen durch Histidin, welches mit Metallionen (Zn^{2+} , Cu^{2+}) komplexiert. Zugabe von Metallionen zu einem derart modifizierten Rezeptor kann nun ähnliche Konformationsänderungen und Effekte wie Bindung eines Liganden auslösen bzw. direkt zur Stabilisierung in einer inaktiven Form führen. [51]

Site-directed spin labeling (SDSL)

Auch bei dieser Methode werden bestimmte Aminosäuren durch Cystein ersetzt. Nitroxidgekoppelte Molekülsonden können mit diesen Cysteinen reagieren und Seitenketten schaffen, die über Elektronenspinresonanz (*electron paramagnetic resonance*) detektiert werden. Mit dieser

Methode kann die Beweglichkeit der Seitenketten, die Zugänglichkeit zu Lösungsmittel und der Abstand zwischen zwei Seitenketten untersucht werden. [51] Ein ähnliches Verfahren benützt die Bindung eines SH-gruppenspezifischen Reagenz, 4,4'-Dithiopyridine. Nach Permutation des Rezeptorproteins kann aus der Geschwindigkeit, mit der einzelne Cysteine das 4,4'-Dithiopyridine per Disulfidbrücke binden, die Exponiertheit der Seitenkette abgeschätzt werden.

Die drei Methoden (Disulfidquervernetzung, Komplexierung mit Metallionen, SDSL) setzen voraus, dass die permutierte Rezeptorsequenz (Einführung und Entfernung von Seitenketten) sich ähnlich faltet wie das native Molekül, Voraussetzung für Export und Funktion. Native Cysteine in ECL2 und TM3 stabilisieren durch eine Disulfidbrücke hingegen die native Konfiguration in vielen GPCRs und steuern dadurch die globale Faltung. [6]

Ortsspezifische/Gerichtete Mutagenese (site-directed mutagenesis)

Aus der Untersuchung von V2R Mutanten, die an Diabetes insipidus Patienten isoliert wurden, können Aussagen über die Funktion einzelner Aminosäuren oder Aminosäuremotive gemacht werden. [2] Die in meiner Masterarbeit verwendeten Rezeptormutanten wurden anhand eines Strukturmodells (Schablone war die Kristallstruktur von Rhodopsin und des β -adrenergen Rezeptors) generiert [5]. Ich habe Mutationen untersucht, die zu einem maximalen Transportdefekt und zur intrazellulären Retention des Rezeptors führten (siehe Abb. 1.1).

Um gezielt eine oder mehrere Basen in einem DNA-Strang zu substituieren, werden Oligonucleotide synthetisiert, die für den Zielbereich komplementär sind und an ausgewählten Stellen die gewünschte Abweichung (bzw. Mutation) von der Wildtypsequenz aufweisen. Oligonukleotidprimer mit einer mittig in der Sequenz gelegenen Mutation werden verwendet um den parentalen Strang zu amplifizieren. Genau genommen wird das gesamte Plasmid, welches den zu mutierenden Strang trägt, vervielfacht. Durch Restriktionsverdau mit Dpn1, welches nur methylierte DNA angreift, wird die parenterale Sequenz verdaut. Das verbleibende Plasmid mit der mutierten Sequenz kann zur Transformation kompetenter Zellen verwendet werden. [5][22]

Kristallstrukturanalyse

Mit dieser Methode kann die Struktur eines Makromoleküls dargestellt werden. Das zu untersuchende Protein muss unter Bedingungen gereinigt und konzentriert werden, die eine Kristallisation begünstigen. Diese Bedingungen werden durch Versuche, bei denen Temperatur, pH-Wert, Anwesenheit von Salzen und organischen Verbindungen, variiert werden, ermittelt. Die

Kristalle werden in Quarzkapillaren geladen und mit monochromatischer Röntgenstrahlung ($\lambda=0,15\text{nm}$) bestrahlt. Anhand des entstandenen Beugungsmusters können Rückschlüsse auf die Struktur des Proteins gezogen werden. [4]

Gibt es eine Kristallstruktur des V2R?

Für folgende Klasse 1 GPCRs liegen aufgeklärte Strukturen bereits vor: Rhodopsin (*bovine rhodopsin*, *squid rhodopsin*), β -Adrenorezeptoren (*avian $\beta 1$ -AR*, *human $\beta 2$ -AR*), einen muskarinischen Acetylcholinrezeptorsubtyp (*human m2AChR*), den A2A-Adenosin-, den H1 Histamin- (*human H1R*) und den D3 Dopaminrezeptor (*human D3R*). In jedem Fall wurden die Kristallstrukturen zunächst von inaktiven Konformationen durch Bindung von inversen Agonisten oder neutralen Antagonisten erhalten. Von den β -adrenergen Rezeptorsubtypen, dem A2A-Adenosinrezeptor sowie von Opsin wurden Kristalle nach Bindung eines Agonisten generiert. Somit liegen von diesen Rezeptoren auch Strukturen der aktiven bzw. einer quasi-aktiven Konformation vor. Zusätzlich konnte der ternäre Komplex Agonist, $\beta 2$ -AR und G Protein im aktiven Stadium bestimmt werden. [1].

Die Anwendung der genannten Methoden stößt an Grenzen. Durch die Kürzung flexibler Regionen, wie zum Beispiel des Carboxyl- und Aminoterminus, wurde der Informationsgehalt der erhaltenen Struktur verringert. Zur Stabilisierung von ICL3, der zumeist längsten intrazellulären Peptidschleife wurde mit T4 Lysozym fusioniert. Andere Methoden der Strukturstabilisierung umfassen die Einführung von thermodynamisch stabilisierenden Mutationen oder die Bindung von Antikörperfragmenten an intra- oder extrazelluläre Sequenzen. Es ist offensichtlich, dass die erhaltenen Konformationen des Rezeptors nicht den natürlich vorkommenden entsprechen müssen. [1] Obwohl die erhaltenen Abbilder der Rezeptorstruktur die native Konformation der cytoplasmatischen bzw. extrazellulären Domänen weitgehend unbestimmt lassen, geben sie der vorhandenen Evidenz zur Konfiguration der Transmembrandomäne die bisher verlässlichste Bestätigung.

Kernspinresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)

Bei NMR-Spektroskopie wird die Absorption beziehungsweise Frequenzänderung einer elektromagnetischen Strahlung durch bestimmte Isotope detektiert. In biologischen Proben sind die Isotope ^{31}P , ^{15}N , ^{13}C und ^1H relevant. Die Frequenzänderung ist abhängig davon in welcher funktionellen Gruppe sich das Isotop befindet und wie nahe weitere der genannten Isotope

liegen. Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode gegenüber Kristallstrukturanalysen ist, dass Proteine in wässriger Lösung bzw. Rezeptoren in der Phospholipiddoppelschicht vorliegen und keine Kristallisation notwendig ist. Dadurch ist es möglich die Struktur und etwaige Änderungen der Konformation des Proteins in Echtzeit zu beobachten. [4] Ein erstes Beispiel zeigt die Struktur des Chemokinrezeptors CXCR1, genauer seiner Transmembrandomäne, bestimmt durch Festphasen NMR. [71]

Molekulare Modellierung (*molecular modeling*)

Sobald die 3D-Struktur eines Proteins bekannt ist, können Strukturänderungen bedingt durch Variation in Temperatur, pH-Wert, Änderung der ionischen Bindungsstärke, Aminosäuresubstitutionen und Interaktion mit Liganden (*molecular docking*) mit einem Computer simuliert werden. Falls für das gegebene Protein noch keine 3D-Struktur vorliegt, kann, ausgehend von einem verwandten Protein mit bekannter 3D-Struktur, ein Homologiemodell (*homology modeling*) erstellt werden. [4] Im Prinzip nähert der zugrunde liegende Algorithmus die Position vorgeschlagener Peptidbindungen einem Zustand minimaler freier Energie und zwar durch Variieren der Winkel in den Peptidbindungen. Computermodelle, wie sie hier entstehen, benötigen eine Validierung durch ein biologisches Experiment. Vorhersagen zur Struktur-Wirkungsbeziehung müssen durch Generieren und Testen von mutanten Proteinspezies geprüft werden.

Biosynthese des V2R

Inserierung in die ER-Membran

Die Inserierung eines GPCR in die Membran erfolgt kotranslationell. Ein Komplex aus 7S RNA und 6 Polypeptiden, das *signal-recognition-particle* (SRP), bindet an die Polypeptidkette bei Austritt aus dem Ribosom und stoppt die Elongation. Wie der Name sagt, erkennt SRP eine Signalpeptidsequenz, die - mit Ausnahmen - der Rezeptorsequenz fehlt. In diesem Fall substituiert die erste TM- α -Helix für das Signalpeptid. Der SRP-Polypeptid-Ribosom Komplex wird in der ER-Membran auf cytoplasmatischer Seite von einem SRP-Rezeptor erkannt und so in die Nähe des Translokons (Sec61) gebracht. Das N-terminale Ende der Polypeptidkette nimmt bei Beginn der Translokation die Form eines Nadelöhrs an, vermutlich um das Translokon, das durch BiP (*binding immunoglobulin protein*) blockiert ist, zu öffnen. Nach Bindung an seinen Rezeptor dissoziiert das SRP ab und die Elongation wird fortgesetzt. Sofern die Polypeptidkette N-terminal eine Signalsequenz (Signalpeptid) enthält, dient diese als erster Membrananker. Das Signalpeptid wird zusammen mit der anschließenden Peptidsequenz bis zum Auftreten der ersten Stoptransfersequenz transloziert. Dadurch verbleibt das Polypeptidende N-terminal an der Membran verankert. Eine Peptidase spaltet schließlich das Signalpeptid ab und der N-Terminus kann seine Konformation im ER-Lumen einnehmen. Weitere hydrophobe Regionen der Polypeptidkette dienen anschließend abwechselnd als Membrananker und Stoptransfersequenzen. [6] 90% der GPCRs [6], so auch Vasopressin Rezeptoren [32], enthalten jedoch kein Signalpeptid. Stattdessen dient das TM1 als erster Membrananker. Der N-Terminus wird nach der vollständigen Inserierung des TM1 in die Membran in das ER-Lumen transloziert. Der weitere Verlauf der Translokation ist wie zuvor beschrieben. Am Ende von Translation und Translokation befindet sich der N-Terminus im ER-Lumen, ICL1-3, der C-Terminus im Zytoplasma. [6]

Posttranslationelle Modifikationen

N-Glykosylierung

Oligosaccharyltransferase (OST) ist mit dem Translokon assoziiert. Sobald ein ungefaltetes Polypeptid aus dem Translokon in das ER-Lumen eintritt, sucht OST nach einem NXS/T-Motiv, an das sie Oligosaccharid docken kann. OST überträgt ein vorgefertigtes, verzweigtes

Oligosaccharid [Glukose3-Mannose9-N-Acetylglucosid2] von membrangebundenem Dolicholpyrophosphat auf die Polypeptidkette und etabliert eine N-glykosidische Bindung mit Asparagin (N). [6] Die endständige Glucose wird von Glucosidase I (GLCI) und eine weitere Glucose von Glucosidase II (GLCII) entfernt. So entsteht [Glucose1-Mannose9-N-Acetylglucosid2], für welches die Lektine Calnexin und Calreticulin eine hohe Affinität haben. Calnexin ist wie OST mit dem Translokator assoziiert und erkennt Substrate bereits kotranslationell. Calreticulin ist löslich und interagiert mit Glykoproteinen, nachdem sie vom Ribosom freigegeben worden sind. Beide Lektine erkennen zusätzlich hydrophobe Regionen, die von einem ungefalteten Glykoprotein exponiert werden. Erhöht sich der Grad der Faltung, sodass alle hydrophoben Regionen im Inneren des Proteins begraben sind, wird die Bindung der Lektine schwächer. Sobald die letzte Glucose von GLCII entfernt wird, dissoziieren die Lektine. Sofern die native Konformation des Proteins nicht erreicht ist, kann das Protein von UDP-Glucosyltransferase reglucosyliert und erneut von Calnexin/Calreticulin (Calcium-abhängig; im ER in hohen Konzentrationen vorhanden) erkannt werden. Calnexin/Calreticulin haben somit die Eigenschaft nicht-native Proteine im ER festzuhalten (Retention). Voraussetzung ist, dass die Glucosyltransferase über den Faltungszustand des Proteins informiert ist. Zu dem bringt diese Interaktion das Protein in die Nähe von ERP57 (eine Thioloxydoreduktase und Mitglied der Proteindisulfidisomerasefamilie), welches Isomerisierung des Glykoproteins und die Bildung von Disulfidbrücken unterstützt. Sofern ein Glykoprotein deglucosyliert ist, das ER jedoch nicht verlässt und nicht reglucosyliert wird, kann es über ER assoziierten Verdau (*ER associated degradation*, ERAD) entfernt werden. [6][27] ER-ständige Mannosidasen spalten endständige Mannose von Glykoproteinen, die nicht mehr durch Lektine okkupiert sind, und das Protein wird in den Golgi weiter transportiert. Im Golgi entfernt Golgimannosidase I drei weitere Mannosen und N-Acetylglucosamin Transferase I fügt ein N-Acetylglucosamin an. Nun entfernt Mannosidase II zwei weitere Mannosen. Das so entstandene Oligosaccharid ist N-Acetylglucosamin2-Mannose3-N-Acetylglucosid. [25]

O-Glykosylierung

Im Zuge des Transports durch den Golgi-Apparat zur Plasmamembran können Oligosaccharid-N-Acetylgalactosamin mit Serin/Threonin verbunden werden (O-Glykosylierung bzw. *O-linked glycosylation*). [6]

Untersuchung der N- und O-Glykosylierung

Das im Golgi entstandene Oligosaccharid [N-Acetylglucosamin2-Mannose3-N-Acetylglucosid]

ist resistent gegen EndoH-Verdau. EndoH ist ein Enzym isoliert aus *Streptomyces*, sein systematischer Name ist Glycopeptide-D-mannosyl-N4-(N-acetyl-D-glucosaminyl)2-asparagine 1,4-N-acetyl-beta-glucosaminohydrolase. Endo H spaltet mannosreiche Oligosaccharide und hinterlässt N-Acetylglucosamin gebunden an das proximale Asparagin. Somit kann durch EndoH-Verdau unterschieden werden zwischen einer komplexen oder mannosereichen N-Glykosylierung. Analog dazu kann O-Glykosylierung durch Zugabe von O-Glykosidase entfernt werden. [25] Asparagin-gebundenes Acetylglucosamin kann durch PNGase F (N-linked-glycopeptide-(N-acetyl-beta-D-glucosaminyl)-L-asparagine amidohydrolase) gespalten werden und zwar unabhängig vom Mannosegehalt bzw. der Oligosaccharidkettenverzweigung, die komplexe und nichtprozessierte Glykosylierungen unterscheiden. Die beiden Enzyme PNGase F und O-Glykosidase sind instrumentell in der Identifizierung der beiden alternativen Glykosylierungsmodi von Proteinen. Mit SDS-PAGE und Western-Blot kann eine Veränderung des Bandenmusters bei EndoH- bzw. O-Glykosidase-sensitiven Glykoproteinen festgestellt werden, da die resultierenden Proteine schneller durch das Gel migrieren und durch Ansammlung in scharf begrenzten Banden als homogene Spezies imponieren. [59]

Bildung von Disulfidbrücken

Thioreduktasen, wie PDI (Proteindisulfidisomerase), ERp57 (Thioloxidoreduktase) und ERp44, katalysieren die Bildung von Disulfidbrücken (S-S Verbindungen) zwischen 2 Cysteinen. ERp57 ist im ER lokalisiert, interagiert mit Calnexin/Calreticulin und erkennt Glykoproteine. ERp44 hingegen befindet sich vor allem im ERGIC (*ER-Golgi intermediate compartment*). [33] PDI erkennt nicht-glycosylierte Proteine [61], und ist im ER lokalisiert. [62]

S-Palmitoylierung

S-Palmitoylierung führt zu einem Thioester der Palmitinsäure (C16) mit einem Cystein und wird von Palmitoyltransferasen vermittelt. Palmitoyltransferasen (ZDHHC-Proteine) sind im ER, Golgi, der Plasmamembran und endozytotischen Vesikeln lokalisierte Transmembranproteine. Palmitoylierung kann im Zytoplasma von Acylprotein-Thioesterasen (APTs) rückgängig gemacht werden. [56] Palmitoylierungsstellen befinden sich bei Transmembranproteinen an cytoplasmatisch exponierten Peptidsegmenten, oft nahe der Transmembrandomäne [56], so auch bei den C-terminal vom TM7 gelegenen Cysteinen C341 und C342 des V2R. [9][55] Die Orientierung der naheliegenden TM7 wird durch die Palmitoylierung beeinflusst und könnte zu einer Reduzierung der exponierten hydrophoben Oberfläche führen. [56] Exponierte hydrophobe Flächen werden von der Qualitätskontrolle des ER erkannt und sind Zeichen un- oder

fehlgefalteter Proteine. [28][29] So wird die Oberflächenexpression des V2R in Abwesenheit der Palmitoylierung reduziert. Dies hat jedoch keinen Effekt auf die Bindungsaffinität des Liganden, Internalisierung, Stimulation der Adenylatzyklase oder Desensibilisierung jener Rezeptorspezies, die es trotz des Palmitoylierungsmangels an die Zelloberfläche schaffen. [55]

Detektion von Palmitoylierung

Zellen werden mit radioaktiver [³H]-Palmitinsäure markiert. Durch Solubilisierung, Immunpräzipitation und mit SDS-PAGE wird der GPCR isoliert. Durch Autoradiographie kann der palmitoylierte Rezeptor im Gel sichtbar gemacht werden. [50]

Intrazelluläre Retention des V2 Rezeptors

Die Qualitätskontrolle des ER ist in der Lage die thermodynamische Stabilität eines Proteins zu erkennen und anhand dessen instabile Proteine zu retinieren. Die Funktionalität eines Proteins kann trotz eines retinierenden Faltungsdefekts noch gegeben sein. [34] Dies wurde beispielsweise durch die funktionelle Rettung der V2R-Deletionsmutante del62-64 durch den V2R-spezifischen Antagonisten SR121463A gezeigt. [38] Retinierte V2R Mutanten fallen in zumindest zwei Kategorien: Retention im ER oder im ERGIC. Beispielsweise ist L62P eine im ER und Y205C eine im ERGIC retinierte Mutante des V2R. Dies wurde durch intrazelluläre Verteilung des Fluorophor-markierten (GFP) Rezeptors und die Behandlung mit den Peptiden Penetratin und KLAL gezeigt. Beide Peptide sind in der Lage die Qualitätskontrolle außerhalb des ER zu inhibieren. Sie können das ERGIC mittels Endozytose erreichen und verstärken die Oberflächenexpression von Y205C. Das ER wird nicht erreicht und die Mutante L62P bleibt retiniert. [31]

Identifikation destabilisierender Mutationen

Bei natürlich vorkommenden V2R-Mutanten handelt es sich oft um multiple Mutationen und/oder Deletionen. Eine vorangegangene Arbeit [5] ging jedoch der Frage nach, ob isolierte Punktmutationen bereits gravierende Faltungsdefekte hervorrufen können und welche Rolle die Position der Mutation dabei spielt. Als Grundlage diente molekulare Modellierung. Mangels einer kristallographischen Strukturbestimmung wurde ein Homologiemodell der V2R-Transmembrandomäne anhand des humanen Rhodopsins und des humanen β -adrenergen Rezeptors erstellt. Intra- und extrazelluläre Domänen des Rezeptors wurden durch Peptide mit ähnlichen Sequenzen und bekannten Strukturen simuliert. Die Autoren berechneten die Auswirkung diverser Punktmutationen auf die thermodynamische Stabilität des V2R-Strukturmodells und wählten 46 Mutationen, welche die größte Instabilität erzeugten und somit von der zellulären Qualitätskontrolle maximal retiniert werden sollten. Untersucht wurde das Ausmaß des Transportdefekts GFP-markierter V2R-Konstrukte mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie. Insgesamt waren 94% der modellierten Konstrukte mit Punktmutationen in der Transmembrandomäne transportdefizient. Dies traf auf lediglich 50% der Mutationen mit extrazellulären bzw. 40% der Mutationen im intrazellulären Bereich des Rezeptors zu. Auffällig war, dass 58% der Punktmutationen im α -helicalen Bereich, das heißt innerhalb der Transmembrandomäne, einen hochgradigen Transportdefekt verursachten. Hochgradig bedeutet,

dass weniger als 20% der Rezeptorfluoreszenz an die Plasmamembran gelangte. Keine der Mutationen der intrazellulären Domäne und nur 20% der extrazellulären Domäne führten zu Retention vergleichbaren Grades. Die Vorhersagekraft dieser Methode (molekulare Modellierung und Analyse des Energiefeldes) war demnach für den Transmembranbereich wesentlich größer.

Wir wählten für diese Studie sieben V2R-Konstrukte mit Punktmutationen, die eine maximale Retention verursachten. Die gewählten Mutationen waren F48R, L62P, Q92P, T134A, A163E, P217R, T273R und S318I und repräsentierten somit jedes Transmembransegment des Rezeptors.

Pharmakologische Chaperone und Alternativen

Ein pharmakologisches Chaperon (Pharmakochaperon) ist typischerweise ein kleines, lipophiles Molekül, das in der Lage ist in die Zelle zu gelangen und spezifisch an ein retiniertes Protein zu binden, dessen Struktur zu stabilisieren und so den Export zu fördern. Ob ein intrazellulär retinierter GPCR auch funktionell gerettet werden kann, hängt von der Schwere des Faltungsdefekts und dem Pharmakochaperon ab. Im Idealfall sollte ein Pharmakochaperon stabil an den Rezeptor, genauer dessen unreifes Faltungsintermediat binden, den Export fördern und anschließend wieder leicht dissoziieren. Das ideale Pharmakochaperon gibt den an die Zelloberfläche escortierten Rezeptor frei und würde daher keinen negativen Einfluss auf Bindung des endogenen Liganden und Funktion des Rezeptors nehmen. Sofern die retinierende Mutation auch die eigentliche Funktionalität des Rezeptors (Ligandenbindung, G-Proteinkopplung) einschränkt, kann dies nicht durch ein Pharmakochaperon behoben werden. [39] Beispiele für V2R- Pharmakochaperone sind SR121463 (*satavaptan*) und OPC41061 (*tolvaptan*) und SR49059 (*relcovaptan*). SR121463 und OPC41061 sind spezifische Antagonisten des V2R und SR49059 ist ein unselektiver Antagonist, der ebenfalls den V1aR bindet aber mit geringerer Affinität auch an V2R (Formelbilder in Abbildung 1.2). [40]

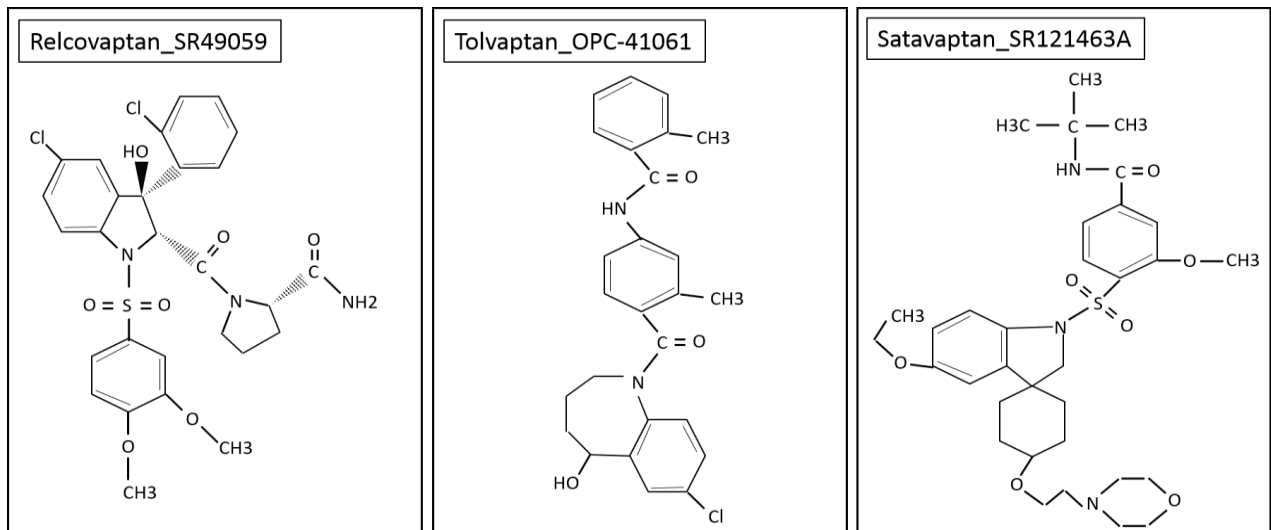


Abbildung (1.2): Chemische Struktur der V2R-spezifischen, synthetischen Antagonisten Tolvaptan und SR121463A (Satavaptan), sowie des V1aR-spezifischen, synthetischen Antagonisten SR49059 (Relcovaptan).

Tatsächlich ist die ideale Wirkweise eines Chaperonliganden Illusion, solange sie als homosterische Liganden des Rezeptors funktionieren. Es gibt keinen Hinweis für die Existenz von Liganden, die den Rezeptor in unreifer, retinierter Form besser binden als die reife, an der Zelloberfläche verankerte Form. Eine Abnahme der Bindungsaffinität in Abhängigkeit von der subzellulären Lokalisation des Rezeptors wäre die Voraussetzung für den gewünschten Wirkungsmechanismus. Im Gegenteil binden aber Rezeptorliganden die retinierte Spezies typischerweise erst in höherer Konzentration als die reife. Die Besetzung des Rezeptors bleibt nach erfolgtem Export an die Zelloberfläche bestehen und behindert dessen Aktivierung durch den physiologischen Liganden. Daher ist es nicht wahrscheinlich, dass sich das Konzept des Pharmakochaperons unmittelbar für die Behandlung von Patienten anwenden lässt. Ein denkbarer Ansatz zur Lösung des Problems wären zum Beispiel Chaperonliganden, deren Halbwertszeit in vivo deutlich kürzer ist als jene des geretteten Rezeptors (sodass nach erfolgtem Export der unbesetzte Rezeptor für einen Teil seiner Lebensdauer zur Verfügung steht).

Ein alternatives pharmakologisches Konzept würde auf molekulare Angriffspunkte zusteuern, die sich nicht in der Ligandenbindungsstelle des Rezeptors befinden. Es gibt erst wenige Beispiele, dass Rezeptoren durch Interferenz mit den Mechanismen der intrazellulären Retention gerettet werden können. Das am häufigsten studierte Transmembranprotein ist CFTR („Cystische Fibrose Transmembranleitfähigkeitsregulator“, ein Chloridkanal) bzw. seine Mutante $\Delta F405$ CFTR. Vergleichbar mit mutanten Rezeptoren bleibt die zelluläre Entwicklung von $\Delta F405$ CFTR im Stadium des ER-ständigen Intermediats stecken: sobald der mutante Kanal jedoch an die Zelloberfläche gelangt, wird er aktiv. Auf Basis experimenteller Befunde lässt sich schließen,

dass CFTR durch Wechselwirkung mit HSP90 am Export behindert wird. Manipulation von HSP90 steigert dementsprechend die Oberflächenexpression. [78][79] Erfolg von indirekten Pharmakochaperonen, wie dem HSP90-Inhibitor Geldanamycin, gab es zuletzt auch bei einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor. [80] Der A_{2A} -Adenosinrezeptor erwies sich als empfindlich für Geldanamycin, das seine Oberflächenexpression steigerte. Ähnlich wie CFTR, selbst jener mit Wildtypsequenz, neigt der native A_{2A} -Adenosinrezeptor zur intrazellulären Retention. Die Retention ließ sich aber nicht durch Ligandenbindung und Stabilisierung seiner Transmembrandomäne verringern. Die Konformation des A_{2A} -Adenosinrezeptor wie auch diejenige von CFTR verfügt über Strukturteile, die Dockermoleküle wie HSP-Proteine anziehen, die den Export bremsen [80].

Evidenz für Qualitätskontrolle im ER

Die Qualitätskontrolle erkennt fehl- und ungefaltete Proteine anhand von unreifer N-Glykosylierung, exponierten hydrophoben Regionen und reaktiven Cysteinen, retiniert diese und versucht die korrekte Faltung zu erreichen. Ist das nicht möglich können die betroffenen Proteine über ER-assoziierten Verdau (*ERAD*, *ER-associated degradation*) abgebaut werden. [28][29]

Molekulare Chaperone

Ein molekulares Chaperon ist ein Protein, das bei der Faltung anderer Proteine hilft ohne selbst Teil der Endkonformation zu werden. Viele dieser Chaperone sind ursprünglich als Stress- oder Hitzeschockproteine (HSP) entdeckt worden, da bei Hitzestress Proteine denaturieren und HSP verstärkt exprimiert werden, um die Renaturierung zu unterstützen. Zu den HSP zählen HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100 und kleine HSP. Die Benennung richtet sich nach dem Molekulargewicht (in kDa) bakterieller Orthologe. Polypeptidketten können bereits während der Synthese am Ribosom von den Chaperonen MPP11 und HSP70L1 erkannt werden. Nach Loslösung vom Ribosom interagieren die Polypeptidketten mit HSP70-HSP40 und können an HSP90 Chaperone oder HSP60 (auch als Chaperonine bezeichnet) weitergeleitet werden. [28]

HSP70 und HSP40 Proteine

HSP70 Chaperone bestehen aus einer N-terminalen Nukleotid-bindenden Domäne (NBD, auch ATPase-Domäne genannt), einer hydrophoben Verbindungsdomäne (*linker*) und einer C-terminalen Substrat-bindenden Domäne (SBD). Die SBD erkennt kurze Peptidsegmente, bestehend aus hydrophoben Aminosäuren, die von positiven Ladungen flankiert werden. Die Bindung des Substrats beschleunigt die Hydrolyse von ATP. Dadurch schließt sich die SBD und

das Substrat wird festgehalten. Nach einem anschließenden Tausch von ADP durch ATP öffnet sich die SBD und die Substratbindung wird schwächer. Ein Protein, das sich nach der Freigabe nicht schnell genug faltet, wird entweder erneut gebunden, an weitere Chaperone geleitet oder abgebaut. [28]

In Säugerzellen wurde *HSP70* als Familie von Gentranskripten nach Hitzestress identifiziert. *Hspa1* kodiert das humane Hitze-induzierte HSP70-1, *HSPA1B* ein identes Transkript. Im Unterschied zu diesen wird *HSPA2* konstitutiv in Muskel und Spermatozyten hoch exprimiert, sein Produkt ist HSP70-2. *HSC70* (*heat shock cognate 70*) wurde aufgrund von Ähnlichkeit mit der Nukleotidsequenz von *Drosophila hsc70* aus humanen Zellen molekular kloniert, sein Produkt HSC70 genannt. Seine Expression ist nicht temperaturempfindlich, es vereint dagegen Merkmale, die mit einer Funktion als Chaperonmolekül in Einklang stehen. HSC70 wurde in Assoziation mit Membranproteinen an intrazellulären Kompartimenten gefunden. [72][73] HSC70, zusammen mit Auxilin (ein HSP40 Protein), fördert allerdings auch die Freisetzung von Clathrin von Clathrin-bedeckten Vesikeln durch seine Funktion als ATPase. Hemmung der Interaktion HSC70-Auxilin verhindert Endozytose und Recycling synaptischer Vesikel. [63] HSP70-1 hat ebenfalls die Neigung zur Protein-Proteinassoziation, Hinweise auf eine Chaperonrolle in der Reifung von Membranproteinen oder löslichen Proteinen im sekretorischen Weg gibt es in Säugerzellen bisher wenige. Laut OMIM [74] kommt es cytosolisch vor und dürfte Einfluss auf Apoptose (mit unterschiedlichen Auslösern) nehmen. Das ER-luminale HSP70 BiP ist involviert in die Translokation neusynthetisierter Polypeptide in das ER. Außerdem ist es ein wichtiger, regulierender Faktor der UPR (*unfolded protein response*), des Abbaus fehlgefalteter Proteine über ERAD und der Stabilisierung unvollständig gefalteter Proteine (*folding intermediates*), die es anhand exponierter hydrophober Reste erkennt. [34]

HSP70 Chaperone werden von den Ko-Chaperonen HSP40 und HSP110 (*nucleotide exchange factors*, NEF) reguliert. Alle HSP40 Ko-Chaperone haben eine sogenannte J Domäne, die an die NBD von HSP70 bindet. HSP40 können HSP70 zu fehl- oder ungefalteten Proteinen rekrutieren. Die Interaktion von HSP40 mit HSP70 verstärkt ATP-Hydrolyse drastisch und somit die Bindung an das Substrat. HSP110 agieren als Nukleotidaustauschfaktoren und katalysieren den Austausch von ADP zu ATP um die Bindung zu lösen. [28]

Im menschlichen Genom wurden 41 Proteine identifiziert, welche eine J Domäne tragen und somit als DNAJ Proteine (auch, HSP40 Chaperone) klassifiziert werden. HSP40 Chaperone

begleiten ein Protein gewissermaßen vom Ribosom, über das ER und den sekretorischen Transportweg an die Plasmamembran und sind für die Regulation der Clathrin-vermittelten Endozytose essentiell. Mit dem Ribosom assoziiert findet sich MPP11. Die anschließende Translokation in das ER über das Sec61 Translokon wird wahrscheinlich von DNAJC1 (auch, ERdj1; enthält eine Bindungsstelle für Ribosomen) und DNAJC23 (auch, ERdj2 oder SEC63; kann mit SEC61 quervernetzt werden) reguliert. DNAJC5 (auch, ERdj5) befindet sich im ER und fördert über seine Proteindisulfidisomerase-Domäne die Bildung von Disulfidbrücken. [67] DRiP78 (*dopamine receptor interacting protein of 78 kDa*) ist mit der ER Membran assoziiert und interagiert mit GPCRs, die das ER verlassen sowie der γ -Untereinheit von G Proteinen. [61] Der Abbau ungefalteter Proteine wird unter anderem vom HSP40 Chaperon HDJ2 reguliert. Die HSP40 Chaperone Auxilin/DNAJC6 und Auxilin 2 (auch *cyclin G-associated kinase*, GAK) regulieren wiederum die Endozytose der Proteine, die an die Plasmamembran gelangt sind. [67]

HSP90 Chaperone

Von HSP70 können Faltungsintermediate weiter an HSP90 transferiert werden. In der Familie der HSP90 Proteine ist HSP90 α (oder HSP90A) ein cytosolisches Protein mit Chaperonfunktion. Das HSP90 Chaperon GRP94 (Synonyme: HSP90B, Endoplasmin oder GP96 genannt) ist im ER lokalisiert. HSP90 α (HSP90AA) und HSP90 β (HSP90AB) befinden sich im Cytosol, TRAP ist eine mitochondriale Isoform. [35]

HSP90 bestehen aus einer N-terminalen ATP-Bindungsstelle, einer mittleren Domäne, die mit dem Substrat interagiert und die Hydrolyse von ATP steuert, und einer C-terminalen Domäne, die die Homodimerisierung von HSP90 ermöglicht. Zudem findet sich am C-Terminus das Aminosäuremotiv MEEVD, welches für die Interaktion mit Ko-Chaperonen, die TPR-Domänen (*tetratricopeptide repeat*, ein strukturelles Motiv aus 34 Aminosäuren, das in mehrfacher Wiederholung tandemständig in Proteinen vorkommt) besitzen, von Bedeutung ist. [28]

Zunächst liegt das HSP90-Dimer in V-förmiger, offener Konformation vor. Bei Erkennung eines Substratproteins geht das Dimer durch ATP-Bindung in die geschlossene Konformation (im Sinne einer Proteinklemme) über. Hydrolyse von ATP zu ADP + Pi führt zur Substratfreigabe und der Einnahme einer offenen, ADP-gebundenen Konformation. Es wurde jedoch noch kein ADP/ATP-Nukleotidaustauschfaktor für HSP90 identifiziert. Gesteuert wird das Durchlaufen des Zyklus durch die Ko-Chaperone HOP (*HSC70/HSP90 organizing protein*, *Sti1*), CDC37, AHA1 und P23. CDC37 und HOP hemmen die HSP90-ATPase-Aktivität. HOP steuert zudem den

Transfer des Substrats von HSP70-HSP40 zu HSP90. AHA1 verstärkt hingegen die ATP-Hydrolyse. P23 bindet schließlich an das geschlossene HSP90-Dimer und beeinflusst somit die Substratfreigabe. Über das C-terminale MEEVD Motiv interagiert HSP90 mit Ko-Chaperonen (CYP40, FKBP51, FKBP52), die PPIase (Peptidyl Prolyl Isomerase) oder TPR-Domänen enthalten und bei der Faltung des Substratproteins helfen. [28] Geldanamycin und Radicicol haben eine höhere Affinität als ATP für die ATP-Bindungsstelle von HSP90, hemmen auf diese Weise die Substratbindung. Dies fördert letztlich auch den Abbau von Substraten, die auf die Stabilisierung durch HSP90 angewiesen sind. [112]

Evidenz für Qualitätskontrolle im ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC)

Was ist das ERGIC

An so genannten ERES (*ER exit sites*) werden Proteine, die für den Export zum Golgi bestimmt sind, in COPII (*coat-protein complex II*) bedeckten Vesikeln gesammelt. [25] In Säugerzellen werden diese Proteine nicht direkt zum Golgi weitergeleitet sondern zunächst im ERGIC gesammelt. Der Weitertransport zum Golgi wird mit zwei unterschiedlichen Modellen beschrieben. Die Reifungshypothese geht davon aus, dass der ERGIC kein eigenes zelluläres Kompartiment sondern eine Ansammlung von Membranen auf dem Weg zum Golgi ist und so selbst das *cis*-Golgi Netzwerk generiert. Das andere Modell geht hingegen vom ERGIC als stabiles Kompartiment mit einem hohen Umsatz aus, weil sich vorwärtsgerichteter Transport zum Golgi oder zur Plasmamembran von rückwärtsgerichtetem Transport zum ER im ERGIC trennen. Demnach müssten Proteine ein für den ERGIC-relevantes Signal besitzen, das die Richtung ihres Weitertransports bestimmt. Außerdem müsste ein spezifischer Mechanismus für den Transport von ERGIC zu Golgi existieren. [30] Für den GABA Transporter 1 (GAT1) wurde ein ERGIC-Golgi Transportmotiv aus den Aminosäuren VMI identifiziert. Mutation dieses Motivs zu SSS ließ GAT1 das ER verlassen und führte zu dessen Akkumulation im ERGIC. [30]

Qualitätskontrolle im ERGIC

ERGIC-53 ist ein Transmembranprotein, das Glykoproteine vom ER zum Golgi leitet. Es besitzt ein KKFF Motiv auf cytoplasmatischer Seite und bindet so an COPI bzw. COPII, um sich zwischen ER und Golgi bewegen zu können. [29] Generell ist COPI für den rückwärtsgerichteten Transport Golgi zu ER und COPII für den vorwärtsgerichteten Transport

ER zu Golgi verantwortlich. [25] Eine Hemmung von COPI führt jedoch zu einer Lokalisierung von ERGIC-53 im ERGIC. [30] ERp44, das wie zuvor erwähnt Disulfidbrückenbildung fördert, erkennt ungefaltete Proteine anhand exponierter, reaktiver Cysteine. [33] Mittels Ko-Immunpräzipitation und Immunfluoreszenzmikroskopie wurde gezeigt, dass ERp44 mit ERGIC-53 interagiert und die Oligomerisierung von Proteinen einleitet. [29]

ERAD (ER-associated degradation)

Fehl- und ungefaltete Proteine können von der Zelle abgebaut werden. Zunächst müssen die fehlgefalteten Proteine erkannt und zu einem Translokationskanal, dem Retrotranslokation, gebracht werden. Das Retrotranslokation ermöglicht den Transport vom ER-Lumen in das Zytoplasma. Im Zytoplasma findet schließlich Ubiquitin-Proteasom bedingter Abbau von Proteinen statt. [33] Das UPS (*ubiquitin-proteasome system*) ist abhängig vom 26S Proteasom, welches linearisierte Polypeptidketten hydrolysiert. Als Vorbedingung muss allerdings Aggregation verhindert und das abzubauen Protein identifiziert und markiert werden. Daher sind auch für diesen Prozess molekulare Chaperone von Bedeutung. Zusammen mit E3 Ubiquitin Ligasen erkennen Chaperone fehlgefaltete Proteine und bringen diese zum Proteasom. HSP70 und HSP90 Chaperone ubiquitinieren zusammen mit der Ubiquitin Ligase CHIP (*C terminus of HSC70-interacting protein*), und anderen Kofaktoren (BAG1 und BAG3, *Bcl-2 associated athanogene 1* und 3) für den Abbau bestimmte Proteine. CHIP interagiert über seine TPR (*tetratricopeptide repeat*) Domäne mit HSP90. BAG1 und BAG3 interagieren mit CHIP und der NBD (*nucleotide-binding domain*) von HSP70 Chaperonen. BAG1 ist spezifisch für den Ubiquitin-Proteasom vermittelten Verdau und BAG3 für die Autophagie. Letztere ermöglicht der Zelle den Abbau von Proteinaggregaten. [28]

ER-Stress und UPR (unfolded protein response)

ER-Stress bedeutet, dass die vorhandene Maschinerie der Qualitätskontrolle mit einer Akkumulation fehlgefalteter Proteine überfordert ist. Die Antwort der Zelle auf dieses Problem wird als UPR (*unfolded protein response*) bezeichnet. Zunächst werden Proteinsynthese und Translokation in das ER verringert. Außerdem wird die Proteinfaltungskapazität des ERs erhöht, die Phospholipidsynthese zur Vermehrung der Membranoberfläche und ERAD (bei Proteinaggregaten Autophagie) wird gefördert. [118]. Sofern trotz dieser Anpassungen die Qualitätskontrolle nicht ausreicht, um mit den un- bzw. fehlgefalteten Proteinen umzugehen, können pro-apoptische Faktoren den Zelltod einleiten. So kann der Organismus vor einer Zelle geschützt werden, die potentiell schädliche, fehlgefaltete Proteine produziert. [36]

Signalwege der UPR

Die UPR wird von den Proteinen IRE1 (*inositol requiring enzyme 1*), ATF6 (*activating transcription factor 6*) und PERK (*PKR-like ER kinase*) reguliert. IRE1 und PERK sind ER-ständige Transmembranproteine. Verschiedene Modelle versuchen zu erklären wie IRE1 und PERK ER-Stress erkennen. Modell A geht davon aus, dass die Bindung eines fehlgefalteten Proteins an die ER-luminale Domäne die Oligomerisierung von IRE1 bzw. PERK auslöst und so die UPR einleitet. Modell B geht von einer konstitutiven Hemmung dieser Oligomerisierung durch gebundenes BiP aus. Tatsächlich wurde BiP im Komplex mit IRE1 bzw. PERK im nicht-gestressten Zustand gefunden, bei ER-Stress jedoch nicht mehr. Zu dem hemmt eine Überexpression von BiP die UPR, eine verringerte Expression fördert hingegen die Aktivierung der UPR. Dennoch ist BiP nicht essentiell für die Regulation von IRE1. [36]

Detektiert IRE1 ER-Stress kommt es zu einer membranständigen Oligomerisierung des Proteins und einer *trans*-Autophosphorylierung seiner zytoplasmatischen Domäne. Phosphorylierung dürfte initial die Oligomerisierung und Aktivierung unterstützen, während Hyperphosphorylierung sie beendet. Die IRE1-Wirkungsweise ist außergewöhnlich. Oligomerisiertes IRE1 wirkt als Endoribonuklease und spaltet XBP1u (*X-Box binding protein, unspliced*) mRNA. Durch Translation der gespleißten mRNA wird der Transkriptionsfaktor XBP1s (*XBP1 spliced*) gebildet. XBP1s induziert UPR-Gene und fördert dadurch die Expression von molekularen Chaperonen, ERAD Proteinen und die Lipidsynthese. Somit wird die Kapazität zur Proteinfaltung bzw. des Proteinabbaus erhöht. Zusätzlich wird auch die Expression von XBP1u mRNA erhöht. Sind diese Maßnahmen ausreichend und der ER-Stress reduziert sich, wird IRE1 inaktiviert, wodurch XBP1s nicht mehr generiert wird. [36] XBP1u dimerisiert mit XBP1s. Dieses Dimer wird mittels proteasomalen Verdau abgebaut, gefördert durch ein Abbaumotiv in XBP1u. [113] In diesem Sinne wirkt XBP1u als negativer Feedbackregulator der UPR.

Bei Aktivierung oligomerisiert PERK und phosphoryliert sich selbst sowie den Translationsfaktor eIF2 α (*eukaryotic translation initiation factor-2*). Dadurch verringert sich die von eIF2 α initiierte Translation und die vom ER aufgenommene Menge neusynthetisierter Proteine. Phosphorylierter eIF2 α fördert hingegen die Translation von ATF4 (*activating transcription factor 4*). [36] ATF4 verstärkt die Expression von CHOP (*transcription factor C/EBP homologous protein*) und GADD34 (*growth arrest and DNA damage-inducible 34*). [37] Sowohl CHOP als auch GADD34 wirken pro-apoptotisch, jedoch wird die Apoptose erst bei

länger anhaltendem ER-Stress eingeleitet. Dies ist wahrscheinlich auf die Instabilität von CHOP und GADD34 zurückzuführen. [36] GADD34 fördert als Kofaktor die Aktivität der Proteinphosphatase 1C, führt zur Dephosphorylierung von eIF2 α und wirkt so als Gegenregulator von PERK. [37]

Bei ATF6 (activating transcription factor 6) handelt es sich ebenfalls um ein Membranprotein, das in Zellen ohne ER-Stress in der ER Membran lokalisiert ist. An die luminal Domäne ist BiP gebunden. Bei ER-Stress löst sich BiP und erst dann kann ATF6 in den Golgi transportiert werden. [36][37] Im Golgi angekommen wird ATF6 ein Substrat für Proteasen. Die Golgi-residenten Proteasen, S1P (*luminal site 1 protease*), und S2P (*intra-membrane site 2 protease*) spalten ATF6, sodass sich die zytoplasmatische Domäne von der Golgimembran löst und in den Zellkern transferiert. [36] Die zytoplasmatische ATF6 Domäne wirkt als Transkriptionsfaktor und erhöht die Expression von BiP, PDI und dem HSP90 Chaperon GRP94. [37] Das Aktivierungsprinzip ähnelt jenem des Cholesterin-abhängigen Transkriptionsfaktors SREBP2.

Funktion des V2R

G Protein abhängige Effekte

Der V2R wird von Primärzellen der Niere im Epithel des Sammelrohres auf basolateraler Seite expremiert. Erhöht sich Osmolarität (mindestens um 2%) oder sinkt das Volumen (mindestens um 10%) des Blutplasmas, schüttet die Neurohypophyse das Hormon Arginin-Vasopressin (AVP) aus. AVP aktiviert den V2R, dieser stimuliert, über stimulatorisches G Protein (Gs), Adenylatzyklase und bildet cAMP aus ATP. Es kommt zu einer Aktivierung der PKA (*cAMP-dependent protein kinase A*) und einer Fusion von Wasserkanal (Aquaporin-2, AQP-2) tragenden Vesikeln mit der apikalen Membran. Die Inserierung von AQP-2 in die apikale Membran erfolgt in der Niere bereits 1 min nach Zugabe von AVP und erhöht die Wasserdurchlässigkeit drastisch. Auf basolateraler Seite der Zellen sorgen konstitutiv expremiertes AQP-3 und AQP-4 für Wasserdurchlässigkeit. [2]

Es gibt jedoch keinen Hinweis, dass der V2R in der Lage ist an andere G-Proteinsubtypen zu koppeln. [84] Dies steht im Gegensatz zum V1a Rezeptorsubtyp. Gq aktiviert Phospholipase C- β (PLC β). Diese spaltet in der Plasmamembran vorkommendes Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) in Diacylglycerol und Inositol 1,4,5-Trisphosphat (IP₃). IP₃ öffnet Ca²⁺ Kanäle (*IP₃ receptors* oder *IP₃-gated Ca²⁺-release channels*) im ER. Dadurch erhöht sich die zytosolische Ca²⁺ Konzentration. Diacylglycerol und das freigegebene Ca²⁺ aktivieren PKC (*calcium-dependent protein kinase C*). [25]

Der V2R wird jedoch nicht nur in der Niere expremiert sondern auch in vaskulären Endothelzellen. Stimulation des V2R mit AVP oder dem V2R-selektiven Agonisten Desmopressin (auch, ddAVP bzw. 1-Deamino-8-D-Arginin Vasopressin) führt in diesen Zellen zur Freisetzung von Von-Willebrand-Faktor (VWF) und t-PA (tissue-Plasminogen Activator) durch Exozytose von Weibel-Palade-Körpern. Letztere dienen als Speicher für VWF und t-PA in Endothelzellen. Weiters erhöht Desmopressin auch die Konzentration des Gerinnungsfaktors VIII (FVIII). [114] Wahrscheinlich kommt dieser Effekt durch die Stabilisierung von FVIII durch das erhöhte Aufkommen des VWF zustande. [116]

Regulation von G Proteinen

Im inaktiven Zustand ist ein G Protein ein Heterotrimer aus den Untereinheiten G α

(Nukleotidbindende α -Untereinheit, bindet GDP im inaktiven Zustand) und $G\beta\gamma$ (Dimer aus den Untereinheiten β und γ). Bei Aktivierung des assoziierten GPCR wird das gebundene GDP freigegeben und GTP bindet selbständig an $G\alpha$. $G\alpha$ -GTP und $G\beta\gamma$ werden als eigenständige Einheiten freigesetzt und wirken als Effektoren. Die Effektorfunktion ist abhängig von der Art der G Protein Untereinheiten. $G\alpha$ hat eine intrinsische GTPase-Aktivität, die zur Hydrolyse von GTP zu GDP führt. Durch Interaktion mit RGS (*regulator of G protein signaling*) wird diese GTPase Aktivität gesteigert. $G\alpha$ -GDP assoziiert wieder mit $G\beta\gamma$ und die Signaltransduktion durch das G Protein wird beendet. [25]

Adenylatzyklasen und Protein Kinase A (PKA)

Für die Niere bzw. Nebenniere relevante Adenylatzyklase (AC) Subtypen sind AC I, V und VI. In jedem Fall ist ein Anstieg von cAMP unabhängig vom AC Subtyp und eine Stimulation über Forskolin oder $G_{\alpha s}$ möglich. Zudem ist den Isoformen I, V und VI gemein, dass ihre Aktivität durch $G_{\alpha i}$ gehemmt wird. AC V und VI werden außerdem noch durch Calcium (in μM -Konzentrationen), PKA und RGS2 gehemmt. [90]

PKA wird durch cAMP aktiviert und daher auch cAMP-abhängige Protein Kinase genannt. PKA phosphoryliert Serine und Threonine an Zielproteinen. Inaktive PKA bildet einen Komplex aus 2 katalytischen und 2 regulatorischen Untereinheiten (UE), letztere werden als A-Kinasen bezeichnet. cAMP bindet an die regulatorischen UE und die katalytischen UE werden freigesetzt. Über AKAPs (*A-kinase anchoring proteins*) steht PKA mit einer Phosphodiesterase, die cAMP hydrolysiert, in Verbindung. Stimulation der Adenylatzyklase und der damit verbundene Anstieg an cAMP führt so zu einer starken, kurzfristigen Aktivierung der PKA. Kurzfristig, weil die Phosphodiesterase das von A-Kinasen gebundene cAMP rapide abbaut und so die Reassoziierung der PKA Untereinheiten ermöglicht. PKA ist auch verantwortlich für Propagation des cAMP-Signals in den Nukleus. PKA phosphoryliert CREB (*CRE-binding protein*) im Nukleus. Gebunden an CRE (*cAMP response element*) rekrutiert CREB CBP (*CREB-binding protein*). Diese Bindung fördert oder hemmt die Transkription von CRE-regulierten Genen. [25] CREB kann beispielsweise die Proliferation regulieren. [45]

Untersuchung der Gs-Proteinkopplung

Wird ein aktivierter GPCR im Rahmen einer Ko-Immunpräzipitation aufgereinigt, lässt sich die G-Protein Kopplung durch G-Protein spezifische Antikörper unterscheiden. Der Rezeptor-G Protein Komplex kann durch den Einsatz von GppNHP, ein nicht-hydrolysiertes GTP,

dissoziiert werden. G-Protein spezifische Antikörper ermöglichen zudem eine Hemmung der Bindung an den GPCR. [76]

Ähnlich wie GppNHp ist GTP γ S resistent gegenüber der GTPase Aktivität von G α ist; es bildet sich ein stabiler ternärer Komplex bestehend aus Agonist, Rezeptor und G α . Ein mit radioaktivem Schwefel markiertes GTP γ S ermöglicht die Messung der Gesamtmenge G α , die durch Aktivierung des GPCR induziert wurde, durch Bestimmung der Radioaktivität. Eine Immunpräzipitation von GTP γ S-G α mit einem G α -Subtyp spezifischen Antikörper ermöglicht zu dem die Identifizierung des betroffenen G α Subtyps. [50]

Durch längere Behandlung mit *Cholera Toxin* (CT) kann Gs gehemmt werden. Zunächst aktiviert CT allerdings Gs durch Ribosylierung des gebundenen ADP. Dies führt zu einer Stimulation von Adenylatzyklase und PKA, sowie zu einem allmählichen Abbau von Gs α . [89] In Epithelzellen, die den *cystic fibrosis trans-membrane conductance regulator* (CFTR) exprimieren, führt der Anstieg der cAMP-Konzentration zu einer Öffnung des CFTR und einem damit verbundenen Ausstrom von Chloridionen und Bikarbonat und einer verringerten Aufnahme von Natrium, das Bronchialsekret wird flüssiger. [91] PKA aktiviert ferner ATP-sensitive Kaliumkanäle und führt somit zu einem Ausstrom von Kaliumionen. [92]

Eine direkte Aktivierung von Adenylatzyklase kann durch Forskolin erzielt werden. Forskolin, ein pflanzliches Diterpen, fördert die Dimerisierung der beiden für die cAMP-Bildung erforderlichen katalytischen Untereinheiten der Adenylatzyklase. In Gegenwart von Forskolin reagiert die Adenylatzyklase darüber hinaus empfindlicher auf den G α s-Stimulus. [89]

Aquaporine (AQP)

Aquaporine (AQP) sind Transmembranproteine mit einer Größe von etwa 30kDA. In der Zellmembran liegen sie als Homotetramere vor, wobei jedes Monomer über eine wässrige Pore verfügt, die den Transport von Wasser entlang eines osmotischen Gradientens erlaubt. In Menschen und Nagetieren wurden 14 AQP identifiziert; 8 AQP funktionieren als Wasserkanäle. Alternativ zu Wassermolekülen können manche Glyzerin (Aquaglyceroporine) transportieren. Elektrostatische und sterische Faktoren vermitteln die Selektivität der AQP. [96]

Aquaporin-2 (AQP-2)

Die AVP-abhängige Akkumulierung von Aquaporin-2 Wasserkanälen in der apikalen Membran

der Hauptzellen des Sammelrohres erlaubt die Rückresorption von Wasser in der Niere. An ihrer basolateralen Membran finden sich AQP3 und AQP4. AQP-2 ist zu dem in der Lage auf seiner extrazellulären Seite Integrin zu binden, welches die Expression von AQP-2 verändern kann und in der Zellmigration während der Tubulogenese involviert ist. [44]

Nach Stimulation des V2R durch AVP wird AQP-2 an einem Serin (S256) und anderen C-terminalen Positionen von PKA phosphoryliert. Phosphoryliertes AQP-2 wird resistent gegenüber Endozytose und akkumuliert an der apikalen Membran. Es wurde vorgeschlagen, dass Hemmung der Endozytose hinreichend für die Wasserdurchlässigkeit der apikalen Membran ist. AQP2 akkumuliert apikal, wenn Dynamin gehemmt bzw. Cholesterin in der Membran (durch Methyl- β -cyclodextrin, MBCD) gequenchet wird. MBCD hemmt die Clathrin-vermittelte Endozytose und Hemmung der GTPase Dynamin verhindert die Abschnürung der Clathrin-bedeckten Vesikel von der Zellmembran. HSC70 und HSP70 wurden mit S256-phosphorylierten AQP-2 assoziiert gefunden. [44] Wie bereits erwähnt wirkt HSC70, zusammen mit Auxilin, in der Freisetzung von Clathrin in Clathrin-bedeckten Vesikeln; HSC70 ist auf diese Weise auch für die Endozytose relevant.

Arrestine und Internalisierung

Phosphorylierung des aktivierten GPCR durch GPCR Kinasen (GRKs), PKA oder PKC (Protein Kinase A bzw. C) leitet die Desensibilisierung durch Bindung von Arrestinen ein. [25] Der V2R bindet β -Arrestin-1 und β -Arrestin-2 gleichermaßen und bleibt auch während der Internalisierung mit den Arrestinen verbunden. Der V2R fällt daher in eine Gruppe von Rezeptoren mit hoher Affinität für Arrestin. Eine zweite Klasse geht eine nur vorübergehende Verbindung primär mit β -Arrestin-2 (Arrestin3) ein und wird rasch für die Wiederkehr an die Zelloberfläche frei gegeben (β_2 - und α_{1B} -adrenergic). Im Unterschied zu diesen Beispielen kann der V2R daher in intrazellulären Endosomen aufgefunden werden [81] Dass ein Rezeptor für seine G Protein bedingte Signaltransduktion nicht an der Plasmamembran präsent sein muss, wurde für internalisierte β_2 -adrenerge Rezeptoren demonstriert. [85] Es bleibt offen, ob dies auch auf den V2R zutrifft.

β -Arrestin-1 befindet sich in Cytoplasma und Nukleus, β -Arrestin-2 nur im Cytoplasma. GPCR-gebundenes β -Arrestin interagiert mit dem Adapter Protein 2 (AP2) und konzentriert den GPCR-Arrestin-Komplex in Clathrinbuchten (*clathrin-coated pits*) in der Plasmamembran. Durch Einstülpung bilden sich Vesikel, die sich unter Einwirkung von Dynamin intrazellulär von der

Membran ablösen. Diese Vesikel fusionieren mit endosomalen Kompartimenten. Der weitere Transport des Rezeptors, Abbau oder Recycling zur Plasmamembran wird, zumindest im Fall des β 2-Adrenorezeptors, durch Ubiquitinierung von Arrestin gesteuert. Neben Desensibilisierung und Internalisierung können β -Arrestine auch G-Protein unabhängige Signalwege durch den GPCR aktivieren. Ein Beispiel für β -Arrestin-1 Signaltransduktion ist die Aktivierung der Tyrosinkinase c-Src. [43] Src-Aktivierung trägt zur Feinsteuerung der Internalisierungsreaktion bei. Ein Substrat für Src ist die Adaptin-Komponente des Adaptorproteinkomplexes AP2. Tyrosinphosphorylierung von Adaptin reduziert die Affinität für Clathrin und belässt die Clathrinbuchten an der Zelloberfläche. [81]

Infolge des stabilen Komplexes mit Arrestin ist die V2R-vermittelte Aktivierung von ERK1/2 (*extracellular receptor dependent protein kinase*, p42/44) vermutlich auf Endosomen beschränkt. Es bleibt deswegen unklar, ob der V2R einen proliferationsfördernden Effekt entfalten kann. [99]

Bestimmung der Rezeptorinternalisierung und des Recyclings

Die Internalisierung von GPCRs, speziell Peptidhormonrezeptoren wie die Vasopressin/Oxytocin-Rezeptoren, kann durch Internalisierung eines radioaktiven oder fluoreszierenden Peptidhormons (Bestimmung der Oberflächenexpression des Rezeptors durch Radioligandenbindungsstudien) oder durch die Internalisierung von gegen Epitop gerichtete Antikörpern ("antibody feeding") bestimmt werden. Die Epitop- oder Fluorophormarkierung erlaubt die Lokalisierung des GPCR mithilfe von Immunzytochemie/Fluoreszenzmikroskopie. [50]

Eine Veränderung der Oberflächenexpression kann auch mit Durchflusszytometrie festgestellt werden. Wird die Internalisierung des V2R durch eine Behandlung ausgelöst, das heißt nimmt die Menge oberflächlich exprimierter Rezeptoren ab, wird weniger Antikörper bei der Markierung der Zellen gebunden und die Fluoreszenzintensität sinkt. Voraussetzung dafür ist, dass Bedingungen bei der Markierung eingehalten werden, die einer konstitutiven Endozytose entgegenstehen. Der experimentelle Befund einer Internalisierung stützt sich allerdings auf Messung der Oberflächenrezeptoren einerseits und der Direktbestimmung der Endozytose markierter Rezeptoren. Der V2R ist ausgesprochen internalisierungsfreudig. Bereits nach 5 min Behandlung mit AVP können über 80% des wildtypischen V2R internalisiert sein. [77]

Internalisierung und Recycling des Rezeptors können auf verschiedene Arten reduziert werden,

beispielsweise durch die Inkubation der Zellen bei 4-15°C oder mit hyperosmolarer Sucrose. Die Verwendung einer dominant-negativen Mutante von Dynamin (K44A) [50], die Inhibition der GTPase Aktivität von Dynamin durch Einsatz von Dynasore [86] verhindert die Clathrin-vermittelte Endozytose. Die Internalisierung eines GPCR kann auch durch Verwendung von Concanavalin A (auch, ConA) gehemmt werden. [87][88] ConA ist ein pflanzliches Lektin bestehend aus einem homotetrameren Proteinkomplex und bindet an die Zuckerreste von Glykoproteinen. [88]

Untersuchung der MAPK-Aktivierung

Inaktive ERK wird im Zytoplasma durch aktivierte MEK (MAPK/ERK kinase) phosphoryliert. Die Phosphorylierung von ERK durch MEK kann durch PD98059 inhibiert werden. Phosphorylierte ERK (pERK) bewegt sich zwischen Nukleus und Zytoplasma. Längere Aktivierung von ERK fördert die Zelldifferenzierung. Kurzfristige ERK-Aktivierung fördert hingegen die Proliferation. DUSP4 (dual-specificity protein phosphatase)-4 dephosphoryliert pERK. STYX (Serine/Threonine/Tyrosine-interacting Protein) ist eine Pseudophosphatase aus der gleichen Proteinfamilie wie DUSP4 und konkurriert um dessen ERK-Bindungsstelle. STYX und DUSP4 sind im Nukleus lokalisiert. Im Gegensatz zu DUSP4 verzögert STYX die Dephosphorylierung von pERK und deren Export aus dem Nukleus. Überexpression von STYX vermindert Differenzierung, ein *knockdown* wiederum senkt die Zellmotilität. [115]

Agonisten und Antagonisten

Arginin-Vasopressin (AVP) und Oxytocin (OT)

AVP und OT sind zyklische Peptide aus 9 Aminosäuren. (Abbildung 1.3) Eine Disulfidbrücke zwischen Cystein 6 und Cystein 1 generiert einen Ring aus 6 Aminosäuren und einen C-terminalen Rest aus 3 Aminosäuren. OT hat ein Isoleucin an Position 3 und ein Leucin an Position 8. AVP hat hingegen ein Phenylalanin an Position 3 und ein Arginin an Position 8. In beiden Peptiden ist ein C-terminales Glycinamid für die biologische Aktivität essentiell. AVP und OT werden im Hypothalamus synthetisiert und von der Neurohypophyse sezerniert. [42]

Die Ausschüttung von AVP wird von Osmorezeptoren und Barorezeptoren, welche die Plasmaosmolarität bzw. den Blutdruck registrieren, reguliert. Angiotensin II und Norepinephrin stimulieren die Sezernierung von AVP. [94] AVP hat eine biologische Halbwertszeit von 18 min und wird von der Aminopeptidase Vasopressinase (auch Oxytocinase oder *placental leucine*

aminopeptidase) abgebaut. Vasopressinase inaktiviert AVP durch Spaltung des N-terminalen Cysteins. [94]

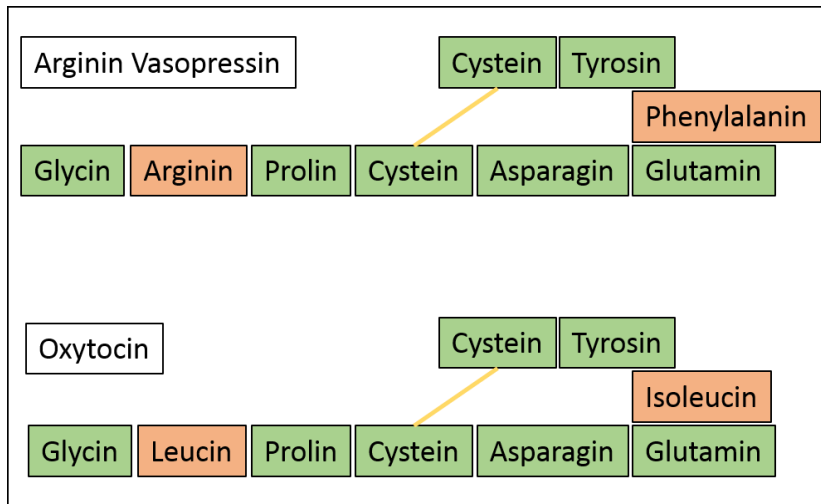


Abbildung (1.3): Aminosäuresequenz der Peptide Arginin-Vasopressin (AVP) und Oxytocin. Die divergenten Aminosäuren sind rot markiert. Die Disulfidbrücke, welche die Ringstruktur erzeugt, ist gelb dargestellt.

Synthetische Agonisten und Antagonisten

Desmopressin (dDAVP) ist ein V2R-selektiver synthetischer Agonist. dDAVP wurde aus AVP durch Deaminierung der Position 1 und Substitution von L- durch D-Arginin an Position 8 generiert. (Abbildung 1.4) [47]

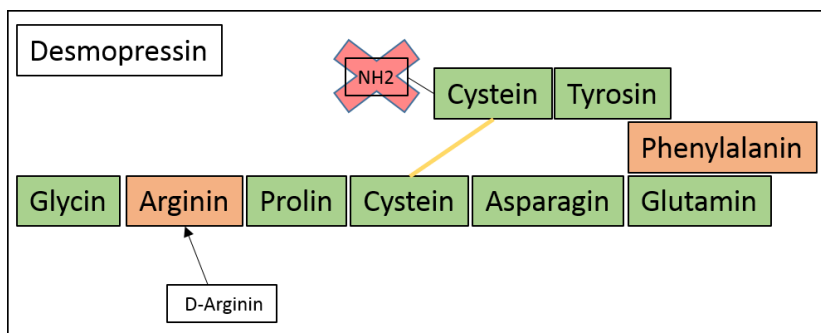


Abbildung (1.4): Cystein wird deaminiert und L-Arginin mit D-Arginin getauscht um Desmopressin aus AVP zu generieren.

Synthetische Vasopressinrezeptorantagonisten werden als "Vaptane" bezeichnet. Definiert werden sie zu dem als *aquaretics*, da ihre Hauptfunktion darin besteht die V2R induzierte Insertion von AQP2 Wasserkanälen in die Zellmembranen, somit die Rückresorption von Wasser in den Nieren, zu hemmen. Lixivaptan (VPA-985), Tolvaptan (OPC-41061) und Satavaptan (SR121463) sind selektiv für den V2R. Conivaptan (YM087) ist selektiv für V2R und V1a. Relcovaptan (SR49059) ist selektiv für den V1aR und Nelivaptan (SSR-149415) ist selektiv für den V1bR. [46] Tolvaptan und Conivaptan sind für die Behandlung von Hyponaträmie

zugelassene Medikamente. [93][95] Die Bindungsaffinitäten der Liganden werden in Tabelle 1.1 dargestellt.

Bindungsaffinität in $-\log[K_i]$, M	Agonisten			Antagonisten		
	Rezeptor	AVP	OT	dDAVP	Satavaptan	Tolvaptan
V1aR	8,5 - 9,3	6,9 - 8,3	7,0 - 7,7	6,5	7,9	8,1 - 9,3
V1bR	9,0 - 9,5	5,7 - 7,0	7,7 - 8,2	4,3	-	6,3 - 7,3
V2R	7,9 - 9,1	5,4 - 6,8	7,2 - 8,6	8,4 - 9,3	9,4	6,6 - 6,9
OTR	7,3 - 9,3	8,2 - 9,6	6,7 - 7,6	-	-	6,5 - 7,0

Tabelle (1.1) Quelle: <http://www.iuphar-db>: Die Werte wurden in Inhibitionsexperimenten ermittelt. IC50 (inhibitory concentration) ist die Menge an unmarkierter Substanz, die benötigt wird um 50% der spezifischen Bindung des Radioliganden zu inhibieren. K_i wird durch die Formel $[K_i = (IC_{50})/(1+F/K_d)]$ berechnet. F ist die Konzentration des ungebundenen Radioliganden und K_d die Bindungsaffinität des Radioliganden [50]

Bestimmung allosterischer Interaktionen

Allosterische Liganden binden an eine Bindungsstelle (allosterisch), die sich von der primären Bindungsstelle (orthosterisch) des endogenen/primären Liganden, unterscheidet. Beide Liganden bilden so mit dem Rezeptor einen ternären Komplex. Im Rahmen einer Radioligandenbindungsstudie können die Effekte des allosterischen Liganden auf Affinität des primären Liganden untersucht werden. [50] Im Kapitel "**Domänen des V2R > Transmembrandomäne (transmembrane domain)**" wird die Bindung der V2R-Liganden beschrieben.

Pharmakotherapeutische Signifikanz des V2R

Angeborener Renaler Diabetes Insipidus (NDI)

Genetisch unterscheidbar sind X-gebundene NDI, welche durch einen defekten oder intrazellulär retinierten V2R verursacht wird, und autosomal-rezessive NDI, ausgelöst durch Mutation des AQP-2. Der V2R befindet sich auf basolateraler Seite in den Primärzellen der Niere und reagiert auf AVP mit einer Signalkaskade, die die Fusion von AQP-2 mit der apikalen Seite der Primärzellen bedingt. AQP-2 ermöglicht die Rückresorption von Wasser. Lokalisation und Mechanismus der Aktivierung des V2R in der Niere werden im Kapitel „**Funktion des V2R > G Protein abhängige Effekte**“ detailliert beschrieben. Klinisch äußern sich die genannten Formen der NDI in ähnlich. Bereits unmittelbar nach der Geburt ist die Rückresorption von Wasser beeinträchtigt. Dies führt zu Dehydrierung, Hyponaträmie und, in weiterer Folge, wiederkehrendem Fieber und Erbrechen. Durch die entsprechende Zugabe von Wasser kann den Symptomen und einer Beeinträchtigung der geistigen Entwicklung entgegen gewirkt werden. Bei Erwachsenen äußert sich NDI durch Polyurie (exzessive Urinausscheidung, in extremen Fällen über 20 l am Tag) und Polydipsie (exzessives Durstgefühl). [2]

Inadäquate Antidiurese (syndrome of inappropriate antidiuresis, SIAD)

Inadäquate Antidiurese (*syndrome of inappropriate antidiuresis*, SIAD) wird charakterisiert durch Hyponaträmie (Verringerung des Natriumgehaltes im Plasma aufgrund der Retention von Wasser), zu starke Konzentrierung des Urins in Abwesenheit eines Nierenleidens oder eines nicht-osmotischen Stimulus, der die Sezernierung von AVP fördert. Ursachen von SIAD sind eine erhöhte Freigabe von AVP durch die Neurohypophyse unabhängig von einem osmotischen Stimulus; ektopische Produktion von AVP in Tumoren; eine Verstärkung der Sensitivität der Niere für AVP; sowie Mutationen in Genen der AVP-bedingten Signalgebung. [94]

Von-Willebrand-Syndrom (VWD, Von-Willebrand-disease)

Von-Willebrand-Syndrom ist die häufigste, autosomal vererbte Bluterkrankheit. Eine verringerte Konzentration von von-Willebrand-Faktor (vWF) im Blut, wie es bei Typ 1 VWD der Fall ist, kann durch Mutation des vWF verursacht werden, die dessen Lagerung, Sekretion und

Lokalisation innerhalb der Zellen beeinflusst. Eine erhöhte Clearance des vWF kann ebenfalls zum Auftreten von Typ 1 VWD führen, wird jedoch offenbar nicht durch Mutation des vWF verursacht. Wie bereits beschrieben kann Typ 1 VWD durch Desmopressin, und die damit verbundene erhöhte Freigabe des vWF aus vaskulären Endothelzellen, therapiert werden. Typ 2 VWD zeichnet sich hingegen durch die Expression von fehlerhaften VWF aus; Typ 3 VWD durch einen schweren, weil homozygoten Defekt. [117]

Plasminogen-Aktivierung

Es ist seit langem bekannt dass Infusion von Vasopressin bzw. von Desamino-D-Arginin-Vasopressin die fibrinolytische Aktivität im Plasma erhöht, die Plasmakonzentration von Gerinnungsfaktor VIII und von-Willebrand-Faktor (VWF) steigert. [82][83] Die Vasopressin-vermittelte Erhöhung der Fibrinolyse im Plasma ist wahrscheinlich auf die Ausschüttung von t-PA (tissue-Plasminogenactivator) aus Weibel-Palade Körper in vaskulären Endothelzellen zurückzuführen. [114] Es gibt jedoch auch Befunde, dass Vasopressin die Sezernierung von Urokinase (uPA), wenn auch offenbar abhängig vom untersuchten Zelltyp, reguliert. So wird in LLC-PK1 Zellen (Nierenzelllinie aus dem proximalen Segment des Sammelrohres von Schweinen) die u-PA Aktivität durch Vasopressin bzw. durch erhöhtes Aufkommen von cAMP und PKA verstärkt; in RC.SVtsA58 (eine primäre Kaninchen Zelllinie, die mit dem temperatursensitiven SV40 Stamm tsA58 infiziert wurde) hat Vasopressin hingegen den gegenteiligen Effekt. [52]

Der Plasminogenaktivator (PA) Urokinase (uPA), eine Serinprotease, die Plasminogen zum proteolytisch aktiven Enzym Plasmin konvertiert, vermittelt fibrinolytische Aktivität. UPA liegt zunächst als pro-uPA vor und wird durch die Interaktion mit dem Rezeptor (uPA-R), der ebenfalls in der Niere expremiert wird, zu uPA umgewandelt. Die Spaltung von pro-uPA wird in erster Linie von Plasminogen selbst vermittelt. [52] Die Expression von uPA kann zudem über die Protein Kinasen D2 und D3 gesteuert werden. Hemmung der Protein Kinasen D2 und D3 reduzierte in diesem Zusammenhang die Metastasenbildung von Prostatakrebszellen. [54] UPA wird in großen Mengen im Urin nachgewiesen und verhindert vermutlich die Bildung von Proteinaggregaten (speziell Fibrin) in der Niere, die sonst zur Verstopfung führen könnten. Zudem ist uPA in Angiogenese, Entzündung und Tumormetastasierung involviert. [53]

Wirkung von Vasopressinrezeptoren in SCLC (small-cell lung carcinoma) und MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) Zellen

In SCLC Zellen (*small-cell lung carcinoma*) und MCF-7 Zellen (*Michigan Cancer Foundation-7*, Brustkrebszelllinie) wurde die Expression von Vasopressinrezeptorgenen sowie Oxytocin und AVP-Genen festgestellt. [48][49] Behandlung von SCLC Zellen mit Oxytocin oder AVP hat einen wachstumsfördernden Effekt: Der Stimulus wird durch Oxytocin Rezeptor und V1a Rezeptor auf MAPK übertragen.

MCF-7 Zellen exprimieren V1aR, V1bR und V2R. Zugabe von dDAVP zeigt einen anti-proliferativen Effekt und verlangsamt das Wachstum der Zellen. [47] Aktivierung von Adenylatzyklase, insbesondere das gebildete cAMP, hat einen cytostatischen Effekt in MCF-7 Zellen. [64]

Fragestellung und Zielsetzung der Masterarbeit

V2R-Konstrukte mit “Lesefehlermutationen”, die zum Austausch einzelner Aminosäuren führten, wurden durch Transfektion in kultivierbaren Zelllinien zur Expression gebracht. Der Lesefehler betraf in allen untersuchten Konstrukten die kodierende Sequenz der Transmembrandomäne obzwar an unterschiedlichen Segmenten. Die Rezeptordichte an der Zelloberfläche wurde durch Antikörpermarkierung geschätzt und der Effekt einer Inkubation mit Rezeptorliganden geprüft. Bei den Liganden handelte es sich um zellgängige Substanzen unterschiedlicher Struktur mit bekannter antagonistischer Wirkung und Escorteigenschaft. Die erste Frage, die ich beantworten wollte, war die nach der Wahrscheinlichkeit, dass mutante Rezeptoren durch Rezeptorliganden escortierbar sind.

Oberflächendichte und Escort- bzw. Pharmakochaperoneffekt sollten zwischen mutanten Konstrukten und dem Wildtyprezeptor verglichen werden. Prüfgrößen für den Escorteffekt waren Oberflächendichte und Rezeptorsignalgebung. In weiteren Konstrukten wurde durch c-terminale Fusion mit GFP die cytoplasmatische Domäne stabilisiert. Es stellte sich die Frage, ob eine Stabilisierung der cytoplasmatischen Rezeptordomäne den Rezeptor mit Mutation in der Transmembrandomäne beeindruckt. Diese Frage sollte anhand des Expressionsniveaus und des Escorteffekts beantwortet werden.

Das dritte Thema war Unterstützung des Pharmakochaperons durch Geldanamycin. In einer vorangegangenen Publikation hatte Geldanamycin, ein Inhibitor der ATPase des HSP90-Hitzeschockproteins den Export des G-Protein-gekoppelten Adenosinrezeptors (A_{2A} -Subtyp) gefördert. [80] Dieser Rezeptor ist refraktär für Pharmakochaperonliganden. Anhand der V2R-Konstrukte sollte untersucht werden, ob die Wirkung von Geldanamycin auf andere Rezeptoren übertragbar ist. Da Geldanamycin den retinierten V2-Rezeptor mobilisierte, waren der Effekt und seine Grundlage weiter zu charakterisieren. Würde es eine gegenseitige Wirkungsverstärkung zwischen Geldanamycin und dem Pharmakochaperon geben? Lag dem Effekt eine physische Assoziation HSP90-Rezeptor zugrunde? War der Geldanamycineffekt ein Konsequenz von ER-Stress, wenn durch heterologe Expression die Rezeptorproteinmenge die Prozesskapazität des ER übersteigt.

Methoden und Materialien

Plasmide

- **peCFP-ER** (Anmk.: N-terminales calER = *ER targeting sequence of calreticulin*, C-terminale KDEL Sequenz = ER Rücktransportsignal)
- **pcDNA3** (Anmk.: als Leervektor)
- **peGFP1-N1, peCFP1-N1, peYFP1-N1** (Anmk.: CMV-Promoter, C-terminales GFP/CFP/YFP, für alle V2R-Konstrukte mit C-terminalem GFP/CFP/YFP)
- **pCMV-Tag2B** (Anmk.: CMV-Promoter, für N-terminales Flag, für alle Flag-Konstrukte ohne GFP)
- **V2R-Konstrukte** (humane Sequenz, humane Sequenz mit Punktmutation, TM Segment):
 - S318I (TM7), T273R (TM6), P217R (TM5), A163E (TM4), T134A (TM3), Q92P (TM2), F48R (TM1)
- Benennung der Konstrukte
 - [N-terminale Markierung] - [V2R-Variante] - [C-terminale Markierung]
 - d.h.: Flag-Wt-Gfp, Flag-273-Yfp, Flag-318, 92-Gfp, etc.
 - Rezeptorkonstrukte c-terminal fusioniert mit GFP/CFP/YFP inseriert in den entsprechenden peXFP-Vektor.
 - Rezeptorkonstrukte mit nativem C-Terminus inseriert in pCMV-Tag2B

Antikörper

Primärantikörper	Herkunft	Anwendung	
M2 anti-Flag IgG1	Maus, monoklonal	13,3µg/ml	Immunpräzipitation
M2 anti-Flag IgG1	Maus, monoklonal	1 µg/ml	FACS
anti-HSP70 [C92F3A-5]	Maus, monoklonal	1:1000	Immunoblot
OctA-Probe (D-8) anti-Flag	Kaninchen, polyklonal	1:800	Immunoblot
anti-eGFP	Kaninchen, polyklonal	1:2000	Immunoblot
anti-HSP90αβ	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Immunoblot
anti-HSP90α [2G5.G3]	Maus, monoklonal	1:2000, 6,6µg/ml	Immunoblot, Immunpräzipitation
anti-HSP90β [H90-10]	Maus, monoklonal	1:1000, 6,6µg/ml	Immunoblot, Immunpräzipitation

Sekundärantikörper	Herkunft	Anwendung	
anti-rabbit IgG, HRP konjugiert	Esel, polyklonal	1:5000	Immunoblot
anti-mouse IgG, HRP konjugiert	Schaf, polyklonal	1:5000	Immunoblot
anti-mouse IgG1 markiert mit PerCP-Cy5.5	Ratte, monoklonal	1:500	FACS
F(ab') ₂ Fragment von anti-mouse IgG (H+L), AlexaFluor488	Ziege, polyklonal	1:500	FACS
anti-mouse IgG (H+L), AlexaFluor568	Ziege, polyklonal	1:1000	Immunzytochemie

Oligonukleotide

	forward Sequenz (5'-3')	reverse Sequenz (5'-3')	Produktlänge (bp)
GAPDH	GGTCGGAGTCAACGGATTTGGTCG	CCTCCGACGCCTGCTTCACCAC	683
CHOP	ACCAAGGGAGAACCAGGAAACG	TCACCATTCCGGTCAATCAGAGC	201
BIP	CGACCTGGGGACCACCTACT	TTGGAGGTGAGAGCTGGTTCTT	162
XBPI	ATGGTGCCAGCCCAGAGAGGG	TGCTGCAGAGGTGCACGTAGTCT	410

Zellkultur

- *Phosphate-buffered saline (PBS)-Puffer*
 - KCl [2.7 mM]
 - KH₂PO₄ [1.5 mM]
 - NaCl [137 mM]
 - Na₂HPO₄-2*H₂O [4.3 mM]
 - pH = 7.3-7.4
- DMEM (*dulbecco's modified eagle medium*)
- FCS (*fetal calf serum*)
- Trypsin (0,5%)
- EDTA (0,02%)
- Penicillin/Streptomycin (P/S)
- DMSO (Dimethylsulfoxid)

Kultivierung

Die Kultivierung von HEK293 (*human embryonic kidney* Fibroblastenzelllinie), HELA (Henrietta Lacks, karzinomatöse Epithelzelllinie) und Cos-7 (*CV1 in Origin, carrying SV40*, Fibroblastenzelllinie aus *African green monkey*) Zellen erfolgte in DMEM-Nährmedium mit FCS (10%), Penicillin/Streptomycin (P/S, 10µg/ml), Glucose (4,5 g/l) und L-Glutamin (4 mM). Da L-Glutamin zur de novo Purinbiosynthese benötigt wird, verzögert ein Mangel die Zellteilung. Im Brutschrank wurden die Zellen bei einer Luftfeuchtigkeit von 95%, einem CO₂-Gehalt von 5% und einer Temperatur von 37°C gezüchtet. Um die Zellen von den Schalen zu lösen und zu splitten, wurde das Nährmedium entfernt, mit PBS gewaschen und mit Trypsin inkubiert. Zu beachten ist, dass Zellen für Experimente, bei denen die Oberflächenexpression Rezeptors

untersucht werden sollte, stattdessen mit EDTA (0,02%) abgelöst wurden, um den Verdau durch Trypsin zu vermeiden.

Einfrieren zur Lagerung

- *Freezing medium* (90% FCS + 10% DMSO)

Konfluente Zellen einer 15-cm Schale wurden mit PBS gewaschen, mit Trypsin behandelt und in 10 ml Nährmedium resuspendiert. In einem sterilen 15 ml Röhrchen wurden die Zellen mit 300xg für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zellpellet in 2,1 ml *Freezing medium* resuspendiert und auf 3 Kryoröhrchen á 0,7 ml aufgeteilt. Die Kryoröhrchen wurden langsam auf -80°C abgekühlt.

Ernte von Zelllysaten

- Lysepuffer („complete Lysis-M“, Roche)
- Protease-Inhibitoren (Roche)

Konfluente Zellen einer 6-cm Schale wurden mit PBS gewaschen und in 500µl NP40-haltigem Lysepuffer (5 min bei Raumtemperatur) solubilisiert. In einem Mikrozentrifugenröhrchen wurden die Lysate bei 14000xg für 10 min zentrifugiert um unlösliche Bestandteile zu entfernen. Die Überstände wurden bei -80°C gelagert.

Transfektionsmethoden

Polymer-DNA Komplexe

Die Transfektionsreagenzien JetPEI (PEI = Polyethylenimin) und JetPRIME von Polyplus sowie TurboFect von Fermentas sind kationische Polymere. Die Polymere bilden mit DNA bzw. Oligonukleotiden positiv geladene Komplexe, die über Endozytose in die Zelle gelangen. Die Reagenzien wirken, nach Angaben des Herstellers, in den Endosomen ähnlich einem Schwamm der Protonen aufnimmt. Einerseits wirken die Polymere als Puffer und schützen die DNA vor dem sauren pH-Wert in den Endosomen, andererseits schwellen die Polymere an, brechen die Endosomen auf und geben die DNA frei. Die Plasmide erreichen den Nukleus spätestens während der Mitose.

Alternativen

DNA Kalziumphosphat Präzipitate

In Anwesenheit von Phosphat- oder Karbonationen ist Kalzium schlecht löslich. In einer übersättigten Lösung fällt Kalziumphosphat aus, anwesende DNA wird in das Präzipitat eingebaut. Dieses DNA-Kalziumphosphat Präzipitat wird von Zellen aufgenommen. [100]

DNA Lipid/Liposom Komplexe, Lipid-basierende Transfektion

Kationische Lipide, bestehend aus einer positiv-geladenen Kopfgruppe und 1 bis 2 Kohlenwasserstoffketten, interagieren mit der negativ geladenen DNA. Alternativ handelt sich um neutrale Lipide, welche DNA in Liposomen umschließen. Der Lipid/Liposom-DNA Komplex vereint sich mit der Plasmamembran und gibt die DNA ins Zytoplasma frei. Da nicht auszuschließen ist, dass die Transfektionslipide in den zellulären Membranen erhalten bleiben und Diffusionseigenschaften membranständiger Proteine verändern, verwendete ich zur transienten Transfektion keine Lipid-basierenden Reagenzien.

Transfektion mit JetPEI von Polyplus

Zum Zeitpunkt der Transfektion soll eine Konfluenz von 50-70% erreicht sein. Die Reaktion wurde entsprechend den Spezifikationen des Herstellers zusammengestellt:

Größe der Zellkulturschale [cm]	DNA Menge [µg]	JetPEI Reagenz [µl]	NaCl-Lösung, jeweils für DNA und JetPEI [µl]	Reaktionsvolumen pro Schale [µl]
6	5	10	125	250
10	15	30	250	500
15	20	40	500	1000

Der JetPEI-NaCl Mix wurde zum DNA-NaCl Mix hinzugefügt. Die Lösung wurde mit einem Vortex gemischt und mit einer Tischzentrifuge kurz abzentrifugiert. Anschließend wurde sie für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Bildung der DNA-Polymerkomplexe zu erlauben.

Transfektion mit JetPRIME von Polyplus

Zum Zeitpunkt der Transfektion soll eine Konfluenz von 60-80% erreicht sein. Entsprechend der Angaben des Herstellers wurden zunächst pro 3 cm-Napf einer 6-Napf-Platte 2 µg DNA mit 200 µl JetPRIME Puffer gemischt. Anschließend wurden 4 µl JetPRIME Reagenz hinzugegeben und die Mischung 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Tropfenweise wurden 200 µl der Reaktion zu den Zellen gegeben.

Generierung stabiler Linien nach Transfektion mit TurboFect von Fermentas

HEK293-Zellen wurden in einer 10 cm Schale auf 60-90% Konfluenz gezüchtet. Für die Transfektion wurden zunächst 10 µg DNA in 1 ml serumfreien Nährmedium verdünnt und 20 µl TurboFect hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur, um die Bildung der DNA-Polymerkomplexe zu erlauben, wurde der Transfektionsmix zu den Zellen gegeben. Am Tag nach der Transfektion wurde 500 U/ml G418 (Geneticin, Stammlösung 30.000 U/ml) als Selektionsmittel zu den Zellen gegeben. Nicht-resistente Zellen gehen nach etwa 3 bis 5 Tagen unter. 10-14 Tage später konnten stabile, polyklonale Zellen erhalten werden. Expression des Konstrukts wurde mittels Durchflusszytometrie getestet.

Generierung von komplementärer DNA (cDNA) mit reverse-transcription PCR (rtPCR) und spezifische Amplifikation mit PCR

Extraktion der mRNA

- TRIzol Reagenz von Sigma-Aldrich
- Chloroform
- Isopropanol
- Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltes destilliertes Wasser (RNase-freies Wasser)
- Nanophotometer (Nanodrop von Implen)
- Ethanol (75%)

Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden bei 300*g für 5 min sedimentiert und das Pellet in 1 ml TRIzol Reagenz resuspendiert. TRIzol Reagenz besteht aus dem chaotropen Guanidinisothiocyanat (denaturiert DNasen und RNasen, lysiert Zellen) und Phenol (reaktives und denaturierendes Lösungsmittel und Detergenz). Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Probe bei -20°C gelagert. Zur Trizolsuspension wurden 0,2 ml Chloroform hinzugegeben und das Röhrchen für 15 sec geschüttelt. Nach einer Inkubationszeit von 3 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Probe mit 15.000*g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden 3 Phasen erkennbar. **Oben:** Die farblose, wässrige Phase, welche die RNA enthält. **Mitte:** Die weiß verfärbte DNA-enhaltende Interphase. **Unten:** Die rote, organische Phase, die

TRIzol, Chloroform und Proteine enthält. Die wässrige Phase wurde, ohne die Phasentrennung zu stören, abgehoben und in ein neues Röhrchen übertragen. 0,5 ml Isopropanol wurden hinzugegeben. Nach Vortexen wurde die Mischung für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch den Alkohol gefällte RNA wurde bei 15.000*g pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 1 ml Ethanol (75%ig) gewaschen und bei 6000*g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet kurz luftgetrocknet. Es wurde darauf geachtet, dass das Pellet nicht austrocknet, da dies eine Resuspension erschwert. Das Pellet wurde, je nach Größe, in 50-100 µl RNase-freiem, Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem destillierten Wasser resuspendiert. Durch DEPC werden RNasen gehemmt. Die Konzentration der RNA wurde bei 260 nm mit einem Nanophotometer bestimmt, wobei 1 mg/ml RNA eine Absorption von 40 ergibt. Gemessen wurde außerdem die Absorption bei 280 nm. Die Ratio (ABS260nm/ABS280nm) sollte bei etwa 2 liegen. Niedrigere Werte weisen auf eine durch Phenol oder Proteine verunreinigte Probe hin. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

reverse-transcription PCR (rtPCR)

Mit dieser Methode können cDNA Kopien von RNA amplifiziert werden. Um cDNA zu erhalten, wird die RNA mit einem Oligodeoxynukleotid Primer (Beispielsweise Oligo(dT) Primer, welche an das poly(A)+ Ende der mRNA von Säugetieren binden) hybridisiert. Eine RNA-abhängige DNA Polymerase synthetisiert cDNA-Kopien der mRNA. Die generierten cDNA-Stränge können mit PCR amplifiziert werden. [65]

Für die Generierung von cDNA aus der isolierten RNA wurde das "RevertAID H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit" von Fermentas verwendet. Das Reaktionsgemisch enthielt den Angaben des Herstellers entsprechend:

Substanz	Pro Reaktion
5xReaktionspuffer (250mM Tris-HCL pH 8,3; 250 mM KCl; 20mM MgCl ₂ ; 50mM DTT)	4 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
oligo(dT)18 (100µM, 0,5 µg/µl)	1 µl
RNA	≤ 100 ng
RiboLock RNase Inhibitor (schützt RNA vor Abbau durch RNasen)	1 µl
RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (trägt eine Punktmutation, die RNase H Aktivität eliminiert)	1 µl

Der Mix wurde für 60 min bei 42°C (Synthese der Oligo(dT)18 geprimeten cDNA) und anschließend 5 min bei 70°C (Terminierung der Synthese) inkubiert. Die erhaltene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Semi-quantitative PCR

Der PCR-Mix wurde nach folgendem Schema in einem Volumen von 50 μl pro Ansatz zusammengestellt:

Substanz	Pro Reaktion mit einem Volumen von 50 μl
5xReactionBufferO (green), pH 8,5	10 μl
dNTP [10mM]	1 μl
GoTaq-Polymerase	0,25 μl
cDNA	60 ng
fwd-primer (10 μM)	2 μl
rev-primer (10 μM)	2 μl

GoTaq ReactionBufferO (green) von Promega enthält einen blauen und gelben Farbstoff, sowie eine Substanz, welche die Probandichte erhöht und das direkte Laden auf ein Agarosegel ermöglicht. Der blaue Farbstoff migriert in einem 1% Agarosegel ähnlich einem 3-5 kb großem DNA-Fragment, der gelbe Farbstoff migriert schneller als Oligonukleotidprimer in einem 1% Agarosegel.

GoTaq-Polymerase bzw. Taq-Polymerase katalysiert die 5'-3' Synthese von DNA, ist thermostabil, hat 5'-3' Exonuklease Aktivität und erzeugt PCR-Produkte mit einem zusätzlichen Adenin am 3'-Ende.

Der PCR-Cycler wurde folgendermaßen programmiert:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung (Aufschmelzen des Doppelstranges)	95°C	2 min	1x
Denaturierung	95°C	1 min	28x
Verschmelzung der Primer mit dem Einzelstrang	55°C (Xbp1) 60°C (GAPDH, Bip, Chip)	1 min	
Strang-Synthese	72°C	1 min/kb	
Erweiterung	72°C	5 min	1x

Theoretisch kommt es zu einer Verdopplung des PCR-Produkts nach jedem Amplifikationszyklus. Nach einer gewissen Anzahl von Zyklen kann jedoch einer der eingesetzten Faktoren (Enzym, Primer, dNTPs) in Unterschuss geraten, wodurch in einem Zyklus keine Verdopplung mehr auftritt. Nach [111] wird Taq Polymerase (0,5 - 2,5 units) limitierend wenn $1,4 \cdot 10^{12}$ bis $7 \cdot 10^{12}$ amplifizierte Moleküle vorhanden sind. Die eingesetzte Menge Primer (0,4 μM in 50 μl) entspricht $2,4 \cdot 10^{13}$ Molekülen, Primer sind somit im Überschuss vorhanden. Wird eine 100%ige Effizienz des Enzyms (1,25 unit in der Reaktion) angenommen, und 1 Molekül GAPDH (Produktlänge von 683 bp, somit innerhalb eines 1-minütigen

Erweiterungsschrittes bei 72°C von Taq-Polymerase vollständig amplifizierbar), tritt dieser Fall nach etwa 41,67 Zyklen ein, da $3,5 \cdot 10^{12}$ Moleküle GAPDH-Produkt erzeugt wurden. Eine geringere Effizienz des Enzyms, und eine Senkung der Effizienz während des Prozesses (Primer-Hybridisierung, Strang/Gegenstrang-Hybridisierung, unspezifische Bindung) erhöhen die Zahl der Zyklen, die benötigt werden bevor das Enzym unterschüssig wird.

Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

- TAE-Puffer (Tris [40mM], Acetat [20mM], EDTA*Na₂ [1mM]; pH8,5)
- Serva DNA Stain Green Clear G (1ml für 25l Agarosegel laut Hersteller) von Serva
- 100 bp GeneRuler von Thermo
- Gel Doc1000 mit CCD Kamera von BioRad

Mit dieser Methode können DNA Fragmente mit einer Größe von 50 bis 20.000 bp aufgetrennt und sichtbar gemacht werden. Agarose ist ein lineares Polymer aus D- und L-Galaktose, die unterschiedlich große Kanäle bilden, durch welche die DNA Fragmente migrieren können. Ein konstantes, elektrisches Feld bewegt DNA durch das Gel, wobei ihre Bewegungsgeschwindigkeit negativ mit der Größe der Fragmente korreliert. Das Gel ist mit fluoreszierenden, Farbstoffen (zum Beispiel Serva Green) versetzt, die sich in die DNA-Windungen einlagern (Interkalation). [65] Serva Green kann mit UV-Licht (270 nm oder 295 nm) angeregt werden und emittiert nach Interkalation Licht mit etwa 530 nm Wellenlänge.

Protokoll

Das Gel enthielt 2% Agarose in TAE-Puffer (1 g Agarose in 50 ml TAE-Puffer) und *Serva Green* (2 µl). Das Agarosepulver wurde eingewogen und in TAE-Puffer durch Erhitzen in einer Mikrowelle aufgelöst. Die Lösung wurde auf etwa 55°C abgekühlt und *Serva Green* hinzugefügt. Anschließend wurde sie in eine Gelkammer gegossen und ein Kamm als Platzhalter für die Probenaschen eingefügt. Nach dem Auspolymerisieren wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine Elektrophoreseapparatur transferiert. Als Elektrophoresepuffer wurde TAE (1x) verwendet. Als Größenmarker wurde 100 bp GeneRuler eingesetzt. Die Elektrophorese wurde bei 120 V für 40 min durchgeführt. Gel Doc1000 mit CCD Kamera wurde verwendet um die, durch *Serva Green* und UV-Licht sichtbar gemachten DNA-Banden zu fotografieren.

Auswertung mittels densitometrischer Analyse

Mit dem Programm "WCIF Image J" wurde die Schwärzung der cDNA-Banden im Vergleich

zum Hintergrund gemessen. Unterschiedlich starke GAPDH-Banden (*Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase*) stellen Variation in der cDNA-Ausgangsmenge dar. Daher wurde bei der densitometrischen Quantifizierung von variabel exprimierter RNA auf GAPDH-Bandenstärke Rücksicht genommen. In der aeroben und anaeroben Glykolyse katalysiert GAPDH die Umsetzung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu Phosphoglycerat (und die reverse Reaktion bei der Gluconeogenese). Weil die Expression von GAPDH offensichtlich konstitutiv erfolgt, gilt sie als konstant und eignet sich als Vergleichsbasis für RNA/cDNA Ausbeute. In Abbildung 2.1 wurde das Expressionsniveau von BiP in HEK293-Zellen, welche den V2R exprimieren mit untransfizierten HEK293-Zellen verglichen. Ohne densitometrische Analyse scheint die Bande für BiP in Anwesenheit des V2R am dunkelsten. Bei der Analyse wird ein Bereich um die zu messende Bande markiert und für die Erfassung weiterer Banden als Messschablone verwendet. Das Programm bestimmt die Schwärzung der Pixel im Messbereich und berechnet einen Mittelwert (mittlere Schwärzung). Ein Wert von 0 bedeutet, dass jeder Pixel im Bereich schwarz ist. Der Vergleich der Banden (Tabelle 2.1) ergibt, dass die V2R-Probe etwa 10% mehr GAPDH-Transkript enthält. Weiters zeigt sich, dass die Bande BiP-V2R um den Faktor 1,15 schwärzer ist als BiP-0, das heißt die BiP-Menge um das 1,15fache höher ist. Die Messsicherheit leidet daran, dass der Unterschied durch weniger als einen PCR-Zyklus ermittelt wurde; wenn der Unterschied für den Unterschied in den GAPDH-Banden korrigiert wird, ist er vernachlässigbar.

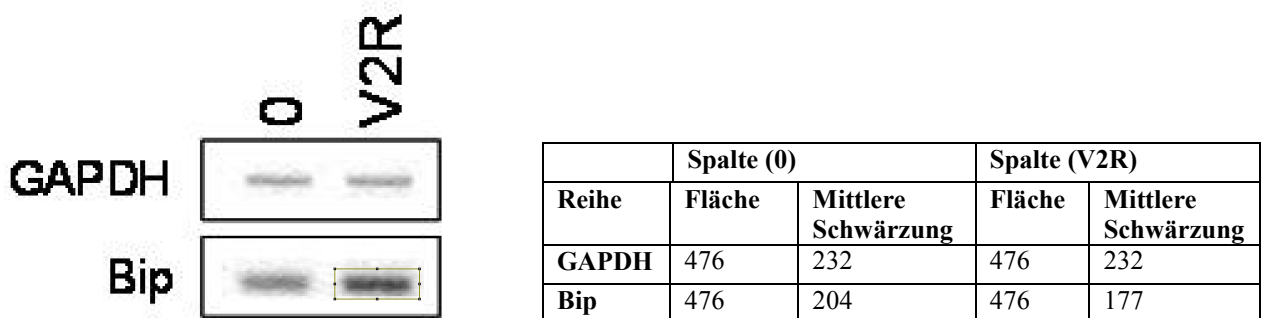


Abb.2.1, Bestimmung von mRNA spezifisch für GAPDH und BiP aus untransfizierten und mit V2R-transfizierten HEK293-Zellen. Nach reverser Transkription der RNA wurde Bip in 36 PCR-Zyklen und GAPDH in 28 amplifiziert und das DNA Produkt auf einem Agarosegel getrennt. Das Rechteck verdeutlicht den densitometrisch analysierten Bereich.

Tabelle 2.1, Die Fläche ergibt sich aus der Größe des Messbereiches (in diesem Fall ein Rechteck). Je dunkler die Bande ist, desto geringer ist der Wert für „mittlere Schwärzung“; das bedeutet eine maximale Schwärzung, bei der jeder Pixel im Messbereich schwarz ist, hat einen Wert von 0.

Experimentelle Induktion von ER-Stress

Die Antibiotika Tunicamycin und Brefeldin A verursachen ER Stress [97]. Tunicamycin hemmt die Glykosylierung der Proteine und verhindert so deren Faltung, es kommt zu einer

Akkumulation ungefalteter Proteine im ER. Brefeldin A inaktiviert ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) und dadurch die Bildung von COPI-Vesikeln. Der Einsatz von Brefeldin A führt zum Kollaps von ERGIC und Golgi [98]. Daher wurde Tunicamycin vorgezogen.

Durchflusszytometrie (FACS, fluorescence-activated cell sorting)

Zellen in Suspension werden mittels Überdruck in eine Messzelle gepresst und mit einem Laser (Wellenlänge von 488 nm) bestrahlt. Die Vorwärtsstreuung (FSC, *forward scatter*) korreliert mit der Größe der Zellen. Die Seitwärtsstreuung (SSC, *side ward scatter*) korreliert mit der Granularität der Zellen und der Komplexität des Zellkerns [26]. Die Detektion von nicht-fluoreszierenden Zielproteinen an der Plasmamembran erfolgt durch einen Primärantikörper (spezifisch für das Zielprotein) und einen Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper (spezifisch für den Primärantikörper).

Zellen wurde in 6 cm Schalen gezüchtet. Das Nährmedium wurde entfernt und die Schalen mit 5 ml PBS gewaschen. Da Trypsin an der Plasmamembran exprimierte Proteine verdaut, wurden adhärenente Zellen für FACS-Experimente mit 1 ml EDTA (0,02%) abgelöst. Die Zellen wurden resuspendiert und in Zentrifugenröhrchen auf Eis (4°C) transferiert. 9 ml PBS wurden hinzugegeben. Die Röhrchen wurden bei 200*g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 300 µl PBS (1% BSA) resuspendiert. Falls ein GFP-markiertes Protein untersucht wurde, wurde keine Färbung mit einem Antikörper durchgeführt, da der Laser (488nm) bei Markierung Antikörper und GFP-Fluoreszenz anregen würde. Für nicht-fluoreszierende Proteine (nur FLAG-Markierung) wurden 100 µl Aliquote der Zellsuspension in Mikrozentrifugenröhrchen übertragen und Primärantikörper (M2-FLAG) eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min auf Eis (4°C) wurde ein fluoreszierender Sekundärantikörper (Anregungswellenlänge 488nm) hinzugegeben und lichtgeschützt für 20 min auf Eis (4°C) inkubiert. 1 ml PBS wurde hinzugegeben und die Röhrchen mit 300 *g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Pellets in 300 µl PBS (1% BSA) resuspendiert. Für die Messung wurde die Zellsuspension gut resuspendiert und ein Teil in FACS-Röhrchen transferiert und mit 1 ml PBS verdünnt. Vor der Messung wurde die Suspension erneut gemischt, um ein Verklumpen der Zellen zu vermeiden.

Experimentelle Bestimmung der Oberflächenexpression von V2R Konstrukten

V2R-Konstrukte mit einer N-terminalen FLAG Markierung wurden in HEK293-Zellen exprimiert. Eine Behandlung mit V2R-Antagonisten erfolgte, sofern nicht anders beschrieben, für 18 Stunden vor der Zellernte. Da der N-Terminus des V2R in den extrazellulären Raum weist, konnte das FLAG-Epitop mit dem Antikörper M2-Flag (1:1000) markiert werden. Dieser Primärantikörper wurde mit dem Sekundärantikörper AlexaFluor488 (1:500) oder PerCP Cy5.5 (1:500) detektiert.

Auswertung der FACS-Daten

Das FACS-Gerät bestimmt Vorwärtsstreuung (FSC), Seitwärtsstreuung (SSC) und Fluoreszenz (in diesem Beispiel die Fluoreszenz des Sekundärantikörpers PerCP Cy5.5) für jede Zelle einzeln. Als Messereignisse werden lebende und tote Zellen, Zelltrümmer und etwaige Verunreinigungen registriert (Abb. 2.2). Für die in Abbildung 2.2 analysierte HEK293-Zellsuspension werden in einem Plot der Messereignisse 2 Populationen bestehend aus insgesamt 10.000 Punkten ersichtlich. Die Population mit einem kleinen FSC (X-Achse) und SSC (Y-Achse) besteht hauptsächlich aus toten Zellen oder Zelltrümmern; diese Zellen lassen sich mit Propidiumjodid anfärben. Die andere Population besteht größtenteils aus lebenden Zellen und wurde daher im "Gate G1" für die Darstellung in einem Histogramm markiert. Im Histogramm werden die Zellen aus "Gate G1" des Dotplots anhand ihrer Fluoreszenz (X-Achse) aufgetrennt, wobei ein höherer X-Wert einem stärkeren Signal entspricht. Die Y-Achse zeigt wieviele Zellen einem X-Wert zugeordnet werden. In diesem Experiment (Abbildung 2.2) wurde an HEK293-Zellen ein Flag-V2 Rezeptorkonstrukt vor und nach Behandlung mit dem V2R-Antagonisten Tolvaptan ($3\mu\text{M}$) aufgenommen. Dank niedriger Temperatur und kurzer Inkubationszeit ist davon auszugehen, dass Primärantikörper (M2-Flag) lediglich Rezeptoren an der Zelloberfläche markiert. Die Fluoreszenz von Zellen mit größtenteils intrazellulär retinierten Rezeptoren sollte vernachlässigbar sein. Hintergrundfluoreszenz des Sekundärantikörpers durch unspezifische Bindung wurde an transfizierten Zellen ohne Primärantikörper vor jeder Messung bestimmt (Spezifität der beiden zur Markierung verwendeten Antikörper wurde einmalig an untransfizierten Zellen bestimmt.). Auf diese Art kann ein Schwellenwert der spezifischen Rezeptormarkierung festgelegt werden. In Abbildung 2.2, B ist das Histogramm unbehandelter, Flag-273 exprimierender HEK293-Zellen dargestellt, der Bereich rechts des Schwellenwerts

wurde hier als "Gate M2" bezeichnet. In Abbildung 2.2, D ist das Histogramm der mit Pharmakochaperon vorbehandelten Zellen gezeigt. Man kann bereits erkennen, dass sich der Großteil der Zellen nun innerhalb von M2 befindet, sich somit das Fluoreszenzsignal im Vergleich zu den unbehandelten Zellen erhöht hat.

Zur Quantifizierung werden folgende Werte verwendet:

- **"%positiveEreignisse"**, Der prozentuelle Anteil der Zellen in M2 an der Gesamtpopulation definiert durch Gate G1.
- **"geometrischer Mittelwert, GM"**, Die mittlere Fluoreszenz der Ereignisse in M2 bestimmt als **geometrischer Mittelwert (GM) der Fluoreszenzintensität**.

$$GM(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n) = \sqrt[n]{x_1 * x_2 * x_3 * \dots * x_n}$$

- **AUC**, die "Fläche unter der Kurve" (AUC, *area under curve*) ist das Produkt von **"%positiveEreignisse"** und **"GM"**.

Grundsätzlich wurde darauf geachtet das "Gate G1" vor Beginn der Datenaufnahme festzulegen und 10.000 Ereignisse innerhalb von G1 zu messen. In diesem Beispiel wurden insgesamt 10.000 Ereignisse vom Gerät detektiert und geplottet.

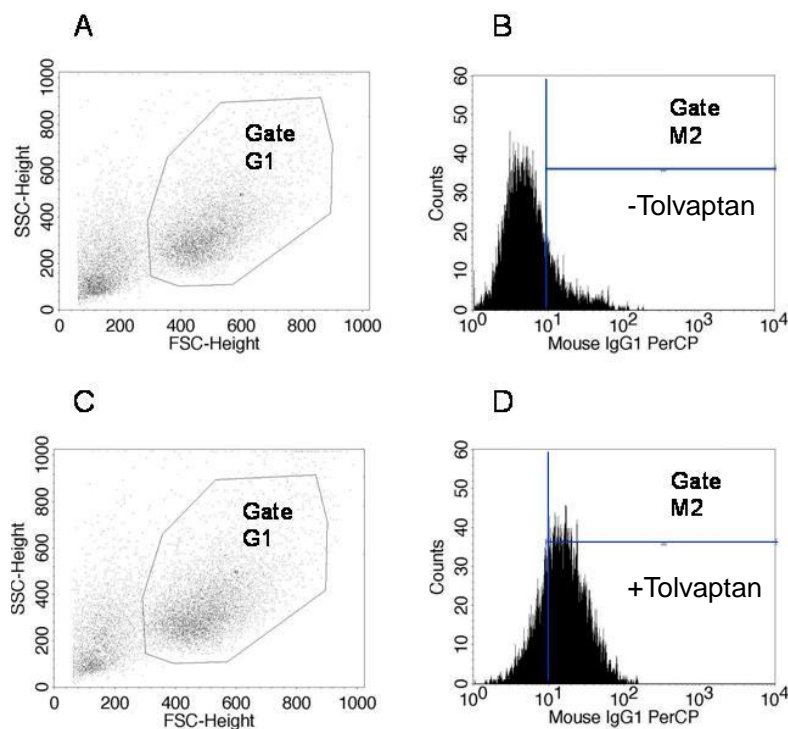


Abb. 2.2, Detektion von FLAG-Rezeptorkonstrukten an der Oberfläche von HEK293-Zellen. A und C zeigen die mit dem FACS detektierten Ereignisse in Form eines Dotplots. Auf der X-Achse ist die Vorwärtsstreuung (FSC, forwardscatter) und auf der Y-Achse die Seitwärtsstreuung (SSC, sidewardscatter) dargestellt. In den jeweiligen Histogrammen (B und D) werden sämtliche Ereignisse aus "Gate G1" ausgewertet. Auf der X-Achse des Histogramms ist in diesem Fall die Fluoreszenz des Sekundärantikörpers PerCP Cy.5.5 aufgetragen. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der detektierten Ereignisse an.

Auswertung des Pharmakochaperoning-Effekts von V2R-Antagonisten, Konzentrations-Wirkungsbeziehung

Wie bereits beschrieben erhöht die Zugabe eines V2R-Antagonisten zu Zellen, die retinierte V2R-Konstrukte exprimieren, die Oberflächenexpression des Rezeptors. Durch Analyse der FACS-Daten kann die Konzentrations-Wirkungsbeziehung dieses *pharmacochaperoning*-Effekts bestimmt werden. In Abbildung 2.3 ist der Effekt des V2R-Antagonisten Tolvaptan auf die Oberflächenexpression des Flag-V2R S318I stabil in HEK293-Zellen nach 18 Stunden Behandlung dargestellt. Die gefittete Kurve wird mit der Formel $[y = y_0 + E_{\max} * x / (EC_{50} + x)]$ beschrieben. E_{\max} entspricht der Maximalmenge oberflächlich exprimierter Rezeptoren und liegt bei $296,6 (\pm 21,09)$. EC_{50} ist die Konzentration Tolvaptan, die notwendig ist, um den halbmaximalen Effekt zu erzielen und beträgt in diesem Fall $0,29 \mu\text{M} \pm 0,068 \mu\text{M}$, y_0 entspricht der basalen Fluoreszenz, wenn der Wert $x = \text{Null}$ ist. Die Parameter wurden durch Anpassung der Datenpunkte an die hyperbolische Funktion $[y = y_0 + E_{\max} * x / (EC_{50} + x)]$ geschätzt; angegeben sind Schätzwerte und deren Varianz.

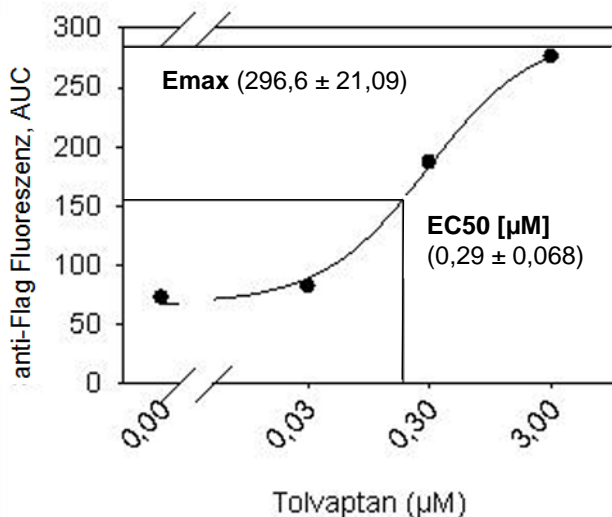


Abb. 2.3, die Konzentrations-Wirkungsbeziehung des Escorteffekts von Tolvaptan auf den stabil exprimierten FLAG-318. Die Werte E_{\max} und EC_{50} sind Schätzwerte, die durch Anpassung einer Kurve an die Datenpunkte ermittelt wurden und der (\pm) -Wert ist ein Maß für die Güte der Anpassung (Varianz).

Immunzytochemie

Um die Lokalisation des retinierten GPCR optisch darzustellen eignet sich Immunzytochemie. Die Expression eines fluoreszierenden Marker-Proteins, wie beispielsweise CFP-ER, wird auf Kollokalisierung mit dem retinierten GPCR untersucht um dessen Position (innerhalb oder außerhalb des ER) zu bestimmen.

Das Nährmedium wurde entfernt und der Napf 2x mit 1 ml PBS [mit 1 mM MgCl₂ und 1 mM CaCl₂] gewaschen. Der Objektträger wurde mit etwa 40 µl Mowiol betröpfelt. Mowiol ist eine Polyvinylalkohollösung, die als Einbettmittel zur Herstellung von Dauerpräparaten dient. Das Glasplättchen mit den Zellen wurde einmal kurz in ddH₂O getaucht um Salze zu entfernen, trocknen gelassen und anschließend, nicht-bewachsene Seite nach außen, auf den Objektträger übertragen. Das Glasplättchen wurde leicht angedrückt und das Präparat trocknen gelassen. Die Mikroskopie wurde mit dem LSM510 (*laser scanning microscope*) und den, in Tabelle 2 gezeigten Einstellungen (Anregungslaser, Spektralfilter) durchgeführt.

Fluorophor	Laser, Anregungswellenlänge	Filter, durchlässige Wellenlänge
CFP	Argon, 458nm	Breitband, 475-525nm
YFP	Argon, 514nm	Linien, 530nm

Tabelle 2, zeigt die zur Immunzytochemie verwendeten Fluorophore bzw. Laser und Spektralfilter.

Bestimmung der cAMP-Bildung

- KREBS-HEPES (KHP) Puffer (HEPES [10 mM], NaCl [120mM], KCl [3mM], CaCl₂ [2mM], MgCl₂+6*H₂O [2mM], pH=7.3)
- KOH (4,1 M)
- Adenin-[2,8-³H]
- Ro-20-1724 (inhibiert die cAMP-spezifische Phosphodiesterase PDE (*cyclic nucleotide phosphodiesterase*), Isoform IV)
- cAMP
- Perchlorsäure (2,5%)
- DOWEX AG 50W-X4
- Aluminiumoxid /Alumina)
- HCl (1 M)
- Imidazolpuffer (20 mM Imidazol, 200 mM NaCl)
- Rotiszint eco plus LSC-Universalcocktail

Messung von radioaktiv-markiertem cAMP

Durch Aktivierung katalysiert Adenylylzyklase (*adenylyl cyclase*, AC) die Entstehung von cAMP aus ATP. Stimuliert wird AC vom G-Protein G_s und der Substanz Forskolin (Sensitisierung der AC). Manche Adenylylzyklaseisoformen (II, IV, VII) werden auch von Ca²⁺/Calmodulin aktiviert. Eine Hemmung erfolgt durch das G-Protein G_i, und isoformspezifisch durch G_{βγ} und Calcium.

Bestimmt wird die Aktivität durch die Messung des gebildeten cAMP. Durch den Einsatz von [³H]-Adenin können ATP und cAMP radioaktiv markiert werden. Um [³H]cAMP von [³H]ATP und anderen radioaktiven Nebenprodukten (Nukleotiden, Nukleosiden, Xanthinen, Hypoxanthinen) zu trennen wird sequentielle Chromatographie angewendet. [57] Der erste Schritt erfolgt über das negativ geladene *DowexAG 50*, welches ATP, auf Grund dessen hoher negativer Ladung, stärker abstößt als cAMP; daher ist auch Wasser zur Elution ausreichend. Im zweiten Schritt wird das Dowex-Eluat auf *Aluminiumoxid* übertragen. Das positiv geladene Aluminium bindet verbliebenes ATP und cAMP wird durch Verdrängung mit Imidazol ausgewaschen.

Stimulation der Zellen

Zellen wurden gleichmäßig in 6-Napf-Platten ausgesät und sollten am Tag des Versuchs nahezu Konfluenz erreicht haben. Es war wichtig die Variation der Zellzahl in den verschiedenen Näpfen gering zu halten, da sich sonst die Streuung des erhaltenen cAMP-Signals stark erhöht. Am Abend vor dem Assay wurden Adenin-[2,8-³H] (1µCi/ml) zu den Zellen gegeben. Nach Vorbehandlung mit einem Antagonisten des V2R wurde vor Beginn des cAMP-Assays Nährmedium gewechselt und für eine Stunde inkubiert. Dieser Schritt wurde durchgeführt damit der Antagonist die Bindungsstellen freigibt. In dieser Zeit wurden der Assaypuffer (KHP mit 50 µM Ro-20-1724) und die Stopplösung (2,5% Perchlorsäure mit 100 µM cAMP) vorbereitet. Der Assay wurde durch Austausch des Nährmediums mit 1 ml Assaypuffer gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde die Stimulierung der Adenylatzyklase gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde der Assaypuffer mit 1 ml Stopplösung getauscht und die 6-Napf Platten für 5 min auf Eis gestellt. Dann wurden 900 µl der lysierten Zellen in Reaktionsgefäße mit 85 µl vorgelegter KOH (4,1 M) übertragen, um die Perchlorsäure zu neutralisieren. Die Aufreinigung des [³H] cAMP mittels Säulenchromatographie erfolgte nach der Methode von [108].

Chromatographie

Herstellen und Regeneration von DOWEX AG 50W-X4 bzw. Aluminiumoxid

Säulchen

Zur Generierung der DOWEX-Säulen wurden Plastikspitzen mit Glaswolle gestopft und das in HCl (1N) und H₂O vorbereitete und äquilibrierte DOWEX AG 50W-X4 Material eingefüllt. Für Alumina-Säulen wurden 0,75g Alumina in Suspension in Plastikspitzen übertragen.

Dowex Säulen wurden mit 3 ml HCl (1 M) und 3 mal 5 ml Reinstwasser und Alumina Säulen mit 4x5 ml Imidazolpuffer (20 mM Imidazol, 200 mM NaCl, pH 8) und 2x5 ml Reinstwasser regeneriert.

Isolierung des cAMP

Die Proben wurden zunächst auf Dowexsäulen übertragen. Die Säulen wurden mit 2x1 ml Reinstwasser gewaschen (Auswaschen des ATP) und anschließend über die Aluminasäulen platziert. Die Eluierung der cAMP-haltigen Nukleotidfraktion von Dowex auf Alumina erfolgte mit 2x2 ml Reinstwasser. Die Aluminasäulen wurden über Scintillationsgefäße platziert. Die

Eluierung erfolgte mit 2x3 ml Imidazolpuffer. Zu jeder Probe wurden 10 ml Lösungsmittel (Rotiszint eco plus LSC-Universalcocktail) gegeben. Der radioaktive Zerfall von Tritium (als [³H] Adenin in cAMP inkorporiert) wurde als cpm (counts per minutes) mit einem Scintillationscounter gemessen.

Verwendung unterschiedlicher Zelltypen

Ich habe beobachtet, dass HEK293-Zellen in Kultur Adenylatzyklase (AC)-Aktivität einstellen können bzw. die Sensitivität gegenüber Forskolin verlieren. Dieser Effekt trat ohne erkennbares Muster (z.B. hohe Passagezahl) auf. Ich habe daher auch Cos-7 und HELA-Zellen zur Analyse der Rezeptorfunktionalität verwendet. HELA-Zellen besitzen offenbar einen endogenen Vasopressinrezeptor, der Adenylatzyklase stimuliert.

Endogener Vasopressinrezeptor in HELA-Zellen

Es stellte sich heraus, dass bereits untransfizierte HELA-Zellen durch AVP (500nM) in Anwesenheit von Forskolin (20 μ M) vermehrt cAMP produzieren (Abbildung 2.4). Es besteht die Möglichkeit, dass HELA-Zellen einen endogenen V2R exprimieren und sich somit nicht zur Untersuchung von heterolog exprimierten V2-Rezeptorkonstrukten eignen.

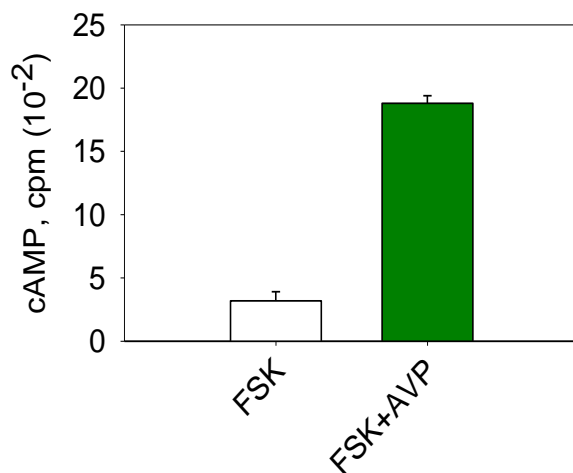


Abb. 2.4, Stimulation von Hela-Zellen mit AVP (500 nM) in Anwesenheit von Forskolin (10 μ M, FSK).

Waschschritt vor der Rezeptorstimulation

Nach Vorbehandlung mit V2R-Antagonisten wurden die Zellen vor Beginn der Rezeptorstimulation für 1 h durch Wechsel des Nährmediums gewaschen. Erstens wird der freie Antagonist durch Absaugen des alten Nährmediums entfernt. Zweitens dissoziiert der gebundene Antagonist mit konstanter Rate vom Rezeptor (beschrieben durch k_{off}). Anschließendes

Entfernen des Mediums sollte daher die Konzentration des Antagonisten weiter mindern; als Resultat sollte eine Fraktion der Rezeptoren frei zur Bindung von und Aktivierung durch Vasopressin sein.

Änderung des pH-Werts in den sauren (pH3) oder basischen (pH9) Bereich schwächt ebenfalls die Ligand-Rezeptor Interaktion. Ich habe daher in einem Versuch die Auswirkung 3-minütiger Waschschrte mit saurem Puffer (100mM Glycinacetat, 0,25M D-Sorbitol, pH 3) oder mit basischem Puffer (150 mM Phosphatpuffer, pH 9) auf Stimulierbarkeit von V2R-Zelllinien nach deren Vorinkubation mit Rezeptorantagonist untersucht. Sorbitol wurde zugesetzt um den Puffer auf ein physiologisches Niveau zu bringen und ein Platzen der Zellen auf Grund des osmotischen Drucks zu vermeiden. Die Vorbehandlung erfolgte mit 1 μ M Tolvaptan für 16h. Bereits kurz nach Zugabe des sauren Puffers waren die Zellen weiß gefärbt und unter dem Mikroskop wurden kleine Blasen in den Zellen sichtbar. Durch die Behandlung mit dem basischen Puffer lösten sich die Zellen ab. Die letztlich gemessene Menge gebildetes cAMP war nur geringfügig höher als der Hintergrundwert von etwa 30–60 cpm, entsprechend dem Messhintergrund des Scintillationszählers.

In einer anderen Studie [101] war die Entfernung des gebundenen V2R-Antagonisten SR121463B durch verschiedene saure Puffer (pH 6,8 und pH 2,5) in isolierten Membranen ebenso wenig erfolgreich. In Anbetracht dieses Befundes und der negativen Effekte des beschriebenen Waschvorganges auf das Überleben der Zellen, habe ich diese Methode nicht weiterverfolgt.

(Ko-)Immunpräzipitation

Mit dieser Methode lassen sich Proteine spezifisch isolieren. Zur Präzipitation des V2-Rezeptors wurden Zellmembranen solubilisiert und zwar unter Bedingungen, die den Rezeptor bzw. Rezeptor-Proteinkomplexe nicht denaturieren. Der verwendete Antikörper war gegen das N-terminale Epitop gerichtet. Der Antikörper-Rezeptor-Komplex kann mit Protein G- oder Protein A-gebundener Matrix (z.B. Agarose oder magnetische Kügelchen) präzipitiert werden. Bestimmte Interaktionen, wie zum Beispiel GPCR mit G-Protein oder Arrestin, sind in Detergenz schwierig zu erhalten. Eine Stabilisierung durch chemisches *cross-linking* vor Lyse der Zellen ist eine Möglichkeit, diese Interaktionen dennoch zu detektieren. Ein weiteres Risiko ist die Bildung unspezifischer Disulfidbrücken und damit die Darstellung von Rezeptor-Interaktionen, die in lebenden Zellen nicht auftreten. Durch die Zugabe von Reduktionsmitteln,

wie zum Beispiel DTT (Dithiothreitol), kann dies vermieden werden. [50]

Ernte der Zellmembranen

Die Zellen wurden in einer 15 cm Schale gezüchtet bis sie Konfluenz erreicht hatten. Das Nährmedium wurde entfernt und die Schale mit kaltem PBS (10 - 12 ml) gewaschen. 5 ml PBS wurden zu der Schale gegeben, die Zellen abgeschabt, resuspendiert und in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen übertragen. Die Zellen wurden bei 300*g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert und in ein Mikrozentrifugenröhrchen übertragen. Die erneut pelletierten Zellen wurden in 1 ml hypotonem HME-Puffer (25 mM HEPES.NaOH, pH 7,4, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, Proteaseinhibitoren (Roche) resuspendiert. Die Proben wurden anschließend mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Proben wurden mit Handwärme aufgetaut, zur Resuspension mit Ultraschallsonde sonifiziert (2x12 Pulsen) und anschließend bei 33000*g für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet enthielt Zellmembranen inklusive Nuclei in 0,3 ml isotonem HME-Puffer (mit 150 mM NaCl) resuspendiert. Der Proteingehalt wurde mit der Bradfordmethode bestimmt. Zur Aufbewahrung wurden die Proben mit flüssigem Stickstoff gefroren und auf -80°C gelagert.

Solubilisation der Membranen mit Chaps oder n-Dodecyl-β-D-maltopyranoside (DDM)

Chaps (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat) ist ein zwitterionisches Lösungsmittel, chemisch verwandt den Gallensäuren und eignet sich für die Solubilisierung von Membranprotein im Zuge einer Immunpräzipitation. Es gilt jedoch als effektiv im Brechen von Protein-Protein Interaktionen, weswegen es für eine Ko-Immunpräzipitation von vornherein ungeeignet erscheint. Die CMC (*critical micelle concentration*), d.h. die zur spontanen Entstehung von Micellen benötigte Minimalkonzentration, liegt bei 10 mM oder 0,49 %w/V in Wasser. Solubilisierung erforderte Chaps im Überschuss. Chaps wurde in einem Verhältnis von 2:1 über die Membranproteinmenge bei einer finalen Konzentration von 10 mM Chaps (in HME-Puffer mit NaCl) eingesetzt. Zunächst wurde die benötigte Menge Chaps mit Solubilisationspuffer gemischt und dann zur Probe gegeben. Es wurde darauf geachtet beim Mischen mit einer Pipette keine Luftblasen zu bilden. Nach sanftem Rühren für 3 h bei 4°C

wurde die solubilisierete Probe mit 33000*g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthielt den löslichen Anteil der Probe, daher auch das aufzureinigende Protein.

DDM ist ein nicht-ionisches Detergenz, das besonders zur Reindarstellung von Membranproteinen für die Kristallisation Verwendung findet. Es ist nicht denaturierend und beeinflusst Protein-Protein Interaktionen weniger. Die CMC (*critical micelle concentration*) liegt bei 0,17 mM oder 0,009% w/V in Wasser. Nach [80] ist eine Solubilisation mit 0,1-0,5% DDM zur Aufreinigung eines GPCR optimal. Die Probe wurde mit DDM in einem Verhältnis 1:2 = Protein:DDM bei einer finalen Konzentration von 0,2% DDM solubilisiert; das weitere Vorgehen entsprach der Solubilisation mit CHAPS (s.o.). Ich habe die Effizienz der Solubilisation durch Proteinbestimmung im Solubilisat auf nahezu vollständig geschätzt.

Immunpräzipitation der solubilisierten Proben

- Probenpuffer (4x, V=50ml)
 - ddH₂O (4,8 ml)
 - 0,5 M TRIS HCL, pH 6,8
 - Glycerin (9,6 ml)
 - 10% SDS (19,2 ml)
 - 0,1% Bromphenolblau (3 ml)
 - β-Mercaptoethanol (4%)

Für die Immunpräzipitation wurden 13,3 µg M2 anti-Flag Antikörper pro 1 ml Probe eingesetzt. Die Probe wurde vorsichtig gemischt, so dass keine Luftblasen entstanden und über Nacht bei 4°C rotiert. Es wurden kleine Aliquote aufgehoben, die Solubilisat und Antikörper enthielten.

Protein G Agarose (PGA) von ThermoScientific wurde äquilibriert. Zur Äquilibrierung wurde die benötigte Menge PGA mit 500 *g für 3 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und mit Solubilisationspuffer versetzt. Dieser Äquilibrierungsschritt wurde einmal wiederholt. Für 200 µg Protein (solubilisierte Menge in einem Volumen von 200 µl) wurden 40 µl äquilibrierter Protein G Agarose (50% w/v) eingesetzt. Nach drei Stunden sanften Bewegens bei Raumtemperatur. wurde die Agarose bei 500 *g gesammelt und mit einer, dem Volumen des Überstandes entsprechenden Menge Solubilisationspuffer (mit 0,1% DDM) resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde 1x wiederholt. Für die Eluierung wurde das Pellet in 25µl Probenpuffer (2x) resuspendiert und für 5 min bei 70°C inkubiert.

Quantitative Bestimmung von Proteinmengen

Bicinchonische Säure (Bicinchonic Acid, BCA) in 96-Napf-Platten

- BCA Protein Assay Kit von Pierce
 - Lösung A: Kupfer-(II)-Sulfat
 - Lösung B: Bicinchonische Säure (BCA)
- *BCA Working Reagent* besteht aus 50x Lösung A und 1x Lösung B

Durch Cystein, Cystin (2 über Schwefel kovalent verbundene Cysteine) und Tyrosin wird Cu(II) zu Cu(I) reduziert (Biuret Test). Cu(I) cheliert mit BCA und es kommt zu einer Farbänderung, die bei 562 nm messbar ist. Diese Methode wird nicht durch Lösungsmittel beeinträchtigt. Der lineare Messbereich liegt bei 20 - 2000 µg/ml.

Für die Standardkurve wurden (0/5/10/15/20µg) BSA (*bovine serum albumine*) in Doppelbestimmung gemessen. Eine Stammlösung von 1 mg/ml BSA (kalibriert anhand des molaren Extinktionskoeffizienten) wurde in einem Volumen von 25 µl ddH₂O pro Napf verdünnt. Von den Proben wurden 7 µl Probe und 18 µl H₂O pro Napf eingesetzt. Zu jeder Reaktion wurden 200 µl *BCA Working Reagent* gegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Mit einem Photometer (Victor 3V, 1420 Multilabel Counter) wurde die Absorption bei 562 nm gemessen.

Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Bradford-Advanced-Reagent (Zugabe der Lösungsmittel Brij 35 bzw. Triton X-100 verhindert Adhäsion des Farbstoffs an den Messküvetten)

- 400mg, SERVA #35050 Coomassie Stain Pulver
- 200ml, Ethanol (96v%)
- 400ml, H₃PO₄ (85w%)
- 1ml, Brij 35 (10w%)
- 50µl, Triton X-100

Durch die Bindung von Proteinen kommt es zu einem Farbumschlag (465 nm zu 595 nm Absorption).

1 ml Reaktionsmischung bestehend aus 200 µl Bradford-Reagenz (5x), 700 µl H₂O und 100 µl HME-Puffer wurde mit 2 µl Probe für 5 min inkubiert. Gemessen wurde die Absorption bei 595 nm mit einem Photometer. Als Standard zur Ermittlung der Proteinkonzentration diente BSA (Eichkurve aus 0/1/2/4/8/16 µg).

Auftrennung von Proteinen und Darstellung mittels Immunoblotting

SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid Gel-Elektrophorese)

Mit dieser Methode können Proteine auf einem Gel anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Dazu werden Proteine zunächst in einem denaturierenden Puffer erhitzt. Der Puffer enthält SDS (anionisches Lösungsmittel), sowie Reduktionsmittel (Mercaptoethanol) und eventuell chaotrope Reagenzien wie Harnstoff. Dabei zerfallen Proteine bzw. Proteinkomplexe in ihre Untereinheiten. Durch Bindung von SDS erhalten die Eiweißkörper negative elektrische Ladung, sodass sie in einem elektrischen Feld unabhängig von ihrem isoelektrischen Punkt zur Anode wandern. SDS-PAGE wird meist in einem zweiteiligen Puffersystem durchgeführt. Der obere Teil des Gels wird als Sammelgel bezeichnet und ist mit Tris-Cl (pH 6,8) gepuffert. Der untere Teil des Gels wird als Trenngel bezeichnet und ist mit Tris-Cl (pH 8,8) gepuffert. Zu Beginn der Elektrophorese bilden Chlorid-Ionen die Laufmittelfront, dahinter folgen die SDS-Polypeptide und schließlich im Laufpuffer enthaltenes Glycin. Dies fördert das "Sammeln" der SDS-Polypeptide und führt schließlich zu schärferen Banden. Bei Übergang in das Trenngel migriert Glycin (pK_a für die Protonenabgabe = 9,6), durch die Erhöhung des pH-Wertes und die damit verbundene Ionisierung des Glycins, direkt hinter den Chlorid-Ionen durch das Gel. Die Migration der SDS-Polypeptide ist von deren Größe und dem N,N'-Methylen-Bis-Acrylamid Gehalt des Polyacrylamidgels abhängig. Bis-Acrylamid quervernetzt das polymerisierte Acrylamid und erzeugt Maschen im Polymer, durch welche die SDS-Polypeptide migrieren. Zu beachten ist, dass posttranslationelle Modifikationen (zum Beispiel N- und O-Glykosylierung) die Migrationsgeschwindigkeit von Proteinen beeinflussen. [65]

Trenn- und Sammelgelmix wurden vorbereitet, wobei APS [10%] erst kurz vor Gießen des Gels hinzugegeben wurde. Zuerst wurde das Trenngel in die Gelkammer gegossen und mit einer

dünnen Schicht Isopropanol bedeckt um eine gerade Ebene zu schaffen und Luftblasen zu entfernen. Nach Auspolymerisieren wurde die Isopropanolschicht entfernt und der Sammelgelmix in die Gelkammer gegossen. Ein Kamm wurde als Platzhalter für die Ladetaschen eingesetzt.

Immunoblot (Westernblot)

- Ponceau S Lösung (0,1% Ponceau S (w/V) in 5% Essigsäure (v/V))
- Transferpuffer (Tris [25mM], Glycin [192mM])
- Blockierpuffer (TBS [*Tris buffered saline*] T [0,5% Tween, 5% BSA])
- Waschpuffer (TBS [*Tris buffered saline*] T [0,5% Tween])
- Antikörperlösung (Antikörper in TBS [*Tris buffered saline*] T [0,5% Tween, 1% BSA])

Proteine, die mit SDS-PAGE aufgetrennt wurden, werden beim Westernblotting auf eine Membran (Nitrocellulose oder PVDF (Polyvinylidenfluorid) Filter) im elektrischen Feld übertragen. Eiweiß haftet auf Nitrozellulose bzw. auf fluoridiertem Kunststoff. Als Voraussetzung muss davor das SDS entfernt werden. Die Membran wird anschließend mit Ponceau S gefärbt. Ponceau S ist ein roter Farbstoff, der an positiv geladene Aminosäuren bindet. Die Färbung kann durch Wasser wieder entfernt werden. Mit Antikörpern (primär Antikörper) werden die Zielproteine markiert. Vor Zugabe des primären Antikörpers muss die Membran jedoch mit beispielsweise BSA (*bovine serum albumine*) blockiert werden, andernfalls wird der eingesetzte Antikörper direkt von der Membran adsorbiert. Unspezifische Adsorption erhöht den Hintergrund bei der Entwicklung. Der primäre Antikörper wird mit dem sekundären Antikörper detektiert. Dieser ist beispielsweise mit einem Enzym wie HRP (*horseradish peroxidase*) gekoppelt. HRP oxidiert Luminol zu 3-Aminophthalat. 3-Aminophthalat erzeugt in weiterer Folge ein Chemilumineszenzsignal, das stark genug ist, um einen Röntgenfilm zu belichten. [65] Luminolprodukte, die ich verwendete waren "SuperSignal West Pico" von ThermoScientific oder "Amersham ECL Prime Western Blotting detection reagent" von GE Healthcare Life Sciences. Der Unterschied zwischen den Formulierungen liegt in der beobachteten Sensitivität.

Ergebnisse

Lokalisation von V2 Rezeptor Mutanten

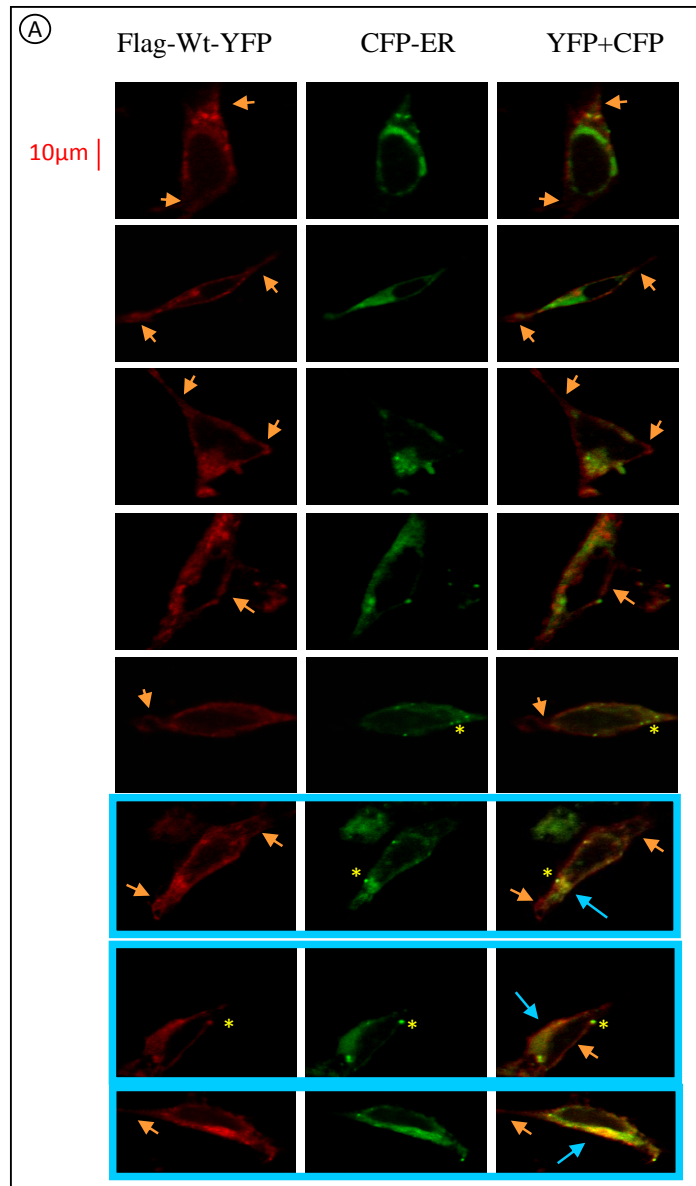
In der Arbeit von Susanne Vogelbein [5] wurde mithilfe eines automatisierten Mikroskops die Überlappung von Trypanblau-gefärbten Plasmamembranen und V2R-GFP Konstrukten in einer Zellpopulation analysiert. Diese Methode eignet sich zur Quantifizierung der Oberflächenexpression; eine Reihe der getesteten Vasopressinrezeptorkonstrukte erreichte die Oberfläche nicht. Ich habe zwei Konstrukte untersucht, die die Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen als hochgradig intrazellulär retiniert einstufte [5]. Die mikroskopische Klassifizierung machte hingegen keine Aussage über den Ort der Retention innerhalb der Zelle. Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation verwendete ich einen Marker für das endoplasmatische Retikulum (CFP-ER). Für die gemeinsame Darstellung verwendete ich Rezeptorkonstrukte, die anstelle des GFP mit gelb fluoreszierendem YFP markiert waren. HEK293-Zellen wurden mit wildtypischem bzw. mutantern V2R (FLAG-273-YFP bzw. FLAG-318-YFP) und CFP-ER kotransfiziert. Das Verhältnis der DNA-Mengen FLAG-V2R-YFP zu pcCFP-ER zu pcDNA3 (Leervektor) für die Transfektion mit der JetPrime-Methode betrug 1:3:6. An fixierten Zellen wurden YFP- und CFP-Signale nach Anregung mit einem Laser (Quelle: Argon) bei unterschiedlichen Wellenlängen (Ex 458nm / Em 475-525nm bzw. Ex 514nm / Em 530nm) aufgenommen. Für die orientierende Lokalisation der Rezeptoren wurde eine optische Schichtdicke gewählt, die die Zelle in ihrer gesamten vertikalen Ausdehnung erfasste. Abbildung 3.1 zeigt einige exemplarische mikroskopische Bilder; neben einander gestellt sind Aufnahmen des YFP-Rezeptorsignals (rot, linke Spalte), des CFP-ER-Markersignals (grün, mittlere Spalte) und der übereinander projizierten Signale (rechte Spalte). Anhand der Rotgrünfärbung in der Mehrfarbenprojektion lässt sich beim Wildtyprezeptor erkennen, dass Rezeptor- und ER-Markersignal voneinander getrennt sind. Das Rezeptorsignal färbte charakteristisch Zellfortsätze rot an, in denen der ER-Marker nicht retiniert wurde. Diese und andere mit Pfeilköpfchen markierte Strukturen stellten sehr wahrscheinlich Plasmamembranen dar. Darüber hinaus zeigten einige Zellen gelb gefärbte Areale in der Doppelprojektion (letzte drei Zeilen der Abbildung 3.1A; gelbe Areale mit blauen Pfeilen markiert). Die Kolo-kalisation mit dem ER war ein eher seltenes Ereignis und erfasste nur eine geringe Fraktion der Rezeptoren. Das ER, auch in der Doppelprojektion hauptsächlich in grün zusehen, begrenzte die Kernregion, dehnte sich haubenförmig aus, wobei die Ausdehnung ein Gutteil des Somas zu

erfassen schien. Die asymmetrische Form war vermutlich auf die optische Schnittebene, weil nicht waagrecht zur Zellebene, zurückzuführen.

Das Bild der beiden Rezeptormutanten (Abbildung 3.1B und 1C, T273R bzw. S318I) unterschied sich deutlich vom Wildtyp. Sowohl in der Einzelfarbdarstellung (linke und mittlere Spalte) als auch in der Doppelprojektion dominierte der Eindruck, dass ER-Marker und Rezeptorsignale dieselben Zellstrukturen darstellten; nach Überlagerung der Farbdarstellungen war viel Gelb zu sehen. Nuancierungen zwischen orange und gelbgrün waren auf die individuellen Expressionsprofile von Rezeptor und ER-Marker zurückzuführen. Eine eindeutige Markierung von Zelloberfläche bzw. Zellfortsätzen fand sich nur ausnahmsweise (Doppelpfeil). Diese Ausnahmen bestätigten die Befunde der Dissertation von Susanne Vogelbein, dass nämlich die V2R-Mutanten T273R und S318I hauptsächlich im ER lokalisiert waren, der Wildtyprezeptor hingegen an Plasmamembranen.

Ebenso wie die Befunde aus der Dissertation analysierte ich meine Zellen nach heterologer Expression. Obwohl ich meine Expressionsvektoren mit Leerplasmid bei der Transfektion verdünnt hatte, war es anhand der gezeigten Beispiele offensichtlich, dass sowohl Rezeptor als auch ER-Marker zu hohem Niveau von HEK293-Zellen exprimiert worden waren. Als möglicher Ausdruck der Überexpression waren in einigen Zellen fluoreszierende punktförmige Partikel erkennbar. Diese Punkte fluoreszierten gelb, oft auch deutlich grün im CFP-Bild und maßen typischerweise weniger als ein Mikrometer.

Es handelte sich wahrscheinlich um OSER(*organized smooth ER*)-Körperchen [109], die sich durch niedrig-affine Interaktionen zwischen den zytoplasmatischen Domänen ER-membranständiger Proteine bilden. Ihre Entstehung wird durch Überexpression von Transmembranproteinen (speziell GFP-Chimären) begünstigt, in meinem Fall also durch den YFP-markierten Rezeptor und den CFP-ER-Marker. OSER-Körperchen waren bei Koexpression mit dem Wildtyprezeptor grün und grün waren sie auch in etwa 50% der Fälle nach Koexpression mit den ER-retinierten Rezeptormutanten. Da hingegen kaum isoliert rote OSER-Körperchen zu finden waren, nehme ich an, dass CFP-ER für deren Entstehung verantwortlich war. Eine aktuellere Studie [110] argumentiert zwar gegen nieder-affine Wechselwirkung von Proteinen als Ursache, stützt jedoch die Überlegung, dass überexprimierte bzw. vermehrt angehäufte, faltungsbedürftige Proteine im ER die OSER-Formation begünstigen. Demnach könnte die Detektion von OSER-Körperchen ein Zeichen für ER-Stress sein.



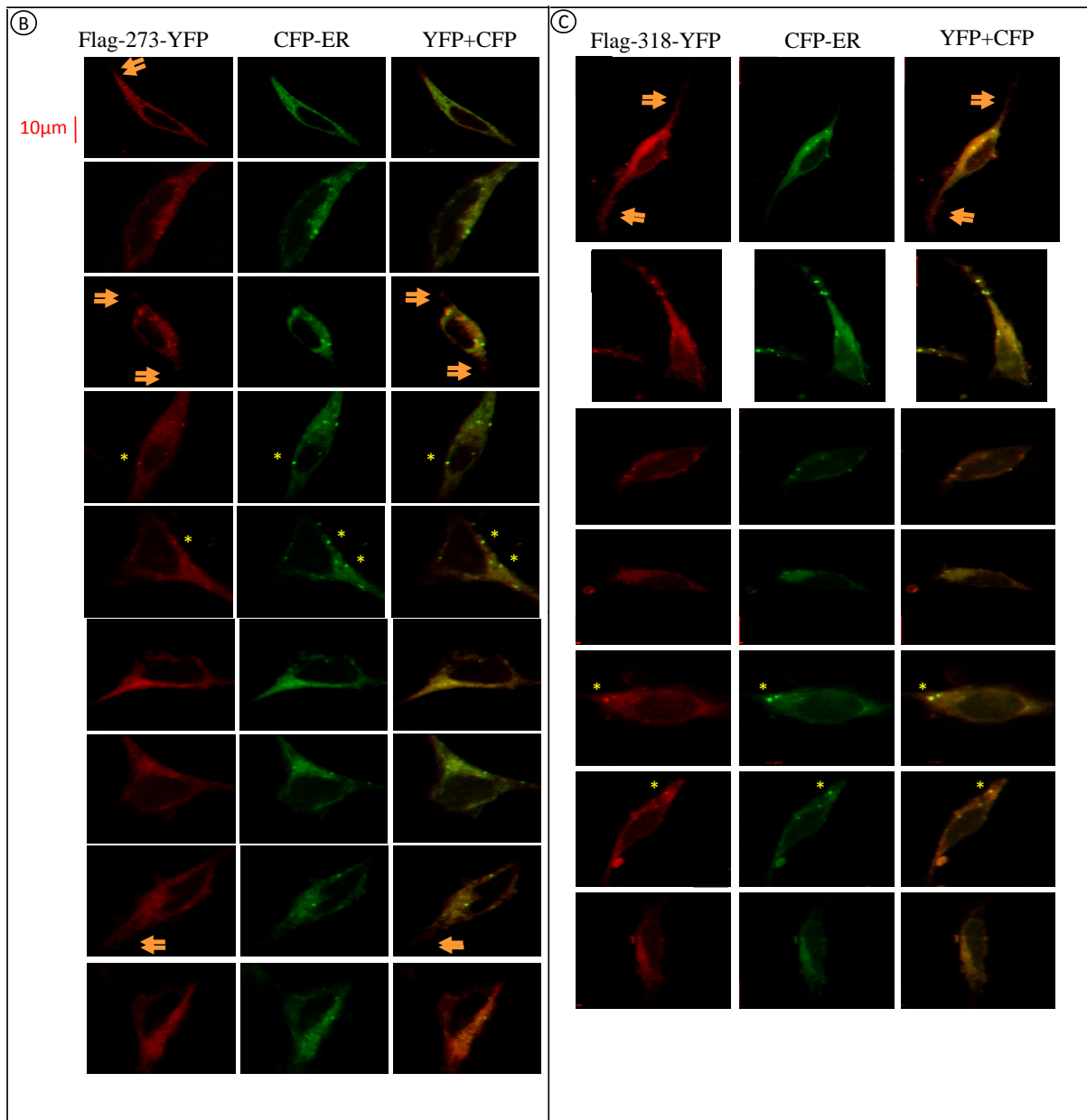


Abb.3.1, Lokalisation von V2 Rezeptor Mutanten, Alle Aufnahmen transient mit FLAG-V2R-YFP (in rot, erste Spalte) und CFP-ER (ER-Marker, in grün, zweite Spalte) transfizierten, fixierter HEK293-Zellen mit 64x-Ölimmersionsobjektiv. Unterschiedlich, weil an Zellkontur angepasst war die elektronische (nicht optische) Bildvergrößerung, wobei die Maßangabe (10 µm) als Richtmaß für alle Aufnahmen gilt. In der 3. Spalte wird die Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale gezeigt. Exemplarisch wurden einige OSER-Körperchen mit Sternchen hervorgehoben. **A)**, zeigt Lokalisation des wildtypischen Rezeptors. Mit orangen Pfeilköpfchen sind charakteristische Zellfortsätze bzw. Bereiche, die wahrscheinlich der Plasmamembran entsprechen markiert. In den letzten 3 Zeilen sind Zellen mit einer Überlagerung (gelbe Areale) des YFP und CFP-Signals (blaue Pfeile) gezeigt. **B)** und **C)**, Lokalisation der intrazellulär retinierten Mutanten (273 bzw. 318) des V2R. Die orangen Doppelpfeile zeigen auf Gebiete in denen das YFP-Signal nicht mit dem CFP-Signal überlappt.

Escort des V2 Rezeptors zur Plasmamembran durch Antagonisten

Aus den von Susanne Vogelbein [5] generierten, intrazellulär retinierten V2R Mutanten wurden sieben ausgewählt, die i) einen Lesefehler je in einer der sieben Transmembranhelices trugen und ii) sich durch besonders geringe Oberflächenexpression im Vergleich zum Wildtyprezeptor auszeichneten. Es handelte sich dabei um die Rezeptormutanten F48R, L62P, Q92P, T134A, A163E, P217R, T273R und S318I. Um die Frage zu klären welche dieser Mutanten durch die Behandlung mit einem V2R-Antagonisten an die Plasmamembran escortiert werden, habe ich die Oberflächenexpression N-Terminal mit FLAG fusionierter Rezeptorkonstrukte mit FACS untersucht. HEK293-Zellen, welche die FLAG-V2R Konstrukte exprimierten, wurden für 18 Stunden mit 3 μ M SR121463 bzw. Tolvaptan behandelt. Als Kontrolle wurden Zellen nur mit dem entsprechenden Vehikel (0,03% DMSO) inkubiert. Die hohe Konzentration wurde gewählt, da die Affinität unreifer Rezeptorspezies für Liganden gering ist. Ein messbarer SR121463-Effekt war spätestens nach 10 Stunden zu erwarten (Halbmaximaler Effekt nach 4.95 ± 0.11 h, [101]). Zur Analyse der Oberflächenexpression wurden die Zellen mit EDTA (0,02%) abgelöst und in der Kälte mit M2-FLAG Antikörper und dieser wiederum mit dem Antikörper PerCP Cy5.5 markiert. PerCP Cy5.5 wurde durch den Argonlaser (488 nm Wellenlänge) angeregt und die Fluoreszenz mit einer Wellenlänge von 667 nm detektiert. (Abbildung 3.2A) Im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen, das bedeutet unbehandelten Zellen, war der Escorteffekt bei den Mutanten T273R und S318I am deutlichsten. Deren Oberflächenexpression wurde durch SR121463 bzw. Tolvaptan etwa um den Faktor 7 bzw. 5 erhöht. Es wurde jedoch kein zusätzlicher, wildtypischer FLAG-V2R an die Plasmamembran rekrutiert.

Abbildung 3.2B dokumentiert die Auswertung des FACS Experiments zur Bestimmung der Oberflächenexpression des V2R. Im Histogramm sieht man die Verteilung der Fluoreszenzmesspunkte über der Zellpopulation. Vor der Behandlung mit dem Pharmakochaperon gemessene Fluoreszenz entspricht großteils der Autofluoreszenz der verwendeten HEK293-Zellen. Nicht gezeigt ist das Ergebnis mit untransfizierten Zellen, die großteils mit den hier gezeigten unbehandelten überlappen; die eingeblendete Vertikale stellt die Obergrenze der Autofluoreszenz untransfizierter Zellen dar. Anhand des Histogramms wird deutlich, dass sowohl der Prozentsatz an Zellen, die den Rezeptor an der Oberfläche exponieren, als auch die Dichte an Oberflächenrezeptoren in der individuellen Zelle zunahm. Als Maß für die

durchschnittliche Rezeptordichte habe ich in dieser Arbeit die Fläche unter der Glockenkurve eingesetzt, die die spezifische Antikörperbindung wiedergibt.

Dieser Assay ist als Screening Pharmakochaperon-sensitiver Mutanten zu verstehen, macht jedoch keine Aussage über die effektive Konzentration der Pharmakochaperone. Zudem wurde durch Tolvaptan auch die Oberflächenexpression der Mutanten Q92P und A163E verdreifacht (Abbildung 3.2A). Jedoch habe ich keine der Mutanten außer T273R und S318I, weiteruntersucht. Mehrfach bestätigt wurde das Ergebnis am Wildtyprezeptor, der bestenfalls mäßig empfindlich für den Escorteffekt war.

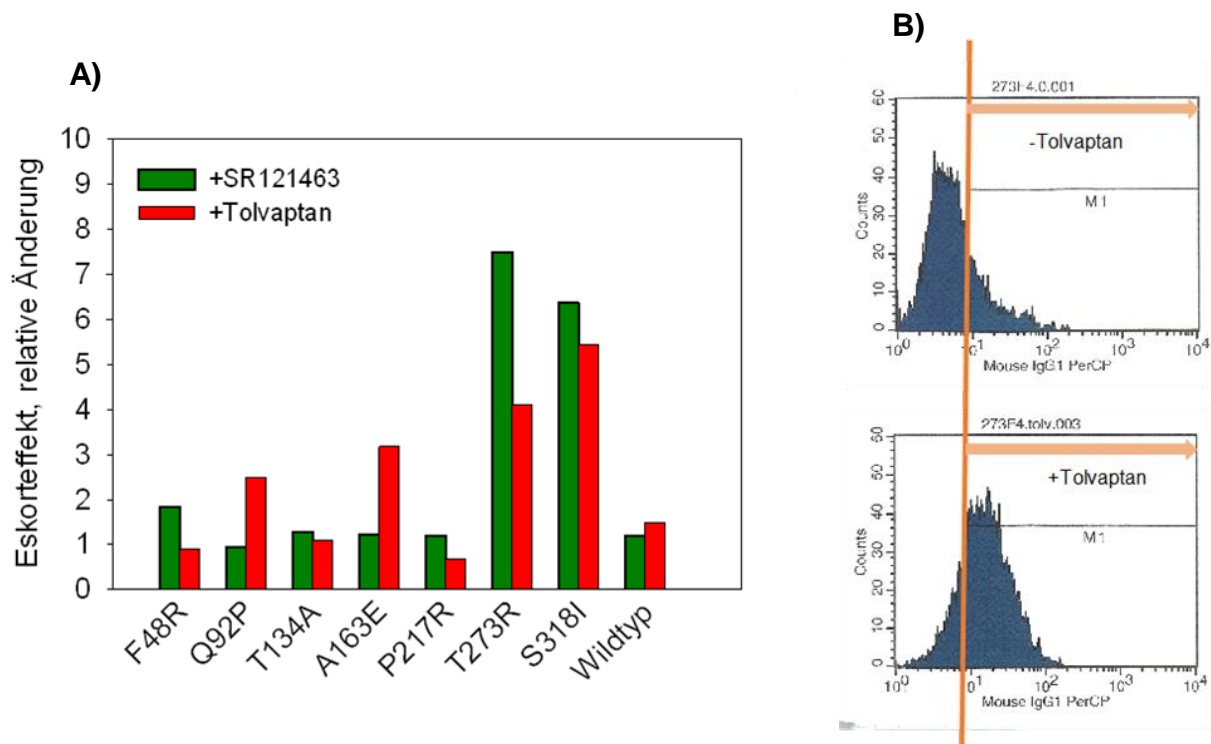


Abb.3.2, Escort unterschiedlicher V2R Mutanten durch Antagonisten. Antikörperfärbung (des FLAG-Epitops) von Wildtyp V2R und den Mutanten T273R und S318I in Zelllinien. Die übrigen Mutanten (F48R, Q92P, T134A, A163E, P217R) wurden transient in HEK293-Zellen exprimiert. **A)**, Auf der y-Achse ist die relative Änderung der Oberflächenexpression durch die Behandlung mit SR121463 (18h, 3 μ M; in grün) bzw. Tolvaptan (18h, 3 μ M; in rot) aufgetragen. Die Rezeptordichte wurde durch FACS Fluoreszenzmessung des PerCP Cy5.5 markierten Sekundärantikörpers bestimmt. ermittelt. **B)**, Histogramm der unbehandelten bzw. mit Tolvaptan behandelten Zelllinie (FLAG-273). Der orange Balken verdeutlicht die Obergrenze der Fluoreszenz untransfizierter HEK293-Zellen (nicht gezeigt). Die Stärke des PerCP Cy5.5 Signals ist auf der x-Achse (logarithmische Skalierung) aufgetragen.

Escorteffekt von SR121463 und Tolvaptan am wildtypischen -V2R und an den Mutanten 273 und 318

In einem weiteren FACS-Experiment habe ich die effektive Konzentration von SR121463 ermittelt. HEK293-Zelllinien (FLAG-V2R: Wt, 273, 318) wurden mit verschiedenen Konzentrationen SR121463 für 18 Stunden behandelt und die Oberflächenexpression nach Rezeptormarkierung mit Antikörper mit FACS bestimmt.

Die Abbildung 3.3 zeigt die eingesetzte Konzentration SR auf der x-Achse und die gemessene anti-FLAG Fluoreszenz (y-Achse), ausgedrückt als „Fläche unter der Kurve“ AUC (siehe Methodenteil). Ein niedriger AUC-Wert entsteht in erster Linie, wenn der Anteil der Zellen an der Gesamtpopulation, die den Rezeptor exprimieren, sowie dessen Oberflächendichte in jenen Zellen, gering ist. Die AUC-Werte sind daher zwischen unterschiedlichen Zelllinien bzw. transient transfizierten Zellen nicht unmittelbar vergleichbar. Die Messbarkeit des Escorteffekts von Pharmakochaperonliganden leidet, wenn der relative Unterschied, d.h. die Steigerung der anti-FLAG Fluoreszenz im Vergleich zu unbehandelten Zellen, gering ist. Dies ist besonders bei Zelllinien oder transient transfizierten Zellen, die bereits ohne Behandlung eine hohe Rezeptordichte an der Plasmamembran aufweisen, problematisch.

In Abbildung 3.3A ist die Wirkung von SR121463 Inkubation auf Wildtyprezeptor bzw. die 318-Mutante gezeigt. Die Oberflächenexpression des Wildtyprezeptors (geschlossene Symbole, Abb.3.3A) bzw. der 318-Mutante (offene Symbole, Abb.3.3A) wurde um den Faktor 2,4 bzw. 15 erhöht, EC_{50} von SR war $1,2\mu\text{M}$ bzw. $1,1\mu\text{M}$. Abbildung 3.3B zeigt, dass die Oberflächenexpression der 273-Mutante durch SR121463 um den Faktor 14 mit einer EC_{50} von $4,3\mu\text{M}$ erhöht wurde. In Abbildung 3.3C sieht man, dass die Inkubation von Wildtyp bzw. 318-Zelllinien für 18 Stunden mit Tolvaptan die Oberflächenexpression des Rezeptors um den Faktor 1,5 bzw. 4,4 mit einer EC_{50} von $0,035\mu\text{M}$ bzw. $0,29\mu\text{M}$ steigert.

Die Escorteffizienz von Tolvaptan wurde lediglich in einem Versuch bestimmt. Die unterschiedlichen EC_{50} -Werte von Tolvaptan und SR121463 können daher das Produkt einer Messungenauigkeit sein. Im Gegensatz zu meinem Escortbefund besitzen die beiden Liganden

die gleiche Affinität als Antagonisten für den reifen Wildtyprezeptor (siehe Einleitung, Tabelle 1.1).

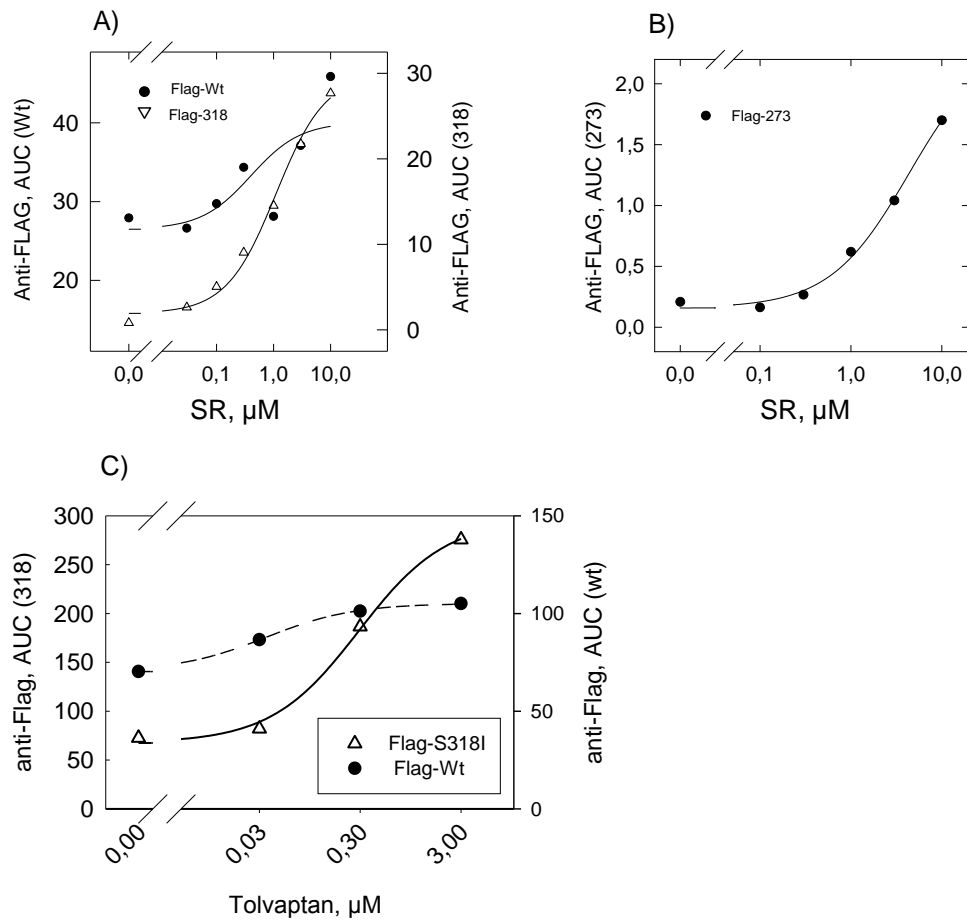


Abb.3.3, Bestimmung des Escorteffekts der V2R Antagonisten SR121463 und Tolvaptan. Ermittlung der Rezeptordichte an der Plasmamembran mittels Antikörperfärbung und FACS. Die Dauer der Vorbehandlung mit dem jeweiligen Antagonisten betrug 18 Stunden. Verwendet wurden Zelllinien (FLAG-Wt, FLAG-273, FLAG-318). **A)**, Escort von FLAG-Wt (geschlossene Symbole, linke y-Achse) und FLAG-318 (offene Symbole, rechte y-Achse) mit SR121463. **B)**, Escort von FLAG-273 mit SR121463. **C)**, Escort von FLAG-318 (Offene Symbole, linke y-Achse) und FLAG-Wt (geschlossene Symbole, rechte y-Achse) mit Tolvaptan. Die dargestellten Kurven stellen das Ergebnis der Anpassung an der Messwerte an eine hyperbolische Kurvenfunktion mit der Steigung eins dar.

Effekt des HSP90-Inhibitors 17-DMAG

Eine Alternative zu Pharmakochaperonliganden ist Geldanamycin, dessen Angriffspunkt die Nukleotidbindendedomäne von HSP90 ist. Geldanamycin steigerte die Oberflächenexpression des A2A-Rezeptors und des CFTR [79]. Daher testete ich ob Geldanamycin, genauer sein Analog 17-DMAG, auch die Oberflächenexpression des V2R steigert. Dazu untersuchte ich die Oberflächenexpression der Mutanten FLAG-318 bzw. FLAG-273 nach 18 Stunden Behandlung mit 17-DMAG (Abb.3.4.1). Zur Prüfung der Spezifität wurde 17-DMAG in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt und zwar an zwei Zellenäpfchen pro Konzentration. Die rezeptorspezifische Antikörperfluoreszenz (AUC) wurde in Abbildung 3.4.1 gegen die entsprechende 17-DMAG-Konzentration auf der x-Achse aufgetragen. Durch Anpassung der Datenpunkte an einer rektangulären Hyperbole ergab sich die gezeigte Kurve. Die Fluoreszenz nahm um den Faktor 2,6 (FLAG-318, $EC_{50} = 0,7\mu M$) bzw. 1,45 (FLAG-273, $EC_{50} = 0,27\mu M$) zu, gezeigt in Abbildung 3.4.1A bzw. B. Die Oberflächendichte des Wildtyprezeptors (Abbildung 3.4.1C) nahm um den Faktor 3 mit einem EC_{50} von $0,06\mu M$ zu.

Die nächste Frage war, ob der Escorteffekt der Pharmakochaperone durch die Anwesenheit von 17-DMAG gesteigert werden kann. Dafür wurden erneut HEK293-Zelllinien FLAG-Wt, FLAG-318 und FLAG-273 nach 18h Vorbehandlung mit bzw. ohne 17-DMAG ($0,5\mu M$) und unterschiedlichen Konzentrationen SR121463 mit FACS analysiert. Abbildung 3.4.2 demonstriert, dass der Effekt von 17-DMAG sich zu dem Pharmakochaperoneffekt addiert. In Abbildung 3.4.2A ist die Wirkung von 17-DMAG und SR121463 auf die Mutante V2R318 gezeigt. Ohne 17-DMAG erhöhte sich die Oberflächendichte des Rezeptors um den Faktor 9 (SR, $EC_{50}=0,08\mu M$); mit 17-DMAG um den Faktor 4 (SR, $EC_{50}=0,2\mu M$). Abbildung 3.4.2B zeigt den 273-Rezeptor. Die Behandlung mit SR alleine erhöhte dessen Oberflächenexpression um den Faktor 4 ($EC_{50}=0,5\mu M$); in Anwesenheit von 17-DMAG um den Faktor 9 ($EC_{50}=1\mu M$). Die Behandlung des Wildtyprezeptors (Abbildung 3.4.2C) mit SR und 17-DMAG erhöhte dessen Oberflächendichte um den Faktor 1,4 ($EC_{50}=0,4\mu M$); dieser Effekt unterschied sich nicht von der Behandlung mit SR alleine.

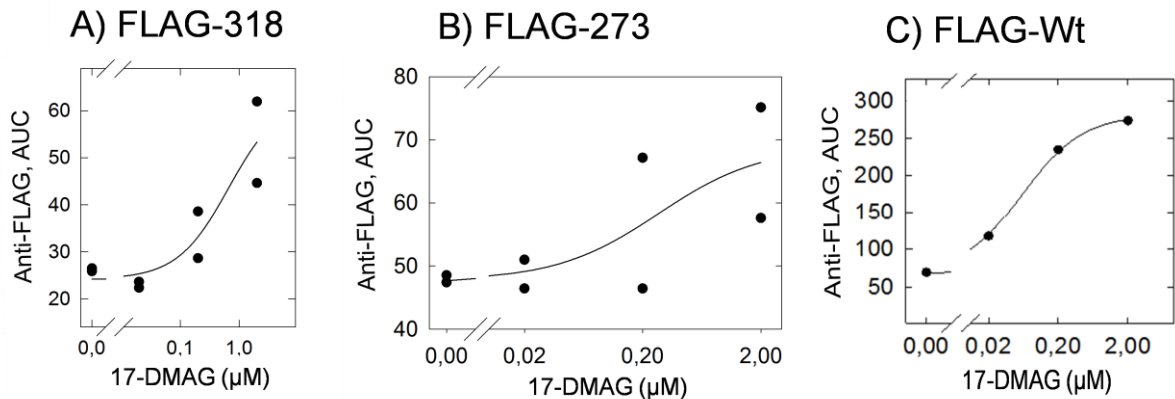


Abb.3.4.1, Bestimmung des Effekts von 17-DMAG auf die Oberflächenexpression von V2R-Konstrukten. Ermittlung der Rezeptordichte an der Plasmamembran mittels Antikörperfärbung mit FACS (siehe Abb. 3.4.). Untersucht wurden HEK293-Zelllinien (**A**) FLAG-318, **B**) FLAG-273, **C**) Flag-Wt), die mit verschiedenen Konzentrationen 17-DMAG 18 Stunden vorbehandelt worden waren. 318 und 273 wurden in Doppelbestimmung untersucht, die Einzelwerte sind aufgetragen.

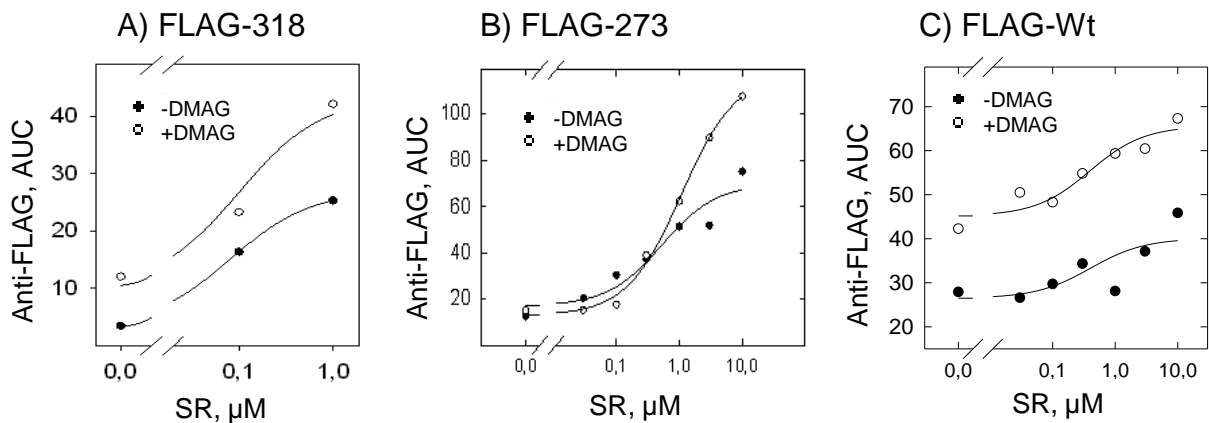


Abb.3.4.2, Steigert 17-DMAG den Escorteffect von SR121463? Untersucht wurde die Oberflächenexpression des V2R in stabilen V2R-HEK293-Zelllinien (**A**) FLAG-318, **B**) FLAG-273, **C**) Flag-Wt) mit FACS (siehe Abb. 3.4.). Die Zellen wurden für 18 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen SR121463 mit oder ohne 17-DMAG (0/0,5µM) vorbehandelt.

Kann die Signalgebung einer retinierten V2R Mutante durch Pharmakochaperone wiederhergestellt werden?

Die Signalgebung des Rezeptors untersuchte ich durch Quantifizierung des second-messengers cAMP. Ein wildtypischer V2R hat hohe Affinität für AVP und wird bereits in subnanomolaren Konzentrationen durch AVP stimuliert. Die verwendeten Pharmakochaperone sind hochaffine Antagonisten des V2R und müssen daher vor dem Assay ausgewaschen werden. SR121463 und Tolvaptan wirken zu AVP kompetitiv; ihre Bindungsstelle am V2R überlappt mit jener des AVP. Daher war zu erwarten, dass durch Waschen nicht entferntes Tolvaptan durch hohe Konzentrationen des Agonisten verdrängt werden würde.

Abbildung 3.5.1A zeigt die cAMP-Bildung an einer V2R273-GFP (C-terminales GFP-Fusionsprotein) exprimierenden HEK293-Zelllinie. Die Zellen waren über Nacht (18h) mit 3 μ M Tolvaptan inkubiert worden. Nach dem Waschschrift (Inkubation mit frischem Medium für eine Stunde bei 37°C) erfolgte Zugabe von AVP und Messung des cAMP. Offene Symbole zeigen mit Tolvaptan vorbehandelte Zellen und geschlossene Symbole unbehandelte Kontrollen. Jeder gezeigte Messpunkt ist der Mittelwert aus drei Bestimmungen an drei unabhängigen Zellnöpfchen. Abbildung 3.5.1A zeigt, dass V2R273-GFP ohne Vorbehandlung mit dem Pharmakochaperon eine geringe Zunahme der cAMP-Bildung vermittelte (1,87-fache Erhöhung, EC₅₀ = 15,6nM). Nach Inkubation mit Tolvaptan kam es zu einer mehr als 5-fachen Zunahme von cAMP. Abbildung 3.5.1A zeigt dass zur Aktivierung des Rezeptors eine Konzentration von mindestens 0,3 - 1 μ M AVP notwendig war.

Abbildung 3.5.1B dokumentiert ein analoges Experiment durchgeführt an HEK293-Zellen, die stabil den Wildtyprezeptor exprimierten. Ähnlich wie beim mutanten Rezeptor folgte der Vorinkubation mit Antagonist ein Rechtsverschiebung der AVP-Konzentrationswirkungskurve. Die halbmaximal wirksame AVP-Konzentration erhöhte sich von ~0,2 nM auf ~2 nM um eine Größenordnung, das Wirkungsmaximum war mit und ohne Vorbehandlung eine sechsfache Zunahme der cAMP-Spiegel über den jeweiligen Ausgangswert. Dies zeigt, dass die intrinsische Aktivität am Wildtyprezeptor durch Pharmakochaperoning nicht weiter gesteigert wurde. Zweitens bestätigen die Daten, dass Tolvaptan als kompetitiver Antagonist wirkte. Wenn die Mutante V2R273-GFP spontan, das heißt ohne Pharmakochaperon, an die Oberfläche gelangt war, benötigte sie eine 100-fach höhere Konzentration AVP um aktiviert zu werden (siehe

Abbildung 3.5.1A, geschlossene Symbole).

Nicht gezeigt ist, dass eine Signalgebung der 273-Rezeptormutante als FLAG-V2R 273-Konstrukt, das heißt ohne c-terminale GFP-Fusion, nicht nachzuweisen war. Der Rezeptor war inaktiv und führte nicht zu einer cAMP-Erhöhung, weder vor oder nach Behandlung mit Tolvaptan bzw. SR121463. Das FLAG273-Konstrukt wurde in stabilen HEK293-Zelllinien sowie nach transienter Transfektion von Cos-7 Zellen untersucht und die Rezeptorexpression sowie deren Zunahme durch den Pharmakochaperoneffekt mittels FACS bestätigt.

Im Gegensatz zur inaktiven Rezeptormutante gab es im Fall des Wildtyprezeptors keinen deutlichen Unterschied in der intrinsischen V2R-Aktivität, wenn V2R als FLAG-V2R oder V2R-GFP Konstrukt zur Expression gebracht wurde. Abbildung 3.5.2 zeigt die Zunahme von cAMP in HEK293-Zelllinien, die Wildtyprezeptor als GFP-Fusionsprotein oder als FLAG-Fusionsprotein exprimierten. Die Zellen wurden mit drei Konzentrationen AVP stimuliert (jeder Messwert ist das Mittel aus drei unabhängigen Bestimmungen). Die Stimulation von jedem der beiden Rezeptorkonstrukte führte zu einer 4 bis 7-fachen Zunahme von cAMP.

Die intrinsische Aktivität, die man am Wildtyp beobachten konnte hing demnach nicht von einer c-terminalen GFP-Fusion ab, während die Rezeptormutante nur in der GFP-fusionierten Form zu einer messbaren Bildung von cAMP Anlass gab. Auf Grund dieses Befundes stellte sich die Frage ob die c-terminale Fusion mit GFP bereits eine positive Wirkung auf die Stabilität der Rezeptormutante hat.

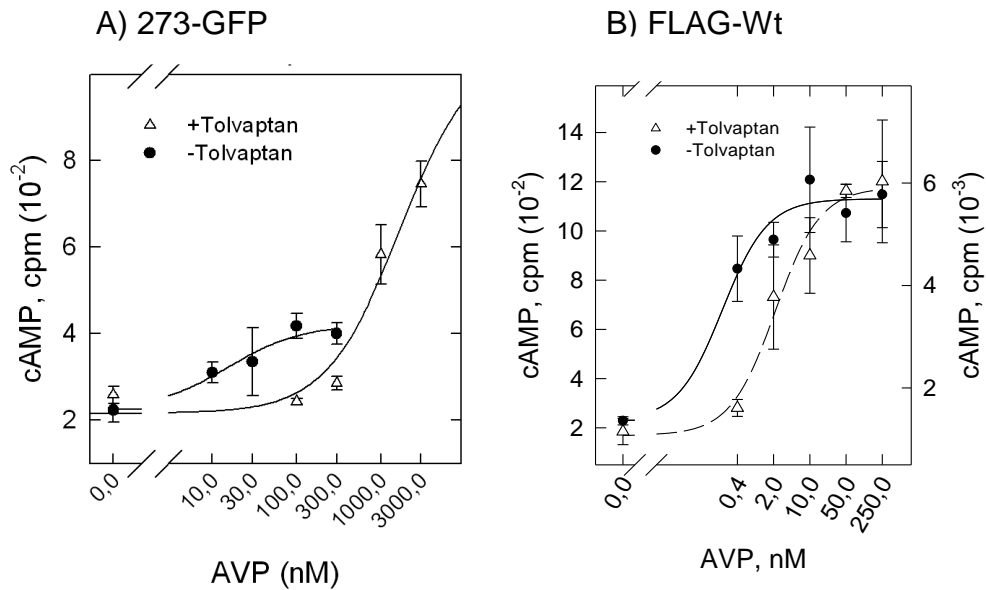


Abb.3.5.1, Stimulation des V2R mit AVP, Effekt der Vorbehandlung mit einem Pharmakochaperon. In HEK293-Zelllinien die V2R-Konstrukte (A) 273-GFP; B) FLAG-Wt) exprimieren wurde nach Behandlung mit Tolvaptan (unbehandelt ... geschlossene Symbole; 3 μ M ... offene Symbole) die Bildung von [3 H]-cAMP durch Stimulation des V2R bei verschiedenen Konzentrationen AVP gemessen. Der Assay wurde an drei parallel geführten Zellschalen pro Konzentration AVP durchgeführt, gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Zur Sensibilisierung des Rezeptoreffekts wurde der cAMP-Assay in Anwesenheit von 10 μ M Forskolin (allosterischer Aktivator der Adenylatzyklase) durchgeführt.

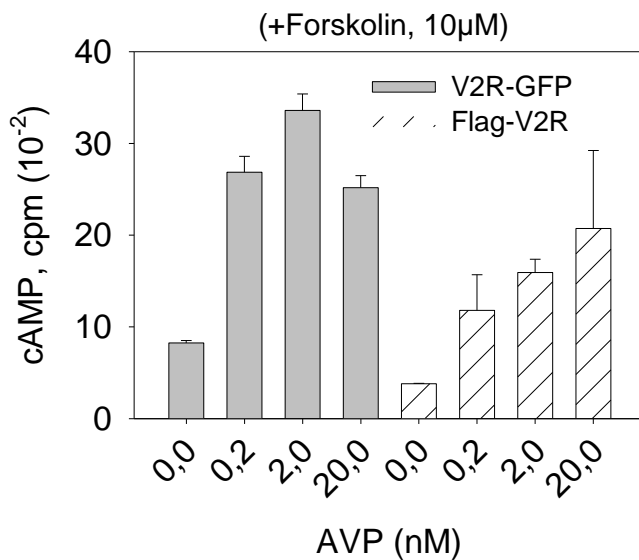


Abb.3.5.2, Stimulation des wildtypischen V2R-GFP und FLAG-V2R mit AVP. In HEK293-Zelllinien, die V2R-Konstrukte (Wt-GFP, FLAG-Wt) exprimieren, wurde die Bildung von [3 H]-cAMP durch Stimulation des V2R mit verschiedenen Konzentrationen AVP und in Anwesenheit von Forskolin (10 μ M) in 3 Nöpfchen pro Konzentration gemessen. Die Streubalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwerts der 3 Nöpfchen.

Immunpräzipitation unterschiedlicher V2R-Konstrukte: FLAG-V2R und FLAG-V2R-GFP

Um die Annahme zu prüfen, dass c-terminales GFP (bzw. CFP oder YFP) den V2R stabilisiert, habe ich HEK293-Zellen mit FLAG-V2R und FLAG-V2R-YFP transient transfiziert. Aus Vorversuchen wusste ich, dass die Expression des GFP-fusionierten Rezeptors deutlich messbare Proteinnengen ergab, während GFP-freie Rezeptorkonstrukte mit Hilfe von Antikörpern nicht unmittelbar detektierbar waren. Das Messergebnis sollte die Menge an GFP-fusioniertem bzw. GFP-freiem Rezeptorkonstrukt sein, das durch Immunpräzipitation mit einem FLAG-Antikörper immobilisiert wurde. Erwartet wurde, dass die Menge an FLAG-V2R-GFP größer war als die mit dem gleichen aber GFP-freien Konstrukt.

Deshalb mischte ich die Plasmide im Transfektionsansatz, dergestalt dass 12 µg FLAG-V2R-Vektor, 0,6 µg FLAG-V2R-YFP-Vektor und 7,4µg pcDNA3 eingesetzt wurden. In beiden Fällen unterlag die Expression der V2R-Konstrukte einem CMV-Promoter, wodurch unterschiedlich hohe Expression durch variierende Promoteraktivität ausgeschlossen werden konnte. Ich untersuchte Wildtyp-V2R und die Rezeptormutante 273.

Der Versuch wurde in Doppelbestimmung durchgeführt, das heißt es wurden Zellmembranen zweier unabhängiger Proben verwendet, um Artefakte durch Variabilität der Transfektionseffizienz auszuschließen. Um sicher zu gehen, dass der vermutete Stabilisierungseffekt von den Reifungseigenschaften des Rezeptors (Wildtyp vs. Mutante) unabhängig ist, habe ich das Experiment mit Konstrukten des Wildtyps und der 273-Mutante durchgeführt. Zudem wurde die Prozedur mit untransfizierten HEK293-Zellen als Negativkontrolle durchgeführt. Die Entwicklung des Immunoblots mit anti-GFP und anti-FLAG ist in Abbildung 3.6 gezeigt.

Die Entwicklung mit anti-GFP (Abbildung 3.6A) machte Doppelbanden sichtbar mit einer Größe von ~55kDa, die dem zu erwartenden V2R-GFP-Konstrukt entsprachen (→FLAG-V2R-YFP). Zusätzlich sind immunreaktive Banden mit relativen Größe von ~150kDa und ~260kDa erkennbar (Abbildung 3.6A). Als Negativkontrolle wurde ein Immunpräzipitat aus untransfizierten HEK293-Zellen aufgetragen (linke Bahn, HEK). Zwischen Wildtyp (FWt+FwtYFP) und Mutante war kein wesentlicher Unterschied in der Bandenrepräsentation des

Rezeptors.

Abbildung 3.6B zeigt die anschließende Entwicklung des Westernblots, der in Abbildung 3.6A dargestellt ist, mit anti-FLAG (Belichtung des Films unter identen Bedingungen). Man sieht, dass die Schwärzung sämtlicher Banden, die bereits in Abbildung 3.6A zu sehen waren, zunahm. Dies war zu erwarten, da jedes Rezeptorkonstrukt das FLAG-Epitop trug und daher in Abbildung 3.6B die Immunreaktivität von beiden Antikörpern (anti-FLAG, anti-GFP) herrührte. Abbildung 3.6B zeigt ferner zusätzliche immunreaktive Banden mit einer relativen Größe von 35kDa (\rightarrow Flag-V2R). Dies entsprach der zu erwartenden Größe des GFP-freien Rezeptormonomers. Die Beurteilung der Rezeptorstabilisierung durch GFP-Fusion erfolgte durch Vergleich der monomerischen Banden (\rightarrow FLAG-V2R-YFP in Abb.3.6A und \rightarrow FLAG-V2R in Abb.3.6B). Die Stärke der 55kDa-Doppelbanden (\rightarrow FLAG-V2R-YFP) in Abbildung 3.6A war in jeder Bahn gleich wie oder größer als die der 35kDa-Banden (\rightarrow FLAG-V2R) in Abbildung 3.6B. Das Testergebnis bestätigt die Annahme, dass die Fusion mit GFP den Rezeptor stabilisiert. Der Effekt war gleich bei Wildtyp und mutantern, ER-retiniertem Rezeptorkonstrukt.

In Abbildung 3.6B war eine weitere zusätzliche Bande zu erkennen, die am ehesten dem FLAG-V2R Dimer (\rightarrow Flag-V2R Dimer) entsprach. Die in Abbildung 3.6A gezeigten Banden mit einer relativen Größe von \sim 150kDa und \sim 260kDa (*) wurden wie alle anderen Banden durch Entwicklung mit anti-FLAG noch stärker exponiert.

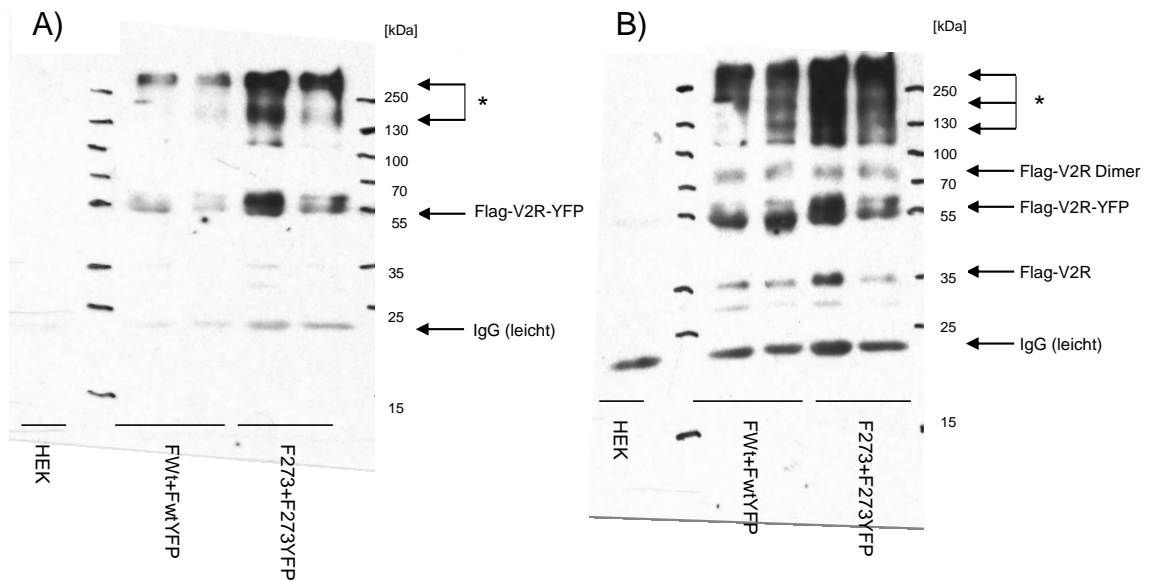


Abb.3.6 Immunpräzipitation unterschiedlicher V2R-Konstrukte: FLAG-V2R und FLAG-V2R-YFP. HEK293-Zellen wurden mit FLAG-V2R und FLAG-V2R-YFP Konstrukten kotransfiziert, deren Zellmembranen geerntet, solubilisiert und die Rezeptoren anhand des FLAG-Epitops immunpräzipitiert. Der Immunoblot wurde zuerst mit anti-GFP, zur Identifikation der FLAG-V2R-YFP Banden, und anschließend mit anti-FLAG entwickelt. **A)** zeigt die Entwicklung mit anti-GFP. **B)** zeigt die Entwicklung des Immunoblots mit anti-FLAG.

Reifung des V2R durch Pharmakochaperone

Wenn c-terminale GFP-Fusion geeignet war um die Rezeptorstabilität zu erhöhen, war meine Hypothese, dass auch Stabilisierung des Rezeptors durch Ligand zu einer Zunahme der Rezeptorgesamtmenge führen müsste. V2R-GFP Konstrukte eignen sich in FACS-Experimenten nicht zur Bestimmung der Oberflächenexpression, ermöglichen aber eine Abschätzung der zellulären Rezeptormenge.

In Abbildung 3.7.1A ist auf der y-Achse die GFP-spezifische Fluoreszenz (Integral des Histogramms) aufgetragen. Ich habe HEK293-Zellen transient mit den V2R-GFP Konstrukten (JetPEI Methode, 1:15 = V2R zu pcDNA3 Leervektor) 273-GFP (links) und 318-GFP (rechts) transfiziert. Wie Abbildung 3.9A zeigt kam es nach 18-stündiger Vorbehandlung mit SR121463 bzw. Tolvaptan (10 μ M) tatsächlich zu einer Zunahme der mit FACS gemessenen GFP-Fluoreszenz um den Faktor 2 – 3.

In Abbildung 3.7.1B sind die Daten dieses Experiments mit einer Wt-GFP HEK293-Zelllinie gezeigt. Die Gesamtmenge des Wildtyprezeptors mit GFP-Fusionsprotein (HEK293-Zelllinie) wurde durch die Vorbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen SR121463 jedoch nur in einem bescheidenen Ausmaß (+10%) und nicht abhängig von der eingesetzten SR-Konzentration erhöht. Die Effektgröße war an der Messbarkeitsgrenze und ähnlich gering wie die Erhöhung der Oberflächendichte des Wildtyprezeptors durch SR121463 oder Tolvaptan.

Das bedeutet bei ER-retinierten Rezeptoren führte die Behandlung mit Pharmakochaperonen zu einer Erhöhung der Rezeptorgesamtmenge.

Zur Beurteilung der Rezeptorreifung erntete ich Zellmembranen von 318-GFP bzw. 273-GFP HEK293-Zelllinien, die mit verschiedenen Konzentrationen SR121463 für 18 Stunden vorbehandelt worden waren, und trennte die Proteine direkt nach Denaturierung in SDS-haltigem Probenpuffer mit SDS-PAGE auf. In Abbildung 3.7.2A ist das Ergebnis der Inkubation des Immunoblots mit anti-GFP gezeigt. Man sieht, dass Inkubation der Zellen mit SR121463 die Schwärzung der immunreaktiven Banden steigerte und darüber hinaus das Bandenmuster änderte. Eine Zunahme war bei 273-GFP und 318-GFP am deutlichsten in der mit * gekennzeichneten Bande zu erkennen. Eine zusätzliche Bande mit einer Größe von etwa 55kDa (-55) trat unter SR121463-Behandlung auf. Besonders für 318-GFP war nach

Pharmakochaperonbehandlung eine Zunahme der Bandenintensität auch bei den Banden mit relativer Größe von 100kDa (-100) oder mehr sichtbar. Diese Banden, die offensichtlich von Aggregation des Rezeptorkonstrukts herrührten, waren spezifisch für die V2R-GFP Konstrukte aber nicht in untransfizierten HEK293 Zellen zu sehen (nicht gezeigt).

In einem zusätzlichen nicht gezeigten Experiment wurde die EndoH Sensitivität der rezeptorspezifischen Banden bestimmt. Die 70kDa (*) und 55kDa (-55) Banden in Abbildung 3.7.2A waren gegenüber Endoglykosidase H-Verdau resistent, die 60 kDa Bande (→ EndoH-sensitiv) hingegen nicht. Endoglykosidase H-Resistenz ist eine Eigenschaft komplexer Glykosylierung, welche der Rezeptor erst innerhalb des Golgi-Apparats erhält und somit Rezeptorreifung anzeigt. Das heißt die EndoH-resistenten Banden (70kDa und 55kDa) in Abbildung 3.7.2A entsprachen der reifen Rezeptorform. Aus Abbildung 3.7.2A wird es offensichtlich, dass Inkubation mit Pharmakochaperon Stabilität und Reifung förderte.

Das Ergebnis aus Abbildung 3.7.2A ließ ferner den Schluss zu, dass Rezeptorreifung nicht nur Pharmakochaperon sondern auch die c-terminale Stabilisierung mit GFP erfordert. Zur Untersuchung des nicht mit GFP-fusionierten Rezeptors war wegen des niedrigeren Expressionsniveaus eine Immunpräzipitation erforderlich. Ich verwendete stabile Zelllinien, die die mutanten V2R-Konstrukte FLAG-273 (Abbildung 3.7.2B, links) oder FLAG-318 (Abbildung 3.7.2B, rechts) exprimierten. Der Effekt des Pharmakochaperon auf die Rezeptormenge und Reifung ist in Abbildung 3.7.2B gezeigt. Die rezeptorspezifische Bande ist markiert mit (→FLAG-V2R) und entspricht einem Molekulargewicht von ≤ 40 kDa. Die zusätzlichen Banden bei 55 und 25kDa entsprechen den Antikörperketten. Wie aus der Abbildung 3.7.2B ersichtlich gab es durch Behandlung mit SR121463 (+SR) bei keiner der beiden Mutanten eine Veränderung der Bandenstärke oder des Bandenmusters. Lediglich in der Spur V2R-273 (+SR) tauchte eine Bande (*) mit einem Molekulargewicht von etwa 70kDa auf. Nach Immunpräzipitation der GFP-freien Konstrukte war auf dem Westernblot somit keine deutliche Stabilisierung oder Reifung durch das Pharmakochaperon zu sehen.

Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu dem Befund, den ich durch direkten Rezeptornachweis nach Gelelektrophorese von Zellmembranen erhielt. Abbildung 3.7.2C zeigt den Immunoblot von Membranen mit dem GFP-fusionierten Rezeptorkonstrukt FLAG-273-YFP. Ebenso wie in Abbildung 3.7.2A kam es zu einer Zunahme der Bandenschwärzung durch die Behandlung mit SR121463 (Abbildung 3.7.2C links). Entwicklung des Immunoblot mit FLAG-Antikörper zeigt

die monomerische Bande bei 70kDa (-70) und die mutmaßlichen Rezeptoraggregate bei ~150 und ~260kDa (Abbildung 3.7.2B links, markiert mit *). Wenn ich diesen Rezeptor aus diesen Membranen solubilisierte und präzipitierte, änderte sich das Bild vollständig. Abbildung 3.7.2C(rechts) zeigt den Westernblot nach Immunpräzipitation des Rezeptors. Die Behandlung mit SR121463 führte zu keiner nennenswerten Zunahme der Rezeptormenge oder des Reifungsgrades.

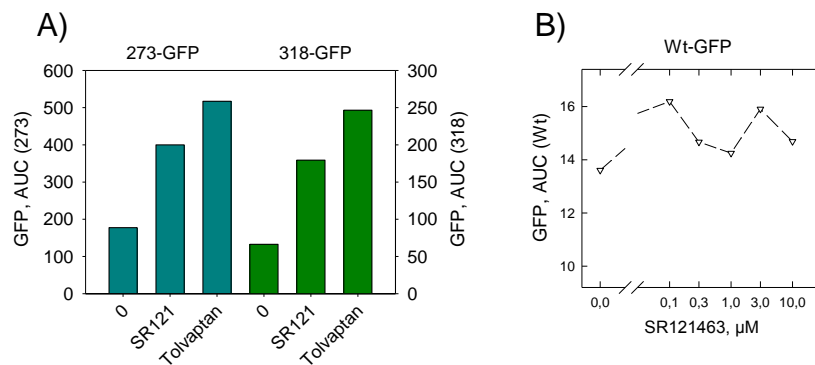


Abb.3.7.1, Erhöhung der Rezeptorgesamtmenge durch Pharmakochaperone. V2R-GFP Zelllinien wurden mit SR121463 bzw. Tolvaptan (10μM) für 18h behandelt und die GFP-Fluoreszenz mit FACS gemessen. **A)**, zeigt die Änderung der GFP-Fluoreszenzintensität bei 273- und 318-GFP in einem Balkendiagramm. **B)**, zeigt die Änderung der GFP-Fluoreszenzintensität des Wildtyp V2R-GFP nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen SR121463.

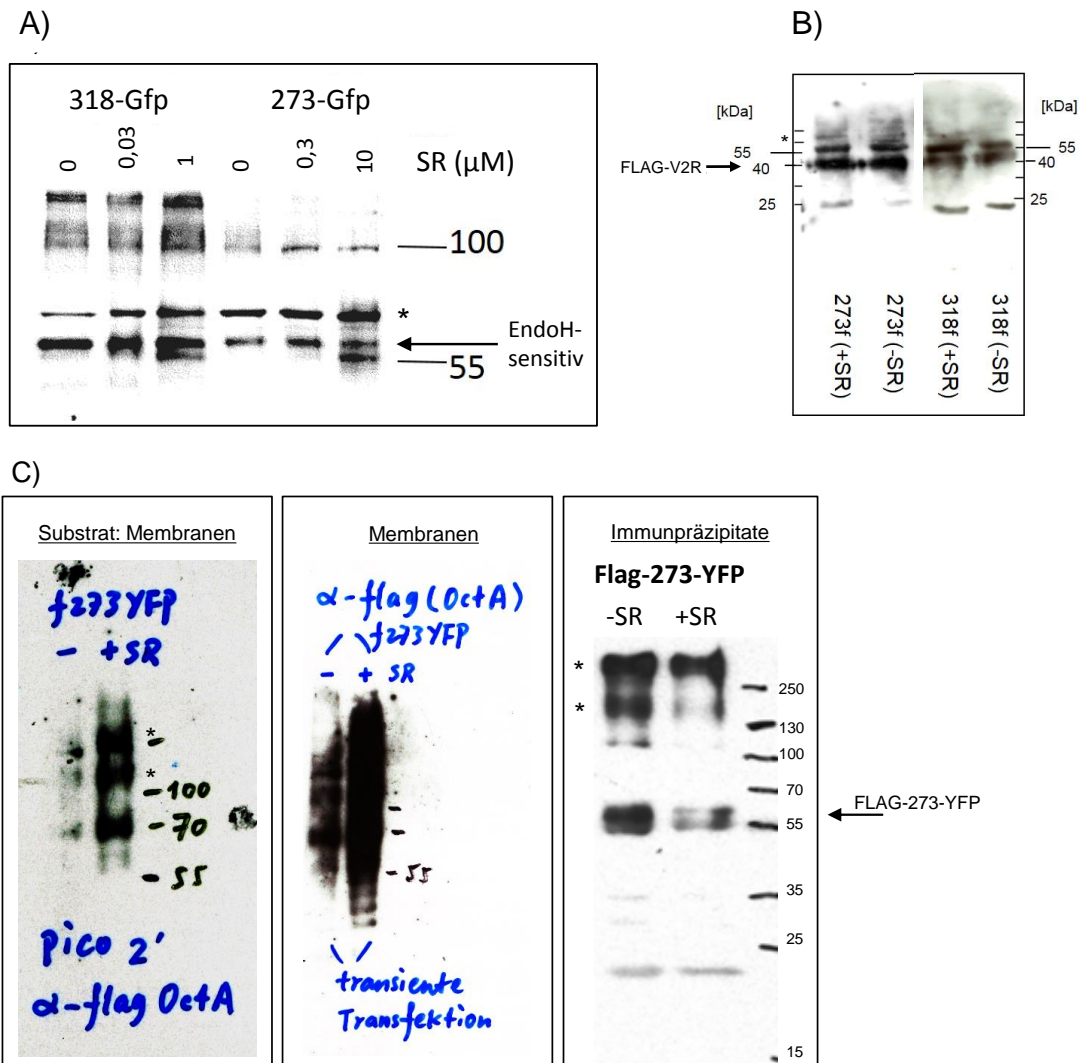


Abb.3.7.2, Reifung des V2R durch Behandlung mit einem Pharmakochaperon. HEK293-Zellen (Zelllinien: FLAG-273, 273-GFP, FLAG-318, 318-GFP; transient transfizierte Zellen: FLAG-273-YFP) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen SR121463 (SR) für 18 Stunden behandelt und die Zellmembranen geerntet. **A)**, Zellmembranen von 273-GFP (vorbehandelt mit 0/0,3/10 μM SR) und 318-GFP exprimierenden Zellen (vorbehandelt mit 0/0,03/1 μM SR) wurden mit SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Immunoblot wurde mit anti-GFP entwickelt. **B)** Zellmembranen von FLAG-273 und FLAG-318 exprimierenden Zellen wurden mit SR (0/10 μM) behandelt und nach der Ernte solubilisiert und immunpräzipitiert. Der Immunoblot wurde mit anti-FLAG entwickelt. **C)**, Westernblot von Zellmembranen, gewonnen aus transient transfizierten Zellen (FLAG-273-YFP; vorbehandelt mit 0/10 μM SR). Links, kurze Filmexposition, Mitte, Langexposition. Dieselben Zellmembranen wurden in DDM solubilisiert, mit FLAG-Antikörper immunpräzipitiert und nach Gelelektrophorese geblottet. Die Immunoblots wurden mit anti-FLAG entwickelt.

Koimmunpräzipitation der molekularen Chaperone

HSP90 und HSP70 mit dem V2R

Retention von Transmembranproteinen wird durch Interaktion mit molekularen Chaperonen der HSP-Familie und anderer vermittelt. Daher ließ die Zunahme der Oberflächenexpression mit 17-DMAG auf eine Interaktion mit HSP90 schließen, die auch für den A2A-Rezeptor nachgewiesen wurde [80]. Da Abbildung 3.4.1 und Abbildung 3.4.2 zeigen, dass 17-DMAG jeweils die Oberflächenexpression von Wildtyp und Rezeptormutanten erhöht, prüfte ich, durch Ko-Immunpräzipitation eine Interaktion von V2R-Konstrukten mit HSP90.

Zu diesem Zweck erntete ich Zellmembranen von transient transfizierten HEK293-Zellen (FLAG-V2R-YFP, Wt bzw. 273) bzw. untransfizierten HEK293-Zellen als Negativkontrolle. Nach Solubilisierung mit DDM (0,2%) wurde Rezeptor mit M2-FLAG Antikörper und Protein-G-gekoppelten magnetische Kügelchen (Dynabeads) gefällt. Ich verwendete Dynabeads, da eine unspezifische Präzipitation mancher molekularen Chaperone (darunter HSP90) mit Agarose beschrieben worden war [5]. Ich entwickelte den Immunoblot mit einem anti-HSP90 (Kaninchen) Antikörper, der nicht zwischen HSP90 α und HSP90 β diskriminiert. Abbildung 3.8.1A zeigt den Westernblot mit den Immunpräzipitaten aus untransfizierten Zellen (Hek) und aus Zellen, die mit FLAG-Wt-YFP (F-Wt-YFP, links) oder FLAG-273-YFP (F-273-YFP, rechts) transfiziert worden waren. Zellen die mit SR121463 behandelt worden waren sind mit (+) gekennzeichnet; (-) bedeutet keine Behandlung.

Abbildung 3.8.1A zeigt, dass in der Region 90kDa keine immunreaktive Bande nach Entwicklung mit anti-HSP90 zu sehen war. Immunreaktive Banden fanden sich allerdings bei einem Molekulargewicht von etwa 150kDa und 260kDa (rote Pfeile in Abbildung 3.8.1A und B). Diese Banden waren in der Negativkontrolle nicht erkennbar und ich vermute, dass sie HSP90-haltige Proteinaggregate darstellen. Während Abbildung 3.8.1A eine Filmüberexposition zeigt, wurde für 3.8.1B kürzer exponiert. In Abbildung 3.8.1B sieht man, dass die immunreaktiven Banden nicht gleich stark waren. Die SR-Behandlung (+) reduzierte die Assoziation von HSP90 mit dem Wildtyp, aber nicht mit der Rezeptormutante.

Abbildung 3.8.1C dokumentiert die Immunpräzipitation des FLAG-Wt-YFP Rezeptors in einem separaten Experiment, in dem transfizierte und untransfizierte Zellen verglichen wurden. Dieser

Immunoblot wurde mit dem polyklonalen anti-FLAG-Antikörper entwickelt. Er zeigt eine immunreaktive Bande mit einem Molekulargewicht zwischen 70 und 100 kDa (\rightarrow FLAG-V2R-YFP) und eine weitere Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 260 kDa (\rightarrow V2R-HSP90) jeweils in der Immunpräzipitation der transfizierten Zellen (Abb.3.8.1C, Spalte FlagWtYFP). Weitere Banden, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um die schwere und leichte Seitenkette des M2-FLAG Antikörper handelt, sind mit Sternchen markiert und finden sich sowohl in transfizierten als auch in untransfizierten Zellen (Abb.3.8.1C, Spalte FlagWtYFP bzw. Hek).

Die Detektion jener Aggregate, mit einer Größe von \sim 150 und \sim 260kDa, trat besonders stark beim Einsatz von Protein G gekoppelten magnetischen Kügelchen (*Dynabeads*) auf. Dies lag vermutlich an einem ungünstigen Verhältnis von Elutionspuffer (Probenpuffer mit 2X SDS) zu Protein-G-Matrix. Eine unterschüssige Zugabe des Elutionspuffers könnte eine unvollständige Denaturierung des Materials und Aggregation fördern. Es wird vorgeschlagen, Dynabeads nicht weniger als zu einem Fünftel des Reaktionsvolumens einzusetzen, da sonst die Präzipitationseffizienz abfällt. Erfahrungsgemäß konnte ich deutlich weniger PGA für die Präzipitation verwenden. Magnetpartikel (Dynabeads) verwendete ich jedoch auf Grund der Beobachtung [5], dass Agarose manche molekulare Chaperone (darunter HSP90) unspezifisch präzipitieren kann. Ich testete die Elution der Präzipitate mit einem zwei bis vierfachen Überschuss an Lämmli-Probenpuffer sowie bei geringeren Temperaturen im Versuch die Aggregatbildung der denaturierten Proteine zu vermindern. Unter diesen Bedingungen zerfiel zwar der präzipitierte Antikörper vollständig, die Aggregate (\sim 150 und \sim 260kDa) wurden jedoch weiterhin detektiert (Daten nicht gezeigt). Ich gehe davon aus, dass die Immunreaktivität spezifisch war, da aus nicht transfizierten Negativkontrollen weder immunreaktive Aggregate (nach langer Exposition) noch andere immunreaktive Banden (für Octa-Probe, anti-GFP bzw. anti Hsp90 α/β) zu finden waren. Ausnahmen waren die Polypeptidketten des M2-Flag Antikörpers, der für die Immunpräzipitation eingesetzt wurde sowie eine Bande unterhalb von 35kDa, die wahrscheinlich Protein G entsprach.

Abb.3.8.2 zeigt HSP70 in Rezeptorpräzipitaten. Die Entwicklung des Immunoblots mit anti-HSP70 Antikörper (Maus, monoklonal) stellt eine immunreaktive Bande mit einer Größe von etwa 70kDa in allen Bahnen außer der Negativkontrolle (2. Bahn von rechts, Hek) dar. Die Immunpräzipitation erfolgte aus HEK293-Zelllinien, die FLAG-Wt (F-Wt) bzw. FLAG-273 (F-273) Rezeptor stabil exprimierten. Die Zellen waren nicht (0) bzw. mit 17-DMAG (0,5 μ M) oder SR121463 (10 μ M, SR121) behandelt worden.

Durch die Behandlung mit 17-DMAG wurde im Falle der Rezeptormutante 273 mehr HSP70 als in der Kontrolle (0) bzw. mit nach SR121463-Behandlung (SR121) präzipitiert. Ein ähnliches Bild ergab sich für den Wildtyprezeptor. Die Abbildung 3.8.2, zeigt ferner, dass SR121463-Behandlung hingegen keinen Effekt auf die Ko-Präzipitation von HSP70 hatte, Dieses Ergebnis wurde in einem separaten Ko-Immünpräzipitationsexperiment bestätigt (Westernblot nicht gezeigt). Für dieses Ergebnis gibt es zwei mögliche Erklärungen. (i) 17-DMAG induzierte HSP70 [119]. (ii) Wenn HSP90 in der Prozessionskette von naszierenden Transmembranproteinen auf HSP70 folgt, wäre auch zu erwarten, dass ein HSP90-Inhibitor verhindert, dass HSP90 HSP70 als Faltungspartner ablöst. Gleichgültig welche Hypothese korrekt ist, bestätigte das Ergebnis die Vorhersage. Die Ko-Immünpräzipitation von HSP70 mit dem Wildtyprezeptor kann dadurch erklärt werden, dass unreife Formen des Rezeptors präzipitiert wurden. Offensichtlich ist aber die Retention des Rezeptors (Mutante im Vergleich zu Wildtyp) Voraussetzung für einen produktiven Effekt von 17-DMAG in der HSP70-Assoziation.

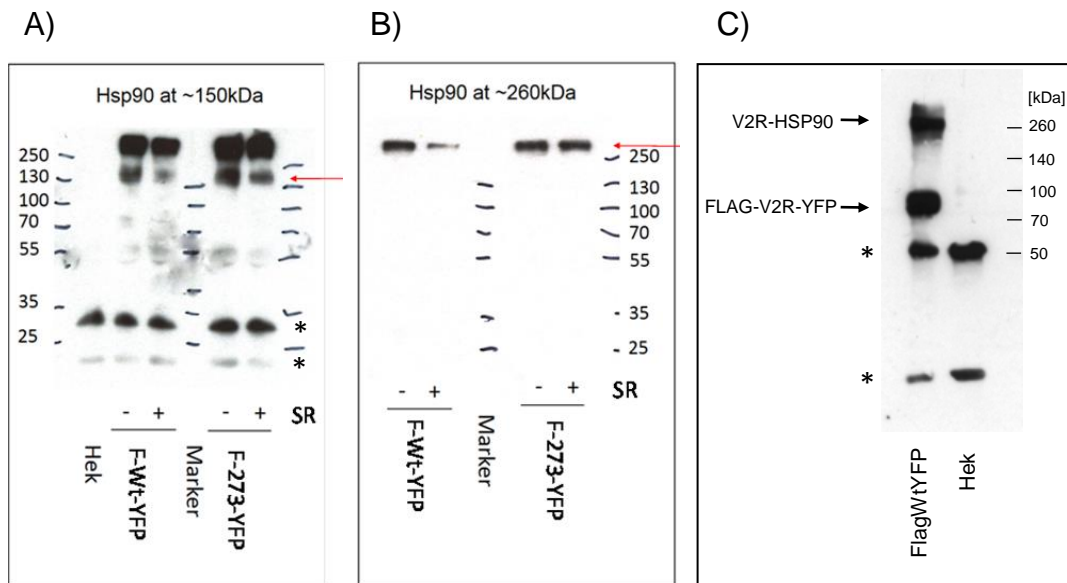


Abb.3.8.1, Koimmunpräzipitation von HSP90. Zellmembranen von transient transfizierten HEK293-Zellen (FLAG-Wt-YFP, FLAG-273-YFP), die 18 Stunden mit SR121463 (0/10 μ M, "SR") vorbehandelt worden waren, wurden mit 0,2% DDM solubilisiert und die Rezeptoren mit M2-FLAG Antikörper und Protein-G gekoppelten magnetischen Kügelchen (Dynabeads) immunpräzipitiert. Als Negativkontrolle ("Hek") wurden die Zellmembranen untransfizierter HEK293-Zellen solubilisiert und immunpräzipitiert. Der Immunoblot wurde mit anti-HSP90 α/β entwickelt. Abbildungen **A** und **B** zeigen denselben Blot mit unterschiedlicher Filmbelichtungszeit. (**C**) Blot zeigt Immunpräzipitation des YFP-fusionierten Wildtyprezeptors (\rightarrow FLAG-V2R-YFP) in einem separaten Experiment und wurde mit HSP90 und GFP-spezifischem Antikörper in dieser Reihenfolge entwickelt; Sternchen markieren Banden, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um die Antikörperketten handelt.

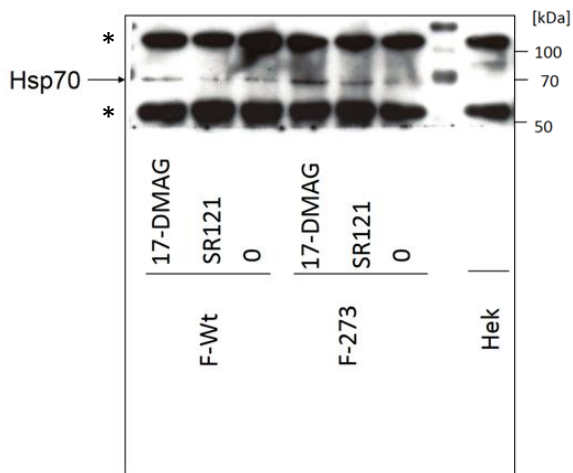


Abb.3.8.2, Koimmunpräzipitation von HSP70. Zellmembranen aus HEK293-Zelllinien (FLAG-Wt, FLAG-273; Vorbehandlung mit 0,5 μ M 17-DMAG oder 10 μ M SR121463 „SR121“ bzw. ohne Vorbehandlung „0“) wurden mit DDM solubilisiert und die Rezeptoren immunpräzipitiert. Als Negativkontrolle ("Hek") wurden die Zellmembranen untransfizierter HEK293-Zellen in gleicher Weise immunpräzipitiert. Der Immunoblot wurde mit anti-HSP70 (monoklonal, Maus) entwickelt. (*)Unspezifische immunreaktive Banden fanden sich mit einer Größe von ~100kDa und ~55kDa, es handelte sich höchstwahrscheinlich um ein Aggregat des M2-FLAG Antikörpers bzw. dessen schwere Seitenkette.

Unterschiede in der transienten und stabilen Expression des V2R

Abbildung 3.7.2C zeigte, dass nach transienter Expression des GFP-fusionierten Rezeptorkonstrukts mehr Immunreaktivität in Banden >100kDa als <100kDa gefunden wurde. In stabil exprimierenden Zellen (Abbildung 3.7.2A) war es umgekehrt; eine Immunreaktivität war in Banden >100kDa kaum vorhanden.

Diese Banden erinnern an das Bandenmuster 150/260kDa, die in Abbildung 3.8.1A nach Immunpräzipitation des Rezeptors als HSP90-immunreaktive Banden zur Darstellung kamen. Überraschenderweise waren diese Aggregate resistent gegenüber DTT, SDS und Erhitzen. Nichtsdestotrotz belegt die Darstellung der 260kDa-Bande mit rezeptorspezifischen und HSP90-spezifischen Antikörpern die Anwesenheit von Rezeptor und HSP90 in diesen Komplexen.

Um zu prüfen ob es einen reproduzierbaren Unterschied in der Bildung der Rezeptorkomplexe (Banden >100kDa) zwischen transient und stabil transfizierten HEK293-Zellen gab, verglich ich Immunoblots unabhängiger Experimente (Abb.3.9). Die Abbildung 3.9A zeigt Zellmembranen aus transient transfizierten HEK293-Zellen, die Wildtyp-GFP (links) oder FLAG-273-YFP (Mitte, rechts) exprimierten. Die Immunoblots (links, Mitte) wurden mit GFP-Antikörper und der rechte Immunoblot mit FLAG-Antikörper entwickelt (Abb. 3.9A). Im Bereich <100kDa erkennt man diskrete Banden bei ~55kDa (-55, Doppelbande) bzw. ~70kDa (-70). Im Bereich > 100 kDa waren Banden mit einer Größe von 130 kDa (*, Mitte, rechts), 150kDa (#), bzw 260kDa (#) dominant. Lediglich in der mittleren Spalte wurde eine noch größere Bande (§) detektiert.

In Abbildung 3.9B sind zum Vergleich Zellmembranen aus stabil transfizierten HEK293-Zellen (Wildtyp-GFP - links, und zwei Linien mit 273-GFP –Mitte bzw. rechts) gezeigt. Die Immunoblots in Abbildung 3.9B wurden mit GFP-Antikörper entwickelt. Auffällig ist hier, dass in jedem Experiment mit transient transfizierten HEK293-Zellen (Abb.3.9A) die Intensität der Banden >100kDa höher war als die der Banden <100kDa. Dies steht im Gegensatz zu der Beobachtung in stabil transfizierten HEK293-Zellen (Abb.3.9B), in welchen die Banden >100kDa (#) nur schwach und nicht reproduzierbar vorhanden waren. Dadurch unterscheiden sich die Immunoblots in Abbildung 3.9A und B deutlich. Im Bereich <100kDa waren die Bandenmuster in 3.9A und B einander sehr ähnlich. Variation der Denaturierungsbedingungen

(Änderung der SDS-Konzentration, Zugabe von DTT, unterschiedliche Temperatur) hatte jedoch keine Auswirkung auf die Darstellung der Banden >100kDa (nicht gezeigt).

Die Größe der Komplexe in Abbildung 3.9A entsprach jenen die HSP90-Komplexe enthielten (Abbildung 3.8.1A) Ich vermutete, dass die HEK293-Zellen nach transienter Transfektion HSP90 hochregulierten und zwar als Reaktion auf ER-Stress (infolge Überexpression des transfizierten Konstrukts). Der Überschuss würde sich im Komplex mit dem Rezeptor wiederfinden.

Durch einen Vergleich des HSP90-Expressionsniveaus untransfizierter und transfizierter HEK293-Zellen wurde diese Annahme geprüft.

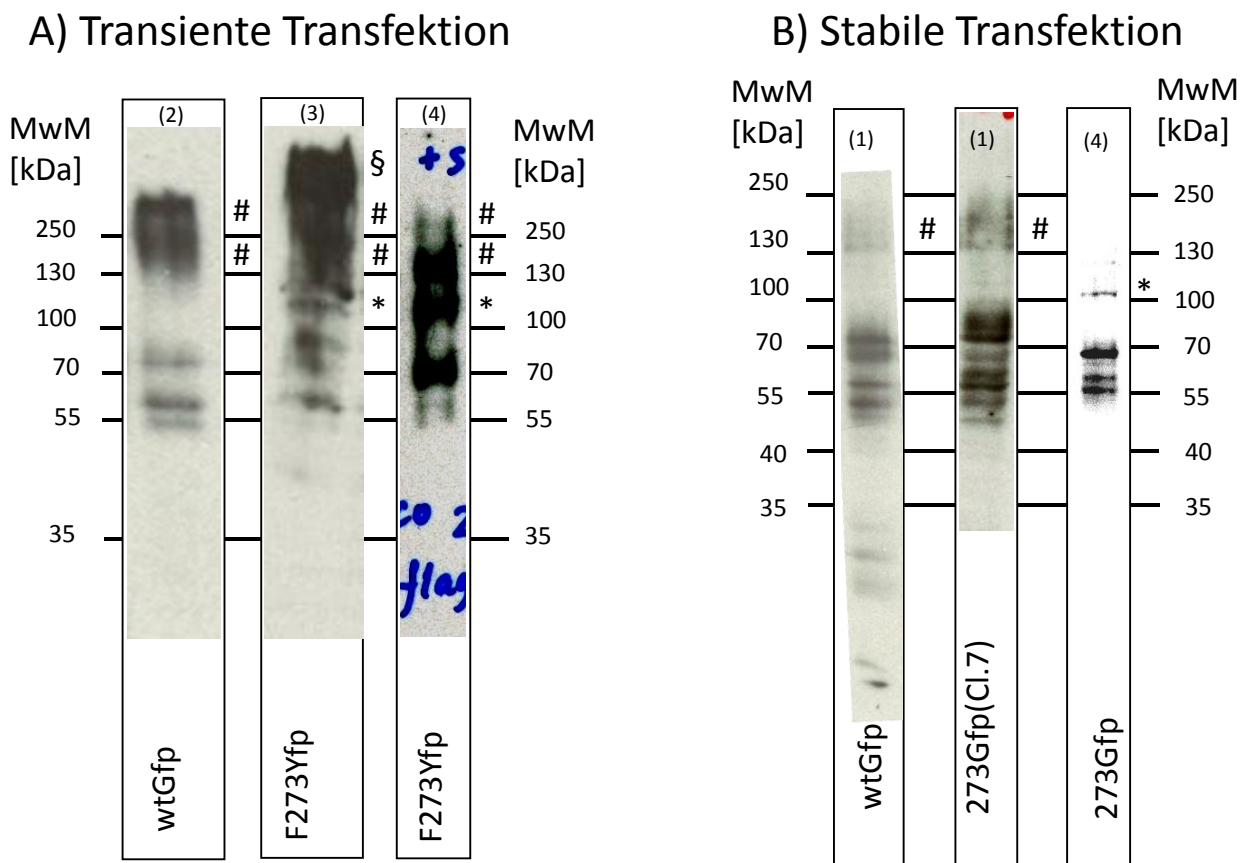


Abb.3.9, Unterschiedliche Verteilung der Bandenstärke im Vergleich transiente und stabile Transfektion mit GFP-fusionierten Rezeptorkonstrukten. Zellmembranen transient oder stabil transfizierter HEK293-Zellen wurden geerntet, die Membranen unter verschiedenen Bedingungen denaturiert, mit SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Es handelt sich in der Abbildung in jeder der sechs Spalten (A, transient; B, stabil) um unterschiedliche Proben und unterschiedliche Experimente. Die Denaturierungsbedingungen sind gekennzeichnet durch Zahlen in Klammern (1 – 4). (1) Probe wurde für 30 min bei 60°C erhitzt. (2) 2 Stunden bei 55°C, resuspendiert, danach eine weitere Stunde bei 55°C. (3) 5 Minuten bei 70°C. (4) 1 Stunde bei 60°C. In jedem Fall erfolgte die Denaturierung von 20µg Protein in SDS-haltigem Lämmli-Probenpuffer (Gesamtvolumen von 20µl). **A)** Zellmembranen aus transient transfizierten HEK293-Zellen, Wt-GFP (links), FLAG-273-GFP (Mitte und rechts). **B)** Zellmembranen aus stabil transfizierten HEK293-Zellen (wtGfp, polyklonal 273Gfp, monoklonal 273Gfp(Cl.7)). **A und B)** Zellen, die die Rezeptormutante T273R exprimierten, waren 18 Stunden mit 10µM SR121463 vorbehandelt worden.

Detektion von HSP90 und HSP90-assoziierten Chaperonen

Ich verglich Zelllysate aus transient transfizierten Zellen mit jenen aus stabilen Linien. Die Zellen wurden kultiviert und direkt in der Kulturschale mit Lysepuffer solubilisiert. Die Lysate wurden mit SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Verwendet wurden V2R-GFP (Wildtyp und 273 in stabilen Linien) und FLAG-V2R-YFP (Wildtyp und 273 nach transients Transfektion). Abbildung 3.10A zeigt stabile Linien, beschriftet in blau, transiente Zellen in rot. (Wt, Abb.3.10A links; V2R273, Abb.3.10A rechts). Blots wurden für HSP90 α , HSP70 und p23 entwickelt. Die Bandenintensität für p23 und HSP70 nahm nach transients Transfektion gegenüber stabilen Zellen deutlich ab. HSP90 α (die stress-induzierte Form von HSP90) war hingegen nicht unterschiedlich. Der rechte Immunoblot in Abbildung 3.10A (V2R273) wurde zudem mit HOP Antikörper entwickelt, gezeigt in der vierten Zeile. Auch in diesem Fall ist die Intensität der HOP-Bande im Falle der transients Transfektion mit 273-GFP geringer als in der 273-GFP Zelllinie.

Der Effekt der transients Transfektion des GFP-fusionierten Rezeptors betraf somit HSP70, das Cochaperon HOP, das HSP90 und HSP70 in einem Komplex zusammenführt, sowie den Modulator der HSP90-Funktion, p23. HSP90 war hingegen unverändert; darüber hinaus trat es in den Lysaten transient transfizierter Zellen – anders als in den Rezeptorpräzipitaten - nicht als hochmolekulares Aggregat auf. Dieser Befund suggeriert, dass nach Transfektion Zellen an einem Teil des Faltungsapparats verarmen. Die hochmolekularen Rezeptoraggregate (wie in Abbildung 3.9) könnten daher so entstehen, dass naszierende Rezeptoren - von den Checkpoints HSP70 und HSP70-positiven Multimeren unzureichend retiniert - im HSP90 Komplex akkumulieren. Die vorhandene wissenschaftliche Evidenz ist im Einklang mit der Annahme, dass ein Mangel an p23 andererseits den HSP90-Komplex stabilisiert. Daher müssten im Vergleich von transients und stabilen Zellen HSP90-Proteinkomplexe eine unterschiedliche Zusammensetzung aufweisen.

Tatsächlich fand ich nach transients Transfektion eine unterschiedlich ausgeprägte Assoziation mit HSP90, die in ihrer Art aus den Lysaten der Abbildung 3.10.A nicht vorhersagbar waren. Um den HSP90 Komplex zu untersuchen, präzipitierte ich HSP90 mittels HSP90 α und HSP90 β Antikörpern aus Lysaten untransfizierter HEK293-Zellen (**HEK**; Abb.3.10B), einer 273-GFP Zelllinie (**273, stabil**; Abb.3.10B) und transient mit FLAG-273-YFP (**273, transient**; Abb.3.10B)

transfizierten HEK293-Zellen. Die Immunpräzipitate wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Abbildung 3.10C zeigt die Entwicklung dieses Immunoblots mit HSP90 α/β , HSP70, p23 und HOP. Von diesen waren HSP90 α/β und p23 in allen Proben ähnlich. Hingegen waren HSP70 sowie HOP nach der transienten Transfektion (**273, transient**) vermehrt. Der Unterschied bestand im Vergleich mit untransfizierten Zellen (**HEK**) und der Zelllinie (**273, stabil**). Zwischen untransfizierten HEK293-Zellen und der Zelllinie war hingegen kein Unterschied; im Einklang mit der unveränderten Expression der Hitzeschockproteine HSP90 und HSP70 ergab auch die Bestimmung der UPR-Marker XBP1, BiP und CHOP keinen Hinweis auf ER-Stress in Zelllinien (nicht gezeigt).

Eine mögliche Erklärung ist die Selektion von Zellen mit geringerem Expressionsniveau des Rezeptorproteins und Vermeidung von ER-Stress. Spekulativ bleibt vorerst, ob die in Abbildung 3.9A gezeigten SDS-resistente Aggregate (immunreaktive Banden >100 kDa) tatsächlich aus HSP70-HOP-HSP90-haltigen Komplexen bestehen.

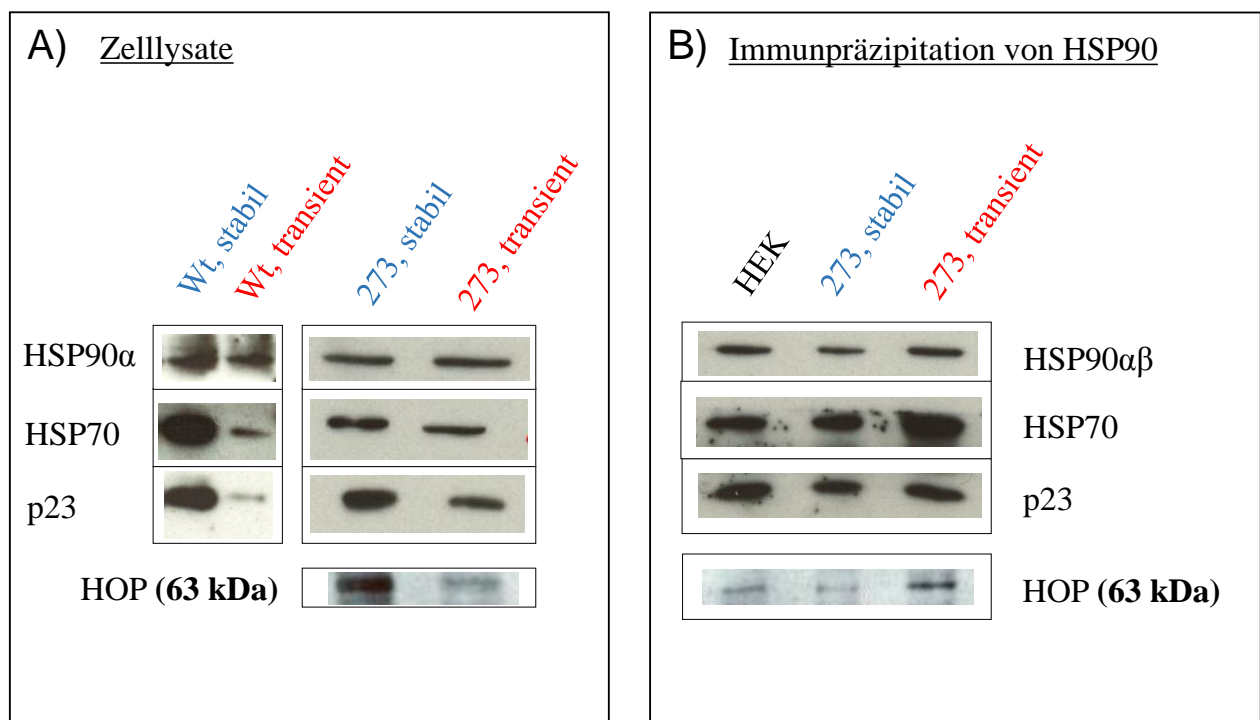


Abb.3.10, Detektion von HSP90 und HSP90-assoziierten Ko-Chaperonen. Zellen wurden mit Lysepuffer solubilisiert, die Zelllysate mit SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Immunoblots wurden mit Antikörpern gegen HSP90 α , HSP90 α/β , HSP70, p23 und HOP entwickelt. **A)** Gezeigt sind Lysate aus HEK293-Zelllinien, die entweder Wildtyp (**Wt, Stabil**) oder Rezeptormutante (**273, Stabil**) als V2R-YFP Konstrukte exprimierten, sowie transient mit den Konstrukten FLAG-V2R-YFP (**Wt, Transient; 273, Transient**) transfizierte HEK293-Zellen. **B)** zeigt die Immunpräzipitation von HSP90 α und HSP90 β aus Zelllysaten. Der Immunoblot wurde mit Antikörpern gegen HSP90 α/β , HSP70, p23 und HOP entwickelt. Gezeigt sind Lysate aus untransfizierten HEK293-Zellen (**HEK**), einer 273-GFP Zelllinie (**273, stabil**) und transient mit FLAG-273-YFP transfizierten Zelllinie (**273, transient**).

Diskussion

Das Thema meiner Arbeit war „Erzwungener Export des V2-Vasopressinrezeptors durch Stabilisierung des Rezeptorproteins und durch Hemmung der HSP90-ATPase“. Ich untersuchte V2R-Konstrukte mit „Lesefehlermutationen“, die zum Austausch einzelner Aminosäuren führten und durch Transfektion in kultivierbaren Zelllinien zur Expression gebracht wurden. Der Lesefehler betraf in allen untersuchten Konstrukten die kodierende Sequenz der Transmembrandomäne, obzwar an unterschiedlichen Segmenten. Jede dieser Mutationen führte zur primären, intrazellulären Lokalisation des Rezeptors. Durch den Einsatz der synthetischen V2R-Antagonisten SR121463 und Tolvaptan wurde die Oberflächenexpression der Rezeptormutanten erhöht (Pharmakochaperoneffekt).

Der V2R wird durch Fusion mit GFP und Pharmakochaperone stabilisiert

Carboxyterminale Fusion an grün-fluoreszierendes Protein (GFP) führte zur Stabilisierung des Rezeptorpolypeptids. Wenn die Expression von Rezeptorkonstrukten mit und ohne GFP miteinander verglichen wurde, fand ich eine beträchtliche Überexpression des Fusionskonstrukts im Vergleich zum unfusionierten Rezeptor. Die Expressionszunahme war zumindest zwanzigfach. Da die Expression der Rezeptorkonstrukte mit bzw. ohne GFP unter der Kontrolle eines CMV-Promoters stand, sprach der Unterschied für eine GFP-abhängige Stabilisierung bzw. einen GFP-verursachten Schutz vor Degradation des Fusionsproteins. GFP stabilisiert wahrscheinlich den Rezeptor, da es selbst ein schlechtes Substrat für Ubiquitinierung ist; [123] beschreibt diesen Umstand in Hefen. Auch in *E.coli* erhöht Fusion an GFP [121] die Expression von Proteinchimären; wobei dies vermutlich durch verbesserte Löslichkeit der Proteine erreicht wird, wie auch die Fusion von Proteinen an MBP (Maltose-bindendes Protein) [122]. In Säugerzellen wurde ebenfalls gezeigt, dass durch c-terminale GFP-Fusion die Expression des β 2-Adrenorezeptors (β 2-AR) zunahm und sich der Abbau des Rezeptorproteins nach Internalisierung verlangsamte [120].

Stabilisierung durch GFP war in meiner Arbeit vermutlich dafür verantwortlich, dass lediglich die Signalgebung des V2R-T273R-GFP Konstrukts, nicht aber der Rezeptormutante ohne GFP durch Inkubation mit dem Pharmakochaperon wiederhergestellt werden konnte. Die durch

Vasopressin stimulierte cAMP-Bildung war nach Pharmakochaperonbehandlung um etwa den Faktor fünf stärker als in der Kontrolle und damit in einem ähnlichen Ausmaß wie beim Wildtyprezeptor. Da es sich bei den eingesetzten Liganden Tolvaptan bzw. SR121463 um Antagonisten handelte, war die Aktivierung des Rezeptors erst nach i) einer extensiven Auswaschperiode und ii) unter Einsatz unphysiologisch hoher Konzentrationen des Agonisten Vasopressin möglich. Aus diesem Grund sind Liganden wie Tolvaptan zur Behandlung des Diabetes Insipidus im Prinzip ungeeignet.

In den untersuchten V2R-Mutanten T273R (TM 6) und S318I (TM7) bestand zusätzlich zur ER-Retention ein Problem in der Signalgebung. Der unbehandelte V2R-T273R-GFP ließ eine geringe Affinität für AVP erkennen: die der Qualitätskontrolle entkommenen, an die Zelloberfläche residierenden Rezeptoren benötigten zu ihrer Aktivierung eine 20-fach höhere AVP-Konzentration als der Wildtyp.

Vergleichbar zur GFP-Fusion führte der Pharmakochaperoneffekt dazu, dass die mutanten Rezeptoren an Menge zunahmten und darüber hinaus reiften. Analyse GFP-fusionierter Rezeptorkonstrukte im Westernblot zeigte ein im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen verändertes Bandenmuster und intensiver markierte Banden. Überraschenderweise war diese Veränderung nach Solubilisierung und Immunpräzipitation nicht auffindbar: im anschließenden Westernblot imponierten behandelte und unbehandelte Rezeptoren in vergleichbarer Menge und mit ähnlichem Bandenmuster und entsprachen im Wesentlichen dem des unreifen Rezeptors.

Rezeptorkonstrukte ohne c-terminales GFP konnten auf Grund des geringen Expressionsniveaus nur mittels Antikörperfärbung und FACS (Lokalisation an der Zelloberfläche) bzw. nach Immunpräzipitation im Westernblot dargestellt werden. Ähnlich wie bei den GFP-fusionierten Rezeptoren konnte nach Immunpräzipitation kein stabilisierender Effekt durch das Pharmakochaperon festgestellt werden, obwohl die Oberflächenexpression der Mutanten T273R und S318I ohne GFP-Fusion um zumindest das Fünffache durch SR121463 bzw. Tolvaptan gesteigert worden war.

Weshalb nach Immunpräzipitation keine Zunahme bzw. Reifung der Rezeptoren zu detektieren war, blieb unklar. Dieser Befund war unabhängig vom Grad der Rezeptorexpression (niedrig in stabilen Linien vs. hoch nach transienter Transfektion) oder dem verwendeten Rezeptorkonstrukt (GFP-fusioniert oder nativer c-Terminus). Ich untersuchte, ob die Aktivität von

Matrixmetalloprotease in der Zellkultur die Dichte an extrazellulär exponiertem FLAG-Epitop verminderte. Inkubation der Zellen mit dem spezifischen Inhibitor GM6001 war aber ohne Effekt insbesondere auch dann, wenn gleichzeitig ein Rezeptorpharmakochaperon zugesetzt war.

Ferner führte ich Rezeptor-Immunpräzipitation in zwei verschiedenen Detergenzlösungen durch, nämlich Dodecylmaltosid oder Chaps. Beide werden üblicherweise zur Solubilisierung von Transmembranprotein verwendet, wenn das Ziel die Konservierung der Tertiärstruktur ist. Obwohl mein Befund daher gegen einen Unterschied zwischen Chaps und DDM spricht, kann ich nicht ausschließen, dass beide Detergenzien, Dodecylmaltosid und Chaps Quartärstruktur schonen, wenn diese durch eine innige Bindung zwischen Proteinpartnern stabilisiert wird. Ich gelange daher zu der spekulativen Schlussfolgerung, dass in den Immunpräzipitaten nur jene Rezeptoren zur Darstellung kamen, die sich bereitwillig aus der Zellmembran solubilisieren ließen, nicht hingegen jene, die zusätzlich durch Protein-Proteininteraktion in der Membran verankert waren. Als möglicher Partner und Anker kommt HSP90 infrage.

17-DMAG erhöht die Oberflächenexpression des V2R

Die Retention von fehlgefalteten Rezeptormutanten ist eine Funktion der zellulären Qualitätskontrolle. In der Literatur geht man davon aus, dass sich HSP90 an Faltung und Retention beteiligt. Ich untersuchte die Wirkung des Antibiotikums Geldanamycin, das an das Faltungschaperon HSP90 bindet und dessen ATP-abhängige Funktion hemmt. Geldanamycin wurde früher erfolgreich zur Steigerung der Oberflächenexpression des A_{2A}-Adenosinrezeptors [80] sowie der retinierten Deletionsmutante des CFTR (Cystische Fibrose Transmembranleitfähigkeitsregulator) ΔF508 eingesetzt [78][79].

Meine Daten zeigen, dass die Behandlung mit dem Geldanamycinderivat 17-DMAG auch die Oberflächenexpression des V2R um etwa den Faktor 1,5 bis 3 erhöhte. Die Steigerung betraf die mutanten Rezeptoren ebenso wie den Wildtyprezeptor und war unabhängig von der Wirkung der Pharmakochaperone. Zusammen eingesetzt steigerten 17-DMAG und der Pharmakochaperonligand die Oberflächenexpression mehr als jedes Agens für sich allein. DMAG führte allerdings nicht zur Sensitisierung des Pharmakochaperoneffekts und eignet sich daher rein theoretisch nicht, die Wirkstärke eines Pharmakochaperonliganden wie Tolvaptan zu erhöhen.

Durch Immunpräzipitation ließ sich eine Assoziation des Rezeptors mit dem Geldanamycinsubstrat HSP90 nachweisen und dies galt gleichermaßen für den wildtypischen und den mutanten Rezeptor. Zur Detektion setzte ich einen HSP90-Antikörper aus Kaninchen ein, weil der Maus anti-FLAG Antikörper, der zur Präzipitation des Rezeptors verwendet worden war, zu unvollständigem Zerfall (selbst gegenüber Hitze/SDS/DTT) neigte und eine immunreaktive Bande mit einer Größe von etwa 100kDa bildete. Durch diese Bande wäre HSP90 (α oder β) verdeckt worden bzw. die Detektion einer falsch-positiven Bande möglich gewesen.

Voraussetzung für den Nachweis der Assoziation mit HSP90 war, dass Zellen verwendet wurden, die akut mit dem Rezeptorkonstrukt transfiziert worden waren. Das Ergebnis bestand - selbst unter den denaturierenden Bedingungen der SDS-Gelelektrophorese - in immunreaktiven Banden von >250 kD, die einen Komplex von HSP90 und Rezeptor enthielten. Ich betrachte diese Banden, die sowohl für HSP90 als auch für den Rezeptor im Western positiv waren, als Beweis für meine Annahme, dass die Konformation des Proteinkomplexes ausgesprochen detergensresistent war.

Der immunpräzipitierte Rezeptor trat in meinen Versuchen daher in zweierlei Phänotypen im Westernblot in Erscheinung. Erstens als supramolekularer Proteinkomplex mit HSP90 (nach transienter Transfektion) und zweitens als Monomer (aus stabilen Linien), wobei HSP90 nur spurenweise im Kopräzipitat vorhanden war (siehe Abbildung 3.9.).

Ich vermaß daher HSP90 und assoziierte Kochaperone nach akuter Transfektion einerseits und in stabil exprimierenden Zelllinien andererseits. Erstens fand ich keine Regulation des HSP90-Expressionsniveaus. Hingegen waren zweitens die für die Phasen des HSP90-Aktivitätszyklus typischen Kochaperone unterschiedlich im HSP90 Präzipitat vorhanden. Nach akuter Transfektion gab es mehr HOP und HSP70 als in den Linien, das heißt, HSP90 verweilte eher in einem früheren „intermediate complex“ Stadium denn einer späten Phase seines Aktivitätszyklus [124]. Meiner Hypothese folgend sollte der HSP90- und HSP70-reiche Rezeptorkomplex daher für das supramolekulare Aggregat verantwortlich sein. In stabilen Linien war der Rezeptor-HSP90 Komplex nahezu nicht vorhanden oder so stabil verankert, dass er nicht für die Solubilisierung zur Verfügung stand. Auch diese Vermutung kann experimentell getestet werden.

Quellenverzeichnis

- [1] Venkatakrishnan AJ, Deupi X, Lebon G, Tate CG, Schertler GF, Babu MM. **Molecular signatures of G-protein-coupled receptors**. *Nature*. 2013 Feb 14;494(7436):185-94.
- [2] Oksche A, Rosenthal W. **The molecular basis of nephrogenic diabetes insipidus**. *J Mol Med (Berl)*. 1998 Apr;76(5):326-37.
- [3] Reiter E, Lefkowitz RJ. **GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling**. *Trends Endocrinol Metab*. 2006 May-Jun;17(4):159-65.
- [4] Peter J. Kennelly, PhD & Victor W. Rodwell, PhD **Harper's Illustrated Biochemistry, 29e > Chapter 5. Proteins: Higher Orders of Structure (Zugriff über Accessmedicine.com)**
- [5] Vogelbein, Susanne. **Das Qualitätskontrollsystem in post-ER Kompartimenten eukaryotischer Zellen am Beispiel des Vasopressin-V2-Rezeptors** Berlin 2009
- [6] Nanoff C, Freissmuth M (2012) **ER-bound steps in the biosynthesis of G protein-coupled receptors**. *GPCR Signalling Complexes - Synthesis, Assembly, Trafficking and Specificity* (eds: Dupré DJ, Hébert TE, Jockers R)
- [7] Sadeghi H, Birnbaumer M. **O-Glycosylation of the V2 vasopressin receptor**. *Glycobiology*. 1999 Jul;9(7):731-7.
- [8] Postina R, Ufer E, Pfeiffer R, Knoers NV, Fahrenholz F. **Misfolded vasopressin V2 receptors caused by extracellular point mutations entail congenital nephrogenic diabetes insipidus**. *Mol Cell Endocrinol*. 2000 Jun;164(1-2):31-9.
- [9] Macion-Dazard R, Callahan N, Xu Z, Wu N, Thibonnier M, Shoham M. **Mapping the binding site of six nonpeptide antagonists to the human V2-renal vasopressin receptor**. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 Feb;316(2):564-71.

- [10] Barak LS, Oakley RH, Laporte SA, Caron MG. **Constitutive arrestin-mediated desensitization of a human vasopressin receptor mutant associated with nephrogenic diabetes insipidus.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jan 2;98(1):93-8.
- [11] Barberis C, Mouillac B, Durroux T. **Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function.** J Endocrinol. 1998 Feb;156(2):223-9.
- [12] Bellot G, Granier S, Bourguet W, Seyer R, Rahmeh R, Mouillac B, Pascal R, Mendre C, Déméné H. **Structure of the third intracellular loop of the vasopressin V2 receptor and conformational changes upon binding to gC1qR.** J Mol Biol. 2009 May 8;388(3):491-507. doi: 10.1016/j.jmb.2009.02.065.
- [13] Bouley R, Sun TX, Chenard M, McLaughlin M, McKee M, Lin HY, Brown D, Ausiello DA. **Functional role of the NPxxY motif in internalization of the type 2 vasopressin receptor in LLC-PK1 cells.** Am J Physiol Cell Physiol. 2003 Oct;285(4):C750-62.
- [14] Hu M, Crawford SA, Henstridge DC, Ng IH, Boey EJ, Xu Y, Febbraio MA, Jans DA, Bogoyevitch MA. **p32 protein levels are integral to mitochondrial and endoplasmic reticulum morphology, cell metabolism and survival.** Biochem J. 2013 Aug 1;453(3):381-91.
- [15] Thielen A, Oueslati M, Hermosilla R, Krause G, Oksche A, Rosenthal W, Schülein R. **The hydrophobic amino acid residues in the membrane-proximal C tail of the G protein-coupled vasopressin V2 receptor are necessary for transport-competent receptor folding.** FEBS Lett. 2005 Sep 26;579(23):5227-35.
- [16] Schülein R, Hermosilla R, Oksche A, Dehe M, Wiesner B, Krause G, Rosenthal W. **A dileucine sequence and an upstream glutamate residue in the intracellular carboxyl terminus of the vasopressin V2 receptor are essential for cell surface transport in COS.M6 cells.** Mol Pharmacol. 1998 Sep;54(3):525-35.
- [17] Nickols HH, Shah VN, Chazin WJ, Limbird LE. **Calmodulin interacts with the V2 vasopressin receptor: elimination of binding to the C terminus also eliminates arginine vasopressin-stimulated elevation of intracellular calcium.** J Biol Chem. 2004 Nov 5;279(45):46969-80.

- [18] Erlenbach I, Wess J. **Molecular basis of V2 vasopressin receptor/Gs coupling selectivity.** J Biol Chem. 1998 Oct 9;273(41):26549-58.
- [19] Krause G, Hermosilla R, Oksche A, Rutz C, Rosenthal W, Schülein R. **Molecular and conformational features of a transport-relevant domain in the C-terminal tail of the vasopressin V(2) receptor.** Mol Pharmacol. 2000 Feb;57(2):232-42.
- [20] Innamorati G, Le Gouill C, Balamotis M, Birnbaumer M. **The long and the short cycle. Alternative intracellular routes for trafficking of G-protein-coupled receptors.** J Biol Chem. 2001 Apr 20;276(16):13096-103.
- [21] Berrada K, Plesnicher CL, Luo X, Thibonnier M. **Dynamic interaction of human vasopressin/oxytocin receptor subtypes with G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C after agonist stimulation.** J Biol Chem. 2000 Sep 1;275(35):27229-37.
- [22] Geo. F. Brooks, Karen C. Carroll, Janet S. Butel, Stephen A. Morse, Timothy A. Mietzner **Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 26e Chapter 7, Microbial Genetics (Zugriff über Accessmedicine.com)**
- [23] Schülein R, Zühlke K, Oksche A, Hermosilla R, Furkert J, Rosenthal W. **The role of conserved extracellular cysteine residues in vasopressin V2 receptor function and properties of two naturally occurring mutant receptors with additional extracellular cysteine residues.** FEBS Lett. 2000 Jan 21;466(1):101-6.
- [24] Faerch M, Christensen JH, Rittig S, Johansson JO, Gregersen N, de Zegher F, Corydon TJ. **Diverse vasopressin V2 receptor functionality underlying partial congenital nephrogenic diabetes insipidus.** Am J Physiol Renal Physiol. 2009 Dec;297(6):F1518-25. doi: 10.1152/ajprenal.00331.2009.
- [25] Alberts, B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P **Molecular biology of the cell, 5 Edition**
- [26] Marshall A. Lichtman, Thomas J. Kipps, Uri Seligsohn, Kenneth Kaushansky, Josef T. **Prchal Williams Hematology, 8e > Chapter 3. Examination of the Marrow (Daniel H. Ryan)**

- [27] Robert K. Murray, David A. Bender, Kathleen M. Botham, Peter J. Kennelly, Victor W. Rodwell, P. Anthony Weil **Harper's Illustrated Biochemistry, 29e > Chapter 47. Glycoproteins (Zugriff über Accessmedicine.com)**
- [28] Kim YE, Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M, Hartl FU. **Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis.** *Annu Rev Biochem.* 2013;82:323-55. doi: 10.1146/annurev-biochem-060208-092442.
- [29] Anelli T, Ceppi S, Bergamelli L, Cortini M, Masciarelli S, Valetti C, Sitia R. **Sequential steps and checkpoints in the early exocytic compartment during secretory IgM biogenesis.** *EMBO J.* 2007 Oct 3;26(19):4177-88.
- [30] Farhan H, Reiterer V, Kriz A, Hauri HP, Pavelka M, Sitte HH, Freissmuth M. **Signal-dependent export of GABA transporter 1 from the ER-Golgi intermediate compartment is specified by a C-terminal motif.** *J Cell Sci.* 2008 Mar 15;121(Pt 6):753-61. doi: 10.1242/jcs.017681.
- [31] Oueslati M, Hermosilla R, Schönenberger E, Oorschot V, Beyermann M, Wiesner B, Schmidt A, Klumperman J, Rosenthal W, Schüle R. **Rescue of a nephrogenic diabetes insipidus-causing vasopressin V2 receptor mutant by cell-penetrating peptides.** *J Biol Chem.* 2007 Jul 13;282(28):20676-85.
- [32] <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000126895> (Letzter Zugriff: 15.10.2013)
- [33] Araki K, Nagata K. **Protein folding and quality control in the ER.** *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Nov 1;3(11):a007526.
- [34] Braakman I, Bulleid NJ. **Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum.** *Annu Rev Biochem.* 2011;80:71-99.
- [35] Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohászka Z, Nardai G. **The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review.** *Pharmacol Ther.* 1998 Aug;79(2):129-68.

- [36] Ron D, Walter P. **Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Jul;8(7):519-29.
- [37] Walter P, Ron D. **The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation.** *Science.* 2011 Nov 25;334(6059):1081-6.
- [38] Morello JP, Salahpour A, Laperrière A, Bernier V, Arthus MF, Lonergan M, Petäjä-Repo U, Angers S, Morin D, Bichet DG, Bouvier M. **Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants.** *J Clin Invest.* 2000 Apr;105(7):887-95.
- [39] Maya-Núñez G., Ulloa-Aguirre A., Janovick, JA, Conn PM (2012) **Pharmacological chaperones correct misfolded GPCRs and rescue function: protein trafficking as a therapeutic target.** In: *GPCR Signalling Complexes - Synthesis, Assembly, Trafficking and Specificity* (editors: Dupré DJ, Hébert TE, Jockers R)
- [40] Robben JH, Sze M, Knoers NV, Deen PM. **Functional rescue of vasopressin V2 receptor mutants in MDCK cells by pharmacochaperones: relevance to therapy of nephrogenic diabetes insipidus.** *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007 Jan;292(1):F253-60.
- [41] Wess J, Han SJ, Kim SK, Jacobson KA, Li JH. **Conformational changes involved in G-protein-coupled-receptor activation.** *Trends Pharmacol Sci.* 2008 Dec;29(12):616-25. doi: 10.1016/j.tips.2008.08.006.
- [42] Bernard Mouillac, Daniel Bichet, Michel Bouvier, Bice Chini, Gerald Gimpl, Gilles Guillon, Tadashi Kimura, Mark Knepper, Stephen Lolait, Maurice Manning, Claudine Serradeil-Le Gal, Melvyn Soloff, Joseph G. Verbalis, Mark Wheatley, Hans H. Zingg. **Vasopressin and oxytocin receptors, introductory chapter.** Last modified on 06/06/2012. Accessed on 08/04/2013. IUPHAR database (IUPHAR-DB), <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyIntroductionForward?familyId=66>.
- [43] Latek D, Modzelewska A, Trzaskowski B, Palczewski K, Filipek S. **G protein-coupled receptors--recent advances.** *Acta Biochim Pol.* 2012;59(4):515-29.

- [44] Brown D, Bouley R, Păunescu TG, Breton S, Lu HA. **New insights into the dynamic regulation of water and acid-base balance by renal epithelial cells.** *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012 May 15;302(10):C1421-33. doi: 10.1152/ajpcell.00085.2012.
- [45] Laurence L. Brunton, Bruce A. Chabner, Björn C. Knollmann **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12e >Chapter 3. Pharmacodynamics: Molecular Mechanisms of Drug Action**
- [46] Narayan G, Mandal SN. **Vasopressin receptor antagonists and their role in clinical medicine.** *Indian J Endocrinol Metab.* 2012 Mar;16(2):183-91.
- [47] Iannucci NB, Ripoll GV, Garona J, Cascone O, Ciccia GN, Gomez DE, Alonso DF. **Antiproliferative effect of 1-deamino-8-D-arginine vasopressin analogs on human breast cancer cells.** *Future Med Chem.* 2011 Dec;3(16):1987-93.
- [48] Péqueux C, Keegan BP, Hagelstein MT, Geenen V, Legros JJ, North WG. **Oxytocin- and vasopressin-induced growth of human small-cell lung cancer is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway.** *Endocr Relat Cancer.* 2004 Dec;11(4):871-85.
- [49] North WG, Fay MJ, Du J. **MCF-7 breast cancer cells express normal forms of all vasopressin receptors plus an abnormal V2R.** *Peptides.* 1999;20(7):837-42.
- [50] Gary B. Willars, R.A. John Challiss **Receptor Signal Transduction Protocols, Second Edition**
- [51] 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 Mar;153 Suppl 1:S358-66.
- [52] Piedagnel R, Tiger Y, Lelongt B, Ronco PM. **Urokinase (u-PA) is produced by collecting duct principal cells and is post-transcriptionally regulated by SV40 large-T, arginine vasopressin, and epidermal growth factor.** *J Cell Physiol.* 2006 Feb;206(2):394-401.

[53] Rea VE, Lavecchia A, Di Giovanni C, Rossi FW, Gorrasi A, Pesapane A, de Paulis A, Ragno P, Montuori N. **Discovery of new small molecules targeting the vitronectin-binding site of the urokinase receptor that block cancer cell invasion.** Mol Cancer Ther. 2013 Aug;12(8):1402-16.

[54] Zou Z, Zeng F, Xu W, Wang C, Ke Z, Wang QJ, Deng F. **PKD2 and PKD3 promote prostate cancer cell invasion by modulating NF- κ B- and HDAC1-mediated expression and activation of uPA.** J Cell Sci. 2012 Oct 15;125(Pt 20):4800-11.

[55] Sadeghi HM, Innamorati G, Dagarag M, Birnbaumer M. **Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor.** Mol Pharmacol. 1997 Jul;52(1):21-9.

[56] Blaskovic S, Blanc M, van der Goot FG. **What does S-palmitoylation do to membrane proteins?** FEBS J. 2013 Jun;280(12):2766-74.

[57] Edited by Ravi Iyengar, **Heterotrimeric G-Protein Effectors** Volume 238, (1994)

[58] Bernard Mouillac, Daniel Bichet, Michel Bouvier, Bice Chini, Gerald Gimpl, Gilles Guillon, Tadashi Kimura, Mark Knepper, Stephen Lolait, Maurice Manning, Claudine Serradeil-Le Gal, Melvyn Soloff, Joseph G. Verbalis, Mark Wheatley, Hans H. Zingg. **Vasopressin and oxytocin receptors.** Last modified on 13/03/2013. Accessed on 01/09/2013. IUPHAR database (IUPHAR-DB), <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyMenuForward?familyId=66>.

[59] Oksche A, Leder G, Valet S, Platzner M, Hasse K, Geist S, Krause G, Rosenthal A, Rosenthal W. **Variant amino acids in the extracellular loops of murine and human vasopressin V2 receptors account for differences in cell surface expression and ligand affinity.** Mol Endocrinol. 2002 Apr;16(4):799-813.

[60] Dembitzer FR, Kinoshita Y, Burstein D, Phelps RG, Beasley MB, Garcia R, Harpaz N, Jaffer S, Thung SN, Unger PD, Ghebrehiwet B, Peerschke EI. **gC1qR expression in normal and pathologic human tissues: differential expression in tissues of epithelial and mesenchymal origin.** J Histochem Cytochem. 2012 Jun;60(6):467-74.

- [61] Dupré DJ, Hammad MM, Holland P, Wertman J (2012) **Role of Chaperones in G Protein Coupled Receptor Signaling Complex Assembly** GPCR Signalling Complexes - Synthesis, Assembly, Trafficking and Specificity (eds: Dupré DJ, Hébert TE, Jockers R)
- [62] Terada K, Manchikalapudi P, Noiva R, Jauregui HO, Stockert RJ, Schilsky ML. **Secretion, surface localization, turnover, and steady state expression of protein disulfide isomerase in rat hepatocytes.** J Biol Chem. 1995 Sep 1;270(35):20410-6.
- [63] Liu T, Daniels CK, Cao S. **Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential.** Pharmacol Ther. 2012 Dec;136(3):354-74.
- [64] El-Mowafy AM, Alkhalaf M **Resveratrol activates adenylyl-cyclase in human breast cancer cells: a novel, estrogen receptor-independent cytostatic mechanism.** Carcinogenesis. 2003 May;24(5):869-73.
- [65] Sambrook J, Russel DW **Molecular Cloning - a laboratory manual**, 3E 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- [66] <http://www.uniprot.org/uniprot/P30518> **P30518** (V2R_HUMAN) Reviewed, UniProtKB/Swiss-Prot Last modified September 18, 2013. Version 147.
- [67] Qiu XB, Shao YM, Miao S, Wang L. **The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones.** Cell Mol Life Sci. 2006 Nov;63(22):2560-70.
- [68] Ye S, Zaitseva E, Caltabiano G, Schertler GF, Sakmar TP, Deupi X, Vogel R. **Tracking G-protein-coupled receptor activation using genetically encoded infrared probes.** Nature. 2010 Apr 29;464(7293):1386-9.
- [69] Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB. **The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints.** Mol Pharmacol. 2003 Jun;63(6):1256-72.

[70] Shim JY. **Transmembrane helical domain of the cannabinoid CB1 receptor.** *Biophys J.* 2009 Apr 22;96(8):3251-62.

[71] Park SH, Das BB, Casagrande F, Tian Y, Nothnagel HJ, Chu M, Kiefer H, Maier K, De Angelis AA, Marassi FM, Opella SJ. **Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers.** *Nature.* 2012 Nov 29;491(7426):779-83

[72] Younger JM, Chen L, Ren HY, Rosser MF, Turnbull EL, Fan CY, Patterson C, Cyr DM. **Sequential quality-control checkpoints triage misfolded cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.** *Cell.* 2006 Aug 11;126(3):571-82.

[73] Okiyoneda T, Barrière H, Bagdány M, Rabeh WM, Du K, Höhfeld J, Young JC, Lukacs GL. **Peripheral protein quality control removes unfolded CFTR from the plasma membrane.** *Science.* 2010 Aug 13;329(5993):805-10.

[74] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/> (Zugriff: 5.11.2013)

[75] <http://mmrc.caltech.edu/FTIR/FTIRintro.pdf> (Zugriff: 6.11.2013)

[76] Brydon L, Roka F, Petit L, de Coppet P, Tissot M, Barrett P, Morgan PJ, Nanoff C, Strosberg AD, Jockers R. **Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins.** *Mol Endocrinol.* 1999 Dec;13(12):2025-38.

[77] Schülein R, Liebenhoff U, Müller H, Birnbaumer M, Rosenthal W. **Properties of the human arginine vasopressin V2 receptor after site-directed mutagenesis of its putative palmitoylation site.** *Biochem J.* 1996 Jan 15;313 (Pt 2):611-6.

[78] Marozkina NV, Yemen S, Borowitz M, Liu L, Plapp M, Sun F, Islam R, Erdmann-Gilmore P, Townsend RR, Lichti CF, Mantri S, Clapp PW, Randell SH, Gaston B, Zaman K. **Hsp 70/Hsp 90 organizing protein as a nitrosylation target in cystic fibrosis therapy.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jun 22;107(25):11393-8.

- [79] Fuller W, Cuthbert AW. **Post-translational disruption of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-molecular chaperone complex with geldanamycin stabilizes delta F508 CFTR in the rabbit reticulocyte lysate.** J Biol Chem. 2000 Dec 1;275(48):37462-8.
- [80] Bergmayr C, Thurner P, Keuerleber S, Kudlacek O, Nanoff C, Freissmuth M, Gruber CW. **Recruitment of a cytoplasmic chaperone relay by the A2A adenosine receptor.** J Biol Chem. 2013 Oct 4;288(40):28831-44
- [81] Luttrell LM, Gesty-Palmer D. **Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling.** Pharmacol Rev. 2010 Jun;62(2):305-30.
- [82] Gader AM, da Costa J, Cash JD. **A new vasopressin analogue and fibrinolysis.** Lancet. 1973 Dec 22;2(7843):1417-8. PubMed PMID: 4128727
- [83] Ludlam CA, Peake IR, Allen N, Davies BL, Furlong RA, Bloom AL. **Factor VII and fibrinolytic response to deamino-8-D-arginine vasopressin in normal subjects and dissociate response in some patients with haemophilia and von Willebrand's disease.** Br J Haematol. 1980 Jul;45(3):499-511
- [84] Erlenbach I, Kostenis E, Schmidt C, Serradeil-Le Gal C, Raufaste D, Dumont ME, Pausch MH, Wess J. **Single amino acid substitutions and deletions that alter the G protein coupling properties of the V2 vasopressin receptor identified in yeast by receptor random mutagenesis.** J Biol Chem. 2001 Aug 3;276(31):29382-92.
- [85] Irannejad R, Tomshine JC, Tomshine JR, Chevalier M, Mahoney JP, Steyaert J, Rasmussen SG, Sunahara RK, El-Samad H, Huang B, von Zastrow M. **Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes.** Nature. 2013 Mar 28;495(7442):534-8.
- [86] Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, Kirchhausen T. **Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin.** Dev Cell. 2006 Jun;10(6):839-50.

- [87] Tang H, Nishishita T, Fitzgerald T, Landon EJ, Inagami T. **Inhibition of AT1 receptor internalization by concanavalin A blocks angiotensin II-induced ERK activation in vascular smooth muscle cells. Involvement of epidermal growth factor receptor proteolysis but not AT1 receptor internalization.** J Biol Chem. 2000 May 5;275(18):13420-6.
- [88] Gray JA, Sheffler DJ, Bhatnagar A, Woods JA, Hufeisen SJ, Benovic JL, Roth BL. **Cell-type specific effects of endocytosis inhibitors on 5-hydroxytryptamine(2A) receptor desensitization and resensitization reveal an arrestin-, GRK2-, and GRK5-independent mode of regulation in human embryonic kidney 293 cells.** Mol Pharmacol. 2001 Nov;60(5):1020-30.
- [89] Boehm S, Huck S, Motejlek A, Drobny H, Singer EA, Freissmuth M. **Cholera toxin induces cyclic AMP-independent down-regulation of Gs alpha and sensitization of alpha 2-autoreceptors in chick sympathetic neurons.** J Neurochem. 1996 Mar;66(3):1019-26.
- [90] Defer N, Best-Belpomme M, Hanoune J. **Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase.** Am J Physiol Renal Physiol. 2000 Sep;279(3):F400-16. Review.
- [91] Sanchez J, Holmgren J. **Cholera toxin - a foe & a friend.** Indian J Med Res. 2011 Feb;133:153-63.
- [92] Lin YF, Jan YN, Jan LY. **Regulation of ATP-sensitive potassium channel function by protein kinase A-mediated phosphorylation in transfected HEK293 cells.** EMBO J. 2000 Mar 1;19(5):942-55.
- [93] Gaglio P, Marfo K, Chiodo J 3rd. **Hyponatremia in cirrhosis and end-stage liver disease: treatment with the vasopressin V₂-receptor antagonist tolvaptan.** Dig Dis Sci. 2012 Nov;57(11):2774-85.
- [94] Esposito P, Piotti G, Bianzina S, Malul Y, Dal Canton A. **The syndrome of inappropriate antidiuresis: pathophysiology, clinical management and new therapeutic options.** Nephron Clin Pract. 2011;119(1):c62-73; discussion c73.

- [95] Peri A. **Clinical review: the use of vaptans in clinical endocrinology.** *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Apr;98(4):1321-32.
- [96] Papadopoulos MC, Verkman AS. **Aquaporin water channels in the nervous system.** *Nat Rev Neurosci.* 2013 Apr;14(4):265-77.
- [97] Schönthal AH. **Endoplasmic Reticulum Stress: Its Role in Disease and Novel Prospects for Therapy.** *Scientifica (Cairo).* 2012; 2012:857516.
- [98] Midgley R, Moffat K, Berryman S, Hawes P, Simpson J, Fullen D, Stephens DJ, Burman A, Jackson T. **A role for endoplasmic reticulum exit sites in foot-and-mouth disease virus infection.** *J Gen Virol.* 2013 Dec;94 Pt 12:2636-46.
- [99] Charest PG, Oligny-Longpré G, Bonin H, Azzi M, Bouvier M. **The V2 vasopressin receptor stimulates ERK1/2 activity independently of heterotrimeric G protein signalling.** *Cell Signal.* 2007 Jan;19(1):32-41.
- [100] Jordan M, Wurm F. **Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate.** *Methods.* 2004 Jun;33(2):136-43.
- [101] Wüller S, Wiesner B, Löffler A, Furkert J, Krause G, Hermosilla R, Schaefer M, Schüle R, Rosenthal W, Oksche A. **Pharmacochaperones post-translationally enhance cell surface expression by increasing conformational stability of wild-type and mutant vasopressin V2 receptors.** *J Biol Chem.* 2004 Nov 5;279(45):47254-63.
- [102] Kruse AC, Ring AM, Manglik A, Hu J, Hu K, Eitel K, Hübner H, Pardon E, Valant C, Sexton PM, Christopoulos A, Felder CC, Gmeiner P, Steyaert J, Weis WI, Garcia KC, Wess J, Kobilka BK. **Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor.** *Nature.* 2013 Dec 5;504(7478):101-6
- [103] Málaga-Diéguez L, Yang Q, Bauer J, Pankevych H, Freissmuth M, Nanoff C. **Pharmacochaperoning of the A1 adenosine receptor is contingent on the endoplasmic reticulum.** *Mol Pharmacol.* 2010 Jun;77(6):940-52

- [104] Charest PG, Bouvier M. **Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor carboxyl tail enhances beta-arrestin recruitment leading to efficient receptor endocytosis and ERK1/2 activation.** J Biol Chem. 2003 Oct 17;278(42):41541-51
- [105] Keuerleber S, Thurner P, Gruber CW, Zezula J, Freissmuth M. **Reengineering the collision coupling and diffusion mode of the A2A-adenosine receptor: palmitoylation in helix 8 relieves confinement.** J Biol Chem. 2012 Dec 7;287(50):42104-18
- [106] Thielen A, Oueslati M, Hermosilla R, Krause G, Oksche A, Rosenthal W, Schüle R. **The hydrophobic amino acid residues in the membrane-proximal C tail of the G protein-coupled vasopressin V2 receptor are necessary for transport-competent receptor folding.** FEBS Lett. 2005 Sep 26;579(23):5227-35.
- [107] K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C.A. Behnke, H. Motoshima, B.A. Fox, I. Le Trong, D.C. Teller, T. Okada, R.E. Stenkamp, M. Yamamoto, M. Miyano **Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor.** Science, 289 (2000), pp. 739–745
- [108] Salomon Y. **Cellular responsiveness to hormones and neurotransmitters: conversion of [3H]adenine to [3H]cAMP in cell monolayers, cell suspensions, and tissue slices.** Methods Enzymol. 1991;195:22-8
- [109] Snapp EL, Hegde RS, Francolini M, Lombardo F, Colombo S, Pedrazzini E, Borgese N, Lippincott-Schwartz J. **Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions.** J Cell Biol. 2003 Oct 27;163(2):257-69.
- [110] Korkhov VM, Zuber B. **Direct observation of molecular arrays in the organized smooth endoplasmic reticulum.** BMC Cell Biol. 2009 Aug 24;10:59.
- [111] <http://amrita.vlab.co.in/?sub=3&brch=186&sim=321&cnt=1> (letzter Zugriff: 16.2.2014)
- [112] Eckl JM, Richter K. **Functions of the Hsp90 chaperone system: lifting client proteins to new heights.** Int J Biochem Mol Biol. 2013 Dec 15;4(4):157-165.

- [113] Yoshida H, Oku M, Suzuki M, Mori K. **pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response.** *J Cell Biol.* 2006 Feb 13;172(4):565-75.
- [114] Kaufmann JE, Vischer UM. **Cellular mechanisms of the hemostatic effects of desmopressin (DDAVP).** *J Thromb Haemost.* 2003 Apr;1(4):682-9.
- [115] Reiterer V, Fey D, Kolch W, Kholodenko BN, Farhan H. **Pseudophosphatase STYX modulates cell-fate decisions and cell migration by spatiotemporal regulation of ERK1/2.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Jul 30;110(31):E2934-43.
- [116] Weiss HJ, Sussman II, Hoyer LW. **Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. Studies on posttransfusion and dissociated factor VIII and in patients with von Willebrand's disease.** *J Clin Invest.* 1977 Aug;60(2):390-404.
- [117] Lillicrap D. **von Willebrand disease: advances in pathogenetic understanding, diagnosis, and therapy.** *Blood.* 2013 Nov 28;122(23):3735-40.
- [118] Schuck S, Prinz WA, Thorn KS, Voss C, Walter P. **Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response.** *J Cell Biol.* 2009 Nov 16;187(4):525-36.
- [119] Kim HR, Kang HS, Kim HD. **Geldanamycin induces heat shock protein expression through activation of HSF1 in K562 erythroleukemic cells.** *IUBMB Life.* 1999 Oct;48(4):429-33.
- [120] McLean AJ, Milligan G. **Ligand regulation of green fluorescent protein-tagged forms of the human beta(1)- and beta(2)-adrenoceptors; comparisons with the unmodified receptors.** *Br J Pharmacol.* 2000 Aug;130(8):1825-32.
- [121] Hsieh JM, Besserer GM, Madej MG, Bui HQ, Kwon S, Abramson J. **Bridging the gap: a GFP-based strategy for overexpression and purification of membrane proteins with intra and extracellular C-termini.** *Protein Sci.* 2010 Apr;19(4):868-80.

- [122] Korepanova A, Moore JD, Nguyen HB, Hua Y, Cross TA, Gao F (2007) **Expression of membrane proteins from Mycobacterium tuberculosis in Escherichia coli as fusions with maltose binding protein.** Protein Expr Purif 53:24–30.
- [123] Mateus C, Avery SV. **Destabilized green fluorescent protein for monitoring dynamic changes in yeast gene expression with flow cytometry.** Yeast. 2000 Oct;16(14):1313-23.
- [124] Li J, Buchner J. **Structure, function and regulation of the hsp90 machinery.** Biomed J. 2013 May-Jun;36(3):106-17.

Anhang

Lebenslauf

Florian Puhm, BSc

Ausbildung:

2011 - 2014	Master of Science in Molekulare Mikrobiologie und Immunbiologie auf der Universität Wien
Sept 2011 – Jan 2012	Auslandssemester, Erasmusprogramm, Universität Kopenhagen
2007 – 2011	Bachelor of Science in Biologie auf der Universität Wien
2006	Matura, Naturwissenschaftliches Realgymnasium BRG13, 1130 Wien, Österreich

Forschungserfahrung:

Sept 2012 - aktuell	Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Christian Nanoff, Zentrum für Physiologie und Pharmakologie, Institut für Pharmakologie, medizinische Universität Wien
März – Mai 2012	Forschungspraktikum in der Arbeitsgruppe von Prof. Christian Nanoff, Zentrum für Physiologie und Pharmakologie, Institut für Pharmakologie, medizinische Universität Wien
Nov 2011 – Jan 2012	Forschungspraktikum im Labor von Prof. Qunxin She, Danish Archaea Centre, Ole Maaløes Vej 5 2200 København. N
Sept 2011 – Nov 2011	Forschungspraktikum im Labor von Prof. Cornelis Grimmelikhuijzen, und Prof. Frank Hauser, Centre of Functional and Comparative Insect Genomics, Universitetsparken 15 2100 København Ø
Juli 2011	Forschungspraktikum in der Arbeitsgruppe von Prof. Christian Nanoff, Zentrum für Physiologie und Pharmakologie, Institut für Pharmakologie, medizinische Universität Wien

Tutorium

März – Juli 2012	Kurs: “Biochemisches Praktikum für Chemiker” auf der Universität Wien
------------------	---

Wissenschaftliche Publikation:

Collin C, Hauser F, Gonzalez de Valdivia E, Li S, Reisenberger J, Carlsen EM, Khan Z, Hansen NO, **Puhm F**, Søndergaard L, Niemiec J, Heninger M, Ren GR, Grimmelikhuijzen CJ. (2013) Two types of muscarinic acetylcholine receptors in *Drosophila* and other arthropods. *Cell Mol Life Sci.* 70: 3231-42

Referenzen:

- Prof. Christian Nanoff, Institut für Pharmakologie, Medizinische Universität Wien
- Prof. Michael Freissmuth, Institut für Pharmakologie, Medizinische Universität Wien
- Prof. Frank Hauser, Centre of Functional and Comparative Insect Genomics, Universität Kopenhagen
- Prof. Cornelis Grimmelikhuijzen, Centre of Functional and Comparative Insect Genomics, Universität Kopenhagen
- Prof. Qunxin She, Danish Archaea Centre, University of Copenhagen

Zusammenfassung

„Lesefehlermutationen“ des *AVPR2*-Gens, welches für den Vasopressin V2 Rezeptor kodiert, sind die Hauptursache für den angeborenen X-chromosomalen Diabetes Insipidus, der sich durch Vasopressinresistenz der Nieren auszeichnet. Die Konsequenz ist eingeschränkte Harnkonzentrierung und daher eine gestörte Wasserhomöostase. In den meisten Fällen wird die Rezeptorstruktur durch die Mutation destabilisiert. Die zelluläre Qualitätskontrolle erkennt diese Rezeptormutanten als fehlgefaltet und retiniert sie intrazellulär. Diese Retention wird durch Proteine aus dem Spektrum der Chaperon/HSP/Lektinmoleküle vermittelt. Durch den Einsatz synthetischer V2R-Liganden kann die Oberflächenexpression der Rezeptormutanten erhöht werden.

In meiner Arbeit untersuchte ich V2R-Konstrukte mit „Lesefehlermutationen“, die zum Austausch einzelner Aminosäuren führten und durch Transfektion in kultivierbaren Zelllinien zur Expression gebracht wurden. Der Lesefehler betraf in allen untersuchten Konstrukten die kodierende Sequenz der Transmembrandomäne obzwar an unterschiedlichen Segmenten. Jede dieser Mutationen führte zur primären, intrazellulären Lokalisation des Rezeptors. Mit Hilfe hochaffiner, membranpermeierender V2R-Liganden (Tolvaptan und SR121463) wurden Mutanten ausgewählt, die durch Behandlung mit den Liganden an die Zelloberfläche transferierten. Die Veränderung in der Oberflächendichte schätzte ich nach Antikörperfärbung des Rezeptors mittels FACS. Meine Daten zeigen, dass der Pharmakochaperoneffekt abhängig von der Position der Mutation war; von sieben Mutanten reagierten nur jene mit Lesefehlermutationen in Transmembranhelices 6 (T273R) bzw. 7 (S318I) auf die Behandlung mit Ligand. Die apparente Affinität der Liganden für die Rezeptorfaltungsintermediate ($\sim 0,3 - 3 \mu\text{M}$) lag Größenordnungen unter jener für den Wildtyprezeptor ($\sim 0,5 \text{ nM}$).

Vermutlich kam ein Teil des Pharmakochaperoneffekts nach Inkubation mit Ligand durch Stabilisierung des Rezeptors zustande. Der Pharmakochaperoneffekt gestattete, dass die mutanten Rezeptoren an Menge zunahmen und reiften. Analyse GFP-fusionierter Rezeptorkonstrukte auf dem Westernblot zeigte ein im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen ein verändertes Bandenmuster und stärkere Banden. C-terminale Fusion an grün-fluoreszierendes Protein (GFP) führte ebenfalls zur Stabilisierung des Rezeptorpolypeptids (gegenüber Degradation). Wenn die Expression von Rezeptorkonstrukten mit und ohne GFP miteinander verglichen wurde, fand ich eine beträchtliche Überexpression des Fusionskonstrukts

im Vergleich zum unfusionierten Rezeptor. Die Expressionszunahme war zumindest zwanzigfach. Der fusionierte Rezeptor war im Gegensatz zu unfusioniertem mit nativen Carboxyterminus geeignet, eine Wiederherstellung der Rezeptorfunktion nach Pharmakochaperonbehandlung zu demonstrieren.

Die Retention von fehlgefalteten Rezeptormutanten ist eine Funktion der zellulären Qualitätskontrolle. Ich untersuchte die Wirkung des Antibiotikums Geldanamycin, das an das Faltungschaperon HSP90 bindet und dessen ATP-abhängige Funktion hemmt. Meine Daten zeigen, dass die Behandlung mit dem Geldanamycinderivat 17-DMAG die Oberflächenexpression des V2R erhöhte. Der Effekt betraf die mutanten Rezeptoren ebenso wie den Wildtyprezeptor und war unabhängig von der Wirkung der Pharmakochaperone. Zusammen steigerten 17-DMAG und der Pharmakochaperonligand die Oberflächenexpression mehr als jedes für sich allein. Tatsächlich ließ sich nach Immunpräzipitation des Rezeptors eine Assoziation mit dem Geldanamycinsubstrat HSP90 nachweisen. Selbst unter den denaturierenden Bedingungen der SDS-Gelelektrophorese fand sich der Rezeptor mit HSP90 in einem supramolekularen Proteinkomplex wieder, und dies galt gleichermaßen für den wildtypischen und den mutanten Rezeptor. Die Rezeptor-HSP90 Aggregate traten lediglich akut nach Transfektion auf; aus stabil exprimierenden Zelllinien war mit dem Rezeptor HSP90 lediglich spurenweise und in nicht aggregierter Form zu immobilisieren. Ich untersuchte in Ansätzen den Grund für die der Transfektion folgende Aggregatbildung, die reproduzierbar mit einer exzessiven Überexpression des Rezeptorproteins einherging. Immunpräzipitation von HSP90 zeigte, dass sich nach Transfektion HSP90 mit HSP70 und HOP Komplexe bildeten. Die Assoziation mit HSP70 und HOP war im Vergleich zu den stabilen Linien und auch zu Kontrollzellen gesteigert. Meine Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass HSP90 als Messstelle für die Zelloberflächenexpression des V2-Rezeptors fungiert und seine Bindungsavidität durch Zellstress, wie eben bei Überladung des ER, enthemmt wird.

Abstract

Point mutations in the *AVPR2*-gene, which codes for the Vasopressin V2 Receptor (V2R), are the main cause of X-linked Diabetes Insipidus. The disease is characterized by resistance of the kidneys to Arginine-Vasopressin and, consequentially, failure to concentrate urine and loss of water. In most cases the protein structure of the V2R is destabilized by the mutation. Such receptor mutants are detected as misfolded and retained within the cell. Cellular quality control is most likely mediated by Chaperone/HSP/Lectin molecules. The surface expression of retained receptor mutants can be increased by treatment with synthetic, cell permeable V2R-antagonists, such as SR121463 and Tolvaptan in a process termed pharmacochaperoning.

I expressed in mammalian cells V2R mutants with single amino acid substitutions in their transmembrane segments. The point mutations were located in the coding sequence of the transmembrane domain, albeit each mutation in a different segment. Any of these mutations caused the primary intracellular location of the receptor. I estimated the surface density by FACS after antibody staining of the receptor. My data indicate that the pharmacochaperoning effect depends on the position of the mutation – out of 7 mutants tested only those with substitutions in the transmembrane helix 6 or 7, T273R or S318I respectively, were susceptible to ligand treatment. The affinity of the ligands for the immature folding intermediates ($\sim 0.3 - 3 \mu\text{M}$) was magnitudes lower than for the wild type ($\sim 0.5 \text{nM}$).

The pharmacochaperoning effect was accompanied by stabilisation of the receptor protein. By immunoblotting I showed that incubation with pharmacochaperones increased the stability and maturation of receptor constructs that were C-terminally fused to GFP. Comparison of the expression levels of receptor constructs with and without GFP showed that GFP-fusion itself had a stabilising effect on the receptor proteins. The increase in expression of the GFP-fused construct was at least 20-fold relative to the unfused receptor. Restored signalling was demonstrated after pharmacochaperone treatment of GFP-fused receptor mutants, not of those with unfused carboxyterminus.

The retention of incorrectly folded receptor mutants is a basic function of cellular quality control. I investigated whether the HSP90-inhibitor 17-DMAG increased surface expression of the receptor, both mutant and wild-type. 17-DMAG and pharmacochaperone ligands acted independently; a combination increased surface expression more than the individual agent alone.

Immunoprecipitation of the receptor revealed its association with HSP90. The receptor, mutant as well as wild-type, was found together with HSP90 in a supramolecular complex that persisted even under the denaturing conditions of SDS-PAGE. These receptor-HSP90 aggregates were detected only briefly after transfection. In cell lines stably expressing the receptor, only trace amounts of HSP90 were co-precipitated with the receptor and these were in monomeric, non-aggregated form. Aggregate formation correlated reproducibly with excessive overexpression of the receptor. I therefore characterized HSP90-associates shortly after transfection and compared them to those in stable lines. By precipitation of HSP90 from acutely transfected cells I showed that complexes with HSP70 and HOP were increased relative to the stable lines (and to the non-transfected controls). These data support the interpretation that HSP90 is a quality control checkpoint for the surface expression of the Vasopressin V2 Receptor

Abkürzungsliste

17-DMAG	17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin
273	V2R-Mutante, T273R
318	V2R-Mutante, S318I
APS	Ammoniumpersulfat
AQP	Aquaporin
ATF6	<i>activating transcription factor 6</i>
AUC	<i>area under curve</i>
AVP	8-Arginin-Vasopressin
BiP	<i>binding immunoglobulin protein</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
CFTR	Cystische Fibrose Transmembranleitfähigkeitsregulator
Chaps	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat
CHOP	<i>transcription factor C/EBP homologous protein</i>
CMV	Cytomegalievirus
COPI	Coat Protein Complex I
COPI, COPII	<i>coat-protein complex I/II</i>
ddAVP	1-Deamino-8-D-Arginin Vasopressin
DDM	<i>n-Dodecyl β-D-maltoside</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	<i>extra-cellular loop</i> , extrazelluläre Schleife
EndoH	Endoglykosidase H
ERAD	<i>ER-associated degradation</i> , ER-assoziierter Verdau

ERGIC	ER-Golgi intermediate compartement
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FLAG	Fusionspeptid (DYKDDDDK)
FLAG-V2R	V2R-Konstrukt mit n-terminalem FLAG
FLAG-V2R-XFP	V2R-Konstrukt mit n-terminalem FLAG und c-terminalem XFP (GFP, CFP oder YFP)
FSC	<i>foward-scatter</i>
FTIR Analyse	<i>fourier-transform infrared</i> Analyse
FVIII	Gerinnungsfaktor VIII
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GFP-freies Konstrukt	V2R-Konstrukt ohne c-terminal fusioniertes GFP
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
ICL	<i>intra-cellular loop</i> , intrazelluläre Schleife
IRE1	<i>inositol requiring enzyme 1</i>
NBD	Nukleotid-bindende Domäne
OSER-Körperchen	(<i>organized smooth ER</i>)-Körperchen
P/S	Penicilin/Streptomycin
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PERK	<i>PKR-like ER kinase</i>
SBD	Substrat-bindende Domäne
SR	SR121463, Satavaptan
SSC	<i>sideward-scatter</i>
TM	Transmembransegment
Tolv.	Tolvaptan, OPC-41061
uPA	Urokinase

UPR	<i>unfolded protein response</i>
V2R	Vasopressin 2 Rezeptor
V2R-XFP	V2R-Konstrukt mit c-terminalem XFP (GFP, CFP oder YFP)
VWF	von-Willebrand-Faktor
wt	Wildtyp
XBP1s	<i>X-box binding protein 1, spliced</i>
XBP1u	<i>X-box binding protein 1, unspliced</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>