

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Zusammenfassung | 1 |
| Summary | 3 |
| 1. Einleitung | 5 |
| 1.1 Proteinsynthese und intrazellulärer Transport von integralen Membranproteinen in eukaryotischen Zellen | 5 |
| 1.1.1 Das Endoplasmatische Retikulum..... | 6 |
| 1.1.1.1 Aufbau und Prozessierung von N-Glykanen..... | 8 |
| 1.1.1.2 Disulfidbrückenbildung..... | 9 |
| 1.1.2 Das ERGIC..... | 10 |
| 1.1.3 Der Golgi-Apparat..... | 13 |
| 1.2 Das Qualitätskontrollsystem in eukaryotischen Zellen | 13 |
| 1.2.1 Molekulare Chaperone | 15 |
| 1.2.1.1 Klassische Chaperone | 15 |
| 1.2.1.2 Lektinartige Chaperone | 17 |
| 1.2.2 Zusammenwirken der Kontrollmechanismen des Qualitätskontrollsystems im sekretorischen Weg | 19 |
| 1.3 Mutationen in den Genen von Membranproteinen können Fehlfaltungen und Erkrankungen auslösen | 20 |
| 1.3.1 Pharmakologische Strategien zur Faltungsverbesserung fehlgefalteter Rezeptoren | 21 |
| 1.4 Der Vasopressin-V ₂ -Rezeptor | 22 |
| 1.4.1 Physiologische Bedeutung des Vasopressin-V ₂ -Rezeptors..... | 24 |
| 1.4.2 Topologiemodelle für den Vasopressin-V ₂ -Rezeptor | 25 |
| 1.5 Zielsetzung dieser Arbeit | 29 |
| 2. Material und Methoden | 30 |
| 2.1 Materialien | 30 |
| 2.1.1 Reagenzien und Kits..... | 30 |
| 2.1.2 Technische Ausrüstung und Software | 32 |
| 2.1.3 Säugerzellkultur | 34 |
| 2.1.4 Antikörper | 34 |
| 2.1.5 Oligonukleotide | 35 |
| 2.1.6 Zelllinien | 37 |

| | |
|---|-----------|
| 2.2 Methoden..... | 38 |
| 2.2.1 Modellierung und Herstellung von artifiziellen Vasopressin-V ₂ -Rezeptor Mutanten | 38 |
| 2.2.2.1 Mutagenese und Primerherstellung..... | 40 |
| 2.2.2.2 Herstellung elektrokompenter Escherichia coli-Zellen (E. coli) Stamm DH5α | 41 |
| 2.2.2.3 Transformation des Mutagenese-Ansatzes in elektrokompente E. coli Stamm DH5α und Retransformation von Plasmid-DNA..... | 42 |
| 2.2.2.4 DNA – Aufreinigung..... | 42 |
| 2.2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren | 43 |
| 2.2.2.6 Analytischer Restriktionsverdau | 44 |
| 2.2.2.7 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese | 44 |
| 2.2.2.8 DNA-Sequenzierung | 45 |
| 2.2.3 Zellbiologische Methoden..... | 46 |
| 2.2.3.1 Säugerzellkultur | 46 |
| 2.2.3.2 Transiente Transfektion von HEK293 Zellen | 47 |
| 2.2.4 Mikroskopie lebender und fixierter HEK293 Zellen | 47 |
| 2.2.4.1 Immunfluoreszenz..... | 47 |
| 2.2.4.2 Mikroskopie lebender HEK293 Zellen | 49 |
| 2.2.4.3 Hochdurchsatz-Durchmusterung und automatische Mikroskopie: Entwicklung eines Testsystems zur Analyse des Einflusses kleiner Moleküle auf den intrazellulären Transport des V ₂ R | 49 |
| 2.2.5 Proteinbiochemische Methoden | 50 |
| 2.2.5.1 Immunpräzipitation und Co-Immunpräzipitation | 50 |
| 2.2.5.2 Verdau mit Endoglykosidasen | 52 |
| 2.2.5.3 Oberflächen – Biotinylierung..... | 53 |
| 2.2.6 Trennung und Detektion von Proteinen mittels SDS-PAGE und Westernblot..... | 54 |
| 2.2.6.1 Trennung von Proteinen mittels SDS-PAGE..... | 54 |
| 2.2.6.2 Western Blot..... | 55 |
| 2.2.6.3 Nachweis von Proteinen durch Immunfärbung..... | 56 |
| 2.2.6.4 Quantifizierung der Proteinbanden | 57 |
| 3. Ergebnisse | 59 |
| 3.1 Modellierung und Herstellung von artifiziellen V ₂ R-Mutanten | 59 |

| | |
|--|------------|
| 3.2 Charakterisierung der artifiziellen V ₂ R-Mutanten | 62 |
| 3.2.1 Lokalisation der GFP-markierten Rezeptoren in transient transfizierten HEK293 Zellen mit Hilfe <i>konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie</i> | 62 |
| 3.2.2 Oberflächenexpression des GFP-markierten V ₂ R und seiner Mutanten..... | 65 |
| 3.2.2.1 Modellierung von V ₂ R-Mutanten mit vom Schema abweichenden Retentionsmustern | 70 |
| 3.2.3 Analyse des Glykosylierungsstatus des GFP-markierten V ₂ R und seiner Mutanten | 75 |
| 3.2.4 Lokalisation transportdefekter Rezeptormutanten im ERGIC | 81 |
| 3.3.1 Co-Immunpräzipitation des V ₂ R und endogener Chaperone (Vorversuche)..... | 84 |
| 3.4 Aufbau eines Testsystems zur Identifizierung neuer pharmakologischer Chaperone mit Hilfe von Hochdurchsatz-Durchmusterungen und automatischer Mikroskopie..... | 89 |
| 3.4.1 Aufbau des Testsystems | 90 |
| | |
| 4. Diskussion | 97 |
| 4.1 Das Qualitätskontrollsystem in Säugerzellen..... | 97 |
| 4.2 Etablierung eines neuartigen Systems zur Durchmusterung von Substanzbibliotheken im Hochdurchsatzverfahren | 105 |
| | |
| 5. Literaturverzeichnis..... | 107 |
| | |
| 6. Anhang | 118 |
| 6.1 Detaillierte Ergebnisse | 118 |
| 6.2 Abkürzungen | 119 |
| 6.3 Aminosäuren und deren Abkürzungen..... | 129 |
| 6.4 Lebenslauf | 130 |
| 6.5 Publikationen und Vorträge | 132 |