

Zusammenfassung

Der Vasopressin- V_2 -Rezeptor wird in der basolateralen Membran der epithelialen Prinzipalzellen des Sammelrohrs der Niere exprimiert (Nonoguchi et al., 1995; Schülein et al., 1998). Die Bindung des Liganden 8-Arginin-Vasopressin (AVP) an den membranständigen Rezeptor bewirkt im Sammelrohr eine Stimulation des G_s /Adenylzyklasesystems und in der Folge eine regulierte Wasserrückresorption. Es sind zahlreiche Mutationen des V_2R beschrieben, die zu faltungs- bzw. transportdefekten Rezeptoren führen und dadurch eine gestörte Wasserregulation und nephrogenen Diabetes insipidus (NDI) verursachen (Oksche et al., 1998; Wüller et al., 2004). Diese fehlgefalteten Proteine werden im sekretorischen Weg von einem intrazellulären Qualitätskontrollsystem erkannt und retiniert. Es ist bekannt, dass die V_2R -Mutanten in unterschiedlichen intrazellulären Kompartimenten retiniert werden können (Hermosilla et al., 2004; Oueslati et al., 2007).

In dieser Arbeit sollte mit Hilfe zahlreicher artifizieller V_2R -Mutanten untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Lokalisation einer Mutation im Protein und dem Retentionsmechanismus gibt und welche Komponenten des Qualitätskontrollsystems an der Retention beteiligt sind. Im zweiten Teil der Arbeit sollte ein Assay etabliert werden, mit dem man im Hochdurchsatzverfahren Substanzen finden kann, die den intrazellulären Transport der Rezeptormutanten beeinflussen und damit zu einem funktionsfähigen Protein führen. Hierfür kommen sowohl sogenannte pharmakologische Chaperone als auch Inhibitoren der Qualitätskontrolle in Betracht.

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, einen Zusammenhang zwischen dem Ort der Mutation im Rezeptor und dem Retentionsmechanismus herzustellen. Mit Hilfe einer Vielzahl artifizieller Mutanten konnte gezeigt werden, dass Mutationen in den α -helikalen Domänen zu stärkeren Faltungsdefekten und damit zu einer ausschließlichen Retention im ER führen. Mutanten mit Defekten in den extra- und intrazellulären Domänen waren dagegen häufiger in der Lage, post-ER Kompartimente zu erreichen (Longitudinalhypothese). In Co-Immunexperimenten konnte die Interaktion der Komponenten des Qualitätskontrollsystems mit den V_2R -Mutanten analysiert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Bindung der Komponenten Hsp70, Calnexin und Derlin1 an die Rezeptormutanten entlang des Rezeptormoleküls ändert (Transversalhypothese).

Es ist weiterhin gelungen, ein Testsystem mit Hilfe des automatischen Mikroskops zu etablieren, mit dem der Einfluss von kleinen Substanzen auf den intrazellulären Transport fehlgefalteter Rezeptoren zukünftig untersucht werden kann. Mit diesem Testsystem kann erstmals direkt der Transport der Rezeptoren in lebenden HEK293 Zellen im Hochdurchsatzverfahren untersucht werden. Mit dieser Methode sollte es zukünftig möglich sein, nicht nur neue pharmakologische Chaperone und/oder Inhibitoren der Qualitätskontrolle für den V₂R zu finden, sondern auch für andere faltungsdefekte Membranproteine.