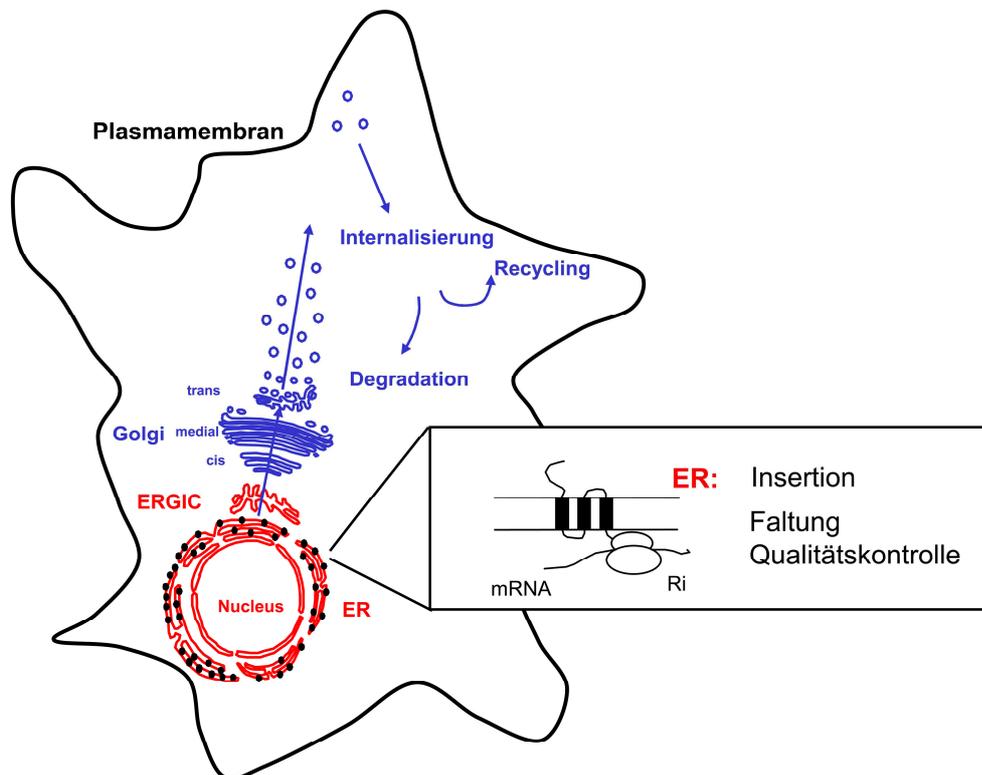


## 1. Einleitung

### 1.1 Proteinsynthese und intrazellulärer Transport von integralen Membranproteinen in eukaryotischen Zellen

Der intrazelluläre Transport von Membranproteinen erfolgt über den sogenannten *sekretorischen Weg* (s. Abb. 1.1). Entlang dieses Weges werden sekretorische Proteine und Membranproteine translatiert, gefaltet, modifiziert und über das Endoplasmatische Retikulum (ER), das ER-Golgi-Intermediärkompartiment (ERGIC) und den Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert. Im Folgenden wird eine Übersicht über die einzelnen Schritte des sekretorischen Weges gegeben.



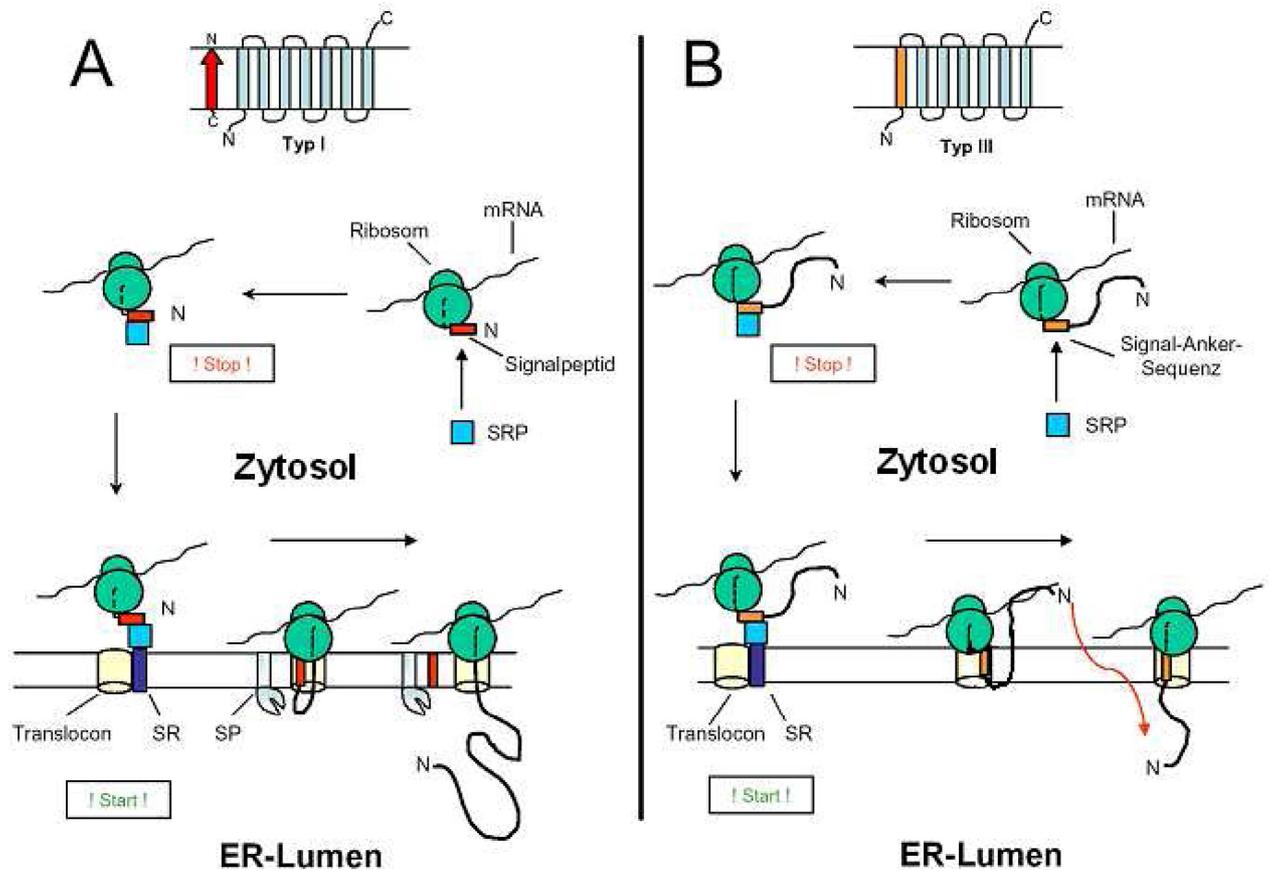
**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung des intrazellulären Transports von Membranproteinen (*sekretorischer Weg*). Um ihre Funktion ausüben zu können, müssen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) und andere integrale Membranproteine zu ihrem richtigen Zellkompartiment, in der Regel zur Plasmamembran, transportiert werden. Die Synthese beginnt mit der Insertion in die Membran des ER. Im ER werden die Proteine gefaltet und modifiziert. Im ERGIC und im Golgi-Apparat werden die Proteine weiter prozessiert, sodass nur vollständig gereifte Proteine die Plasmamembran erreichen können. Die korrekte Faltung wird von einem Qualitätskontrollsystem überwacht. Redundante Proteine an der Plasmamembran werden internalisiert und degradiert oder wieder zur Plasmamembran recycelt.

---

### 1.1.1 Das Endoplasmatische Retikulum

Der intrazelluläre Transport von integralen Proteinen beginnt mit ihrer Insertion in die ER-Membran. Die Anheftung/Insertion an die ER-Membran wird dabei von Signalsequenzen vermittelt (Brodsky, 1998). Membranproteine können im N-terminalen Bereich ein hydrophobes, abspaltbares Sortierungssignal (Signalpeptid) besitzen, das den Transport zum ER einleitet (s. Abb. 1.2 A). Wenn kein abspaltbares Signalpeptid vorhanden ist, steuert die erste Transmembrandomäne die Membrananheftung und Insertion. Diese wird dann als Signal-Anker-Sequenz bezeichnet (s. Abb. 1.2 B).

Während der initial zytosolischen Translation bindet der Signalerkennungspartikel (SRP = *Signal Recognition Particle*) an das Signalpeptid. Daraufhin stoppt die Translation bzw. ist deutlich verlangsamt. Der SRP führt den entstandenen Komplex aus Ribosom, naszierender Polypeptidkette und SRP zur Membran des ER. Dort bindet der SRP an seinen membranständigen Rezeptor (SRP-Rezeptor) und das Ribosom interagiert mit dem Translokationsapparat in der ER-Membran, dessen wichtigster Bestandteil der proteinleitende Sec61-Komplex ist. Die Translation wird an der ER-Membran fortgesetzt und der SRP durch GTP-Hydrolyse freigesetzt. Die naszierende Polypeptidkette wird seitlich aus dem Sec61-Komplex in die ER-Membran entlassen. Während dieser kotranslationalen Insertion wird die Orientierung (Topologie) der Proteine festgelegt. Hierfür spielen Ladungen in den intra- und extrazellulären Schleifen eine entscheidende Rolle. Das Protein wird dabei so orientiert, dass die positive Nettoladung zum Zytoplasma weist (Spiess, 1995).



**Abb.1.2: Hypothetische Mechanismen der kotranslationalen ER-Insertion von Membranproteinen mit (A) und ohne Signalpeptid (B).** Modifiziert nach Renner (2004).

- (A) ER-Insertion mit Signalpeptid. Der Signalerkennungspartikel (SRP) bindet an die abspaltbare Signalsequenz der naszierenden Polypeptidkette. Der SRP interagiert gleichzeitig mit dem Ribosom, was zu einem Elongationsarrest führt. Der Komplex aus Ribosom, naszierender Polypeptidkette, mRNA und SRP bindet an die ER-Membran. Der SRP interagiert mit dem membranständigen SRP-Rezeptor (SR). Das Ribosom bindet an den Sec61-Komplex und die Signalsequenz wird unter GTP-Hydrolyse vom SRP in den Sec61-Komplex übertragen. Der Translokationskanal öffnet sich zum ER-Lumen und durch die wieder startende Elongation wird die Polypeptidkette in die ER-Membran integriert und das Signalpeptid abgespalten.
- (B) ER-Insertion ohne Signalpeptid. Der N-Terminus des Proteins wird komplett im Zytosol translatiert. Erst die Bindung vom SRP an die Signal-Anker-Sequenz (1. transmembranäre Domäne) stoppt die Translation und dirigiert den Komplex an die ER-Membran. Die Signal-Anker-Sequenz wird in das Translocon eingefädelt und der N-Terminus muss posttranslational transloziert werden.

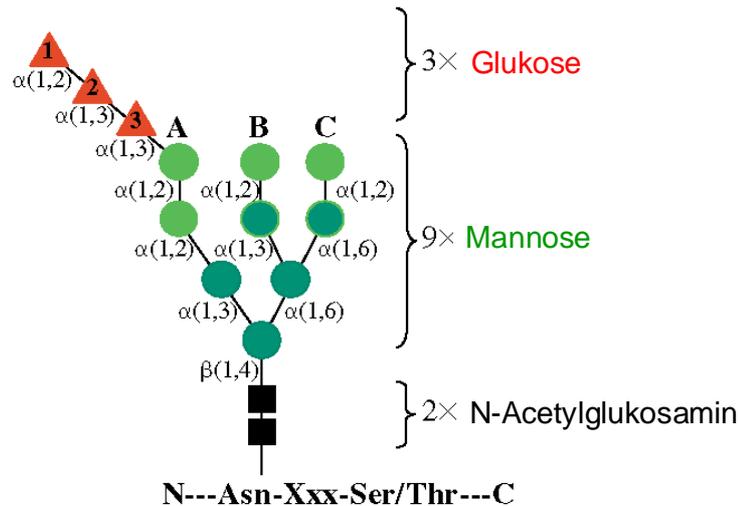
Um ein reifes Protein zu erhalten, muss die naszierende Polypeptidkette im ER weiter prozessiert werden. Im Lumen des ER werden an das Protein kotranslational N-Glykosylierungen angefügt (s. Abschnitt 1.1.1.1) und Disulfidbrücken geknüpft (s. Abschnitt 1.1.1.2). Die korrekte Faltung wird während der Proteinsynthese von einem Qualitätskontrollsystem überwacht, das Proteine, die nicht ihre native Struktur erreichen

---

können, retiniert und dem ER-assoziierten Degradationsweg (ERAD) zuführt. Das Qualitätskontrollsystem in Säugerzellen ist ein wichtiger Schwerpunkt dieser Arbeit, auf den in Abschnitt 1.2 detailliert eingegangen wird.

#### 1.1.1.1 Aufbau und Prozessierung von N-Glykanen

Durch das Anfügen von N-Glykosylierungen wird die Hydrophilität des Proteins erhöht. Im ersten Schritt wird ein mannosereiches Glykan kovalent über eine Carboxamidgruppe mit der Seitenkette von Asparagin verknüpft. Mannosereiche Glykane enthalten drei verschiedene Bausteine: Mannose, Glukose und N-Acetylglukosamin. Das mannosereiche Glykan wird vor der Übertragung auf die Polypeptidkette auf einem lipophilen Träger aufgebaut, der über Dolicholphosphat als hydrophober Anker in der Membran befestigt ist. UDP- und GDP-aktivierte Zucker und Intermediate aus Mannose- und Glukose-Dolicholphosphat sind Donoren dieser komplexen Reaktionskette (Müller-Esterl et al., 2004). Die Dolicholbeladung beginnt auf der zytoplasmatischen Seite der ER-Membran mit der Phosphorylierung von Dolichol und der Übertragung von zwei Einheiten N-Acetylglukosamin sowie fünf Einheiten Mannose. Die so entstandene Kette wechselt durch Flippasen auf die luminale Seite des ER. Hier wird durch sukzessive Addition von weiteren Kohlenhydratresten (zwei N-Acetylglukosamin-, neun Mannose- und drei Glukosereste) das mannosereiche Glykan fertig gestellt (s. Abb. 1.5). Während die naszierende Polypeptidkette in die ER-Membran transloziert wird, erkennt die luminale Oligosaccharyltransferase die Konsensus-Sequenz Asn-Xxx-Ser/Thr (Xxx: beliebiger Rest außer Pro) und überträgt die Oligosaccharidstruktur von Dolicholphosphat auf den Asparaginrest. Die beiden N-Acetylglukosamine und drei Mannosereste repräsentieren den Kern der Oligosaccharidkette, der auch durch spätere Modifikationen unverändert bleibt.



**Abb. 1.5: Aufbau eines mannosereichen Oligosaccharids.** Modifiziert nach Ruddock und Molinari (2006). Mannosereiche Glykane bestehen aus zwei N-Acetylglukosamin-, neun Mannose- und drei Glukoseresten, die im ER durch die luminale Oligosaccharyltransferase auf das Asparagin der Konsensussequenz Asn-Xxx-Ser/Thr (Xxx: beliebiger Rest außer Pro) übertragen werden.

### 1.1.1.2 Disulfidbrückenbildung

Protein-Disulfidisomerasen (PDI) wie ERp57 und Peptidyl-prolyl-cis/trans-Isomerasen (PPI) sind Faltungskatalysatoren (Bukau, 1999), die bestimmte geschwindigkeitsbestimmende Schritte der Faltung, wie das Einfügen von Disulfidbrücken, beeinflussen. Die oxidative Faltung beruht auf einer Protein-Protein-Interaktion. Dieser Reaktionsweg beinhaltet den Disulfid-Transfer von der PDI oder PDI-ähnlichen Proteinen auf das naszierende Polypeptid. Die PDI besteht aus 4 Thioredoxin (trx) Domänen. Zwei laterale Domänen (a und a') stellen die Oxidoreduktaseaktivität, während die zwei zentralen Domänen b und b' eine hydrophobe Oberfläche schaffen, die naszierende Proteine binden und den beiden aktiven Domänen a und a' zuführen (Wilkinson und Gilbert, 2004; Forster et al., 2006). Nach dem Transfer der Disulfidbrücke wird die PDI durch Mitglieder der Ero1 Flavoprotein Familie reoxidiert (Cabibbo et al., 2000; Pagani et al., 2000; Mezghrani et al., 2001). Die Bildung von Disulfidbrücken ist für die Faltung und Qualitätskontrolle von sekretorischen und Membranproteinen von entscheidender Bedeutung, da diese die Stabilität der nativen Konformation erhöhen. Fehlende Disulfidbrücken, Schädigungen oder Fehlpaarungen produzieren in der Regel fehlgefaltete Proteine. Weiterhin führt ein exponiertes Cystein in einem ansonsten korrekten Aminosäure-Kontext zur Retention und Degradation (Frau et al., 1993; Guenzi et al., 1994).

---

Korrekt gefaltete Proteine werden in der Membran von Transportvesikeln aus dem ER über das ERGIC und den Golgi-Apparat zu ihrem Zielkompartiment transportiert. Das ERGIC (Synonym: VTC = *vesicular tubular clusters*) oder pre-Golgi-Intermediat, ist ein tubovesikuläres Intermediat zwischen ER und Golgi-Apparat, das einerseits der Sortierung und Konzentration der zu transportierenden Proteine dient (Hauri et al., 2000 a und b). Andererseits ist das ERGIC auch in die Qualitätskontrolle involviert (Gilbert et al., 1998; Yamamoto et al., 2001; Hermosilla et al., 2004; Oueslati et al., 2007).

### 1.1.2 Das ERGIC

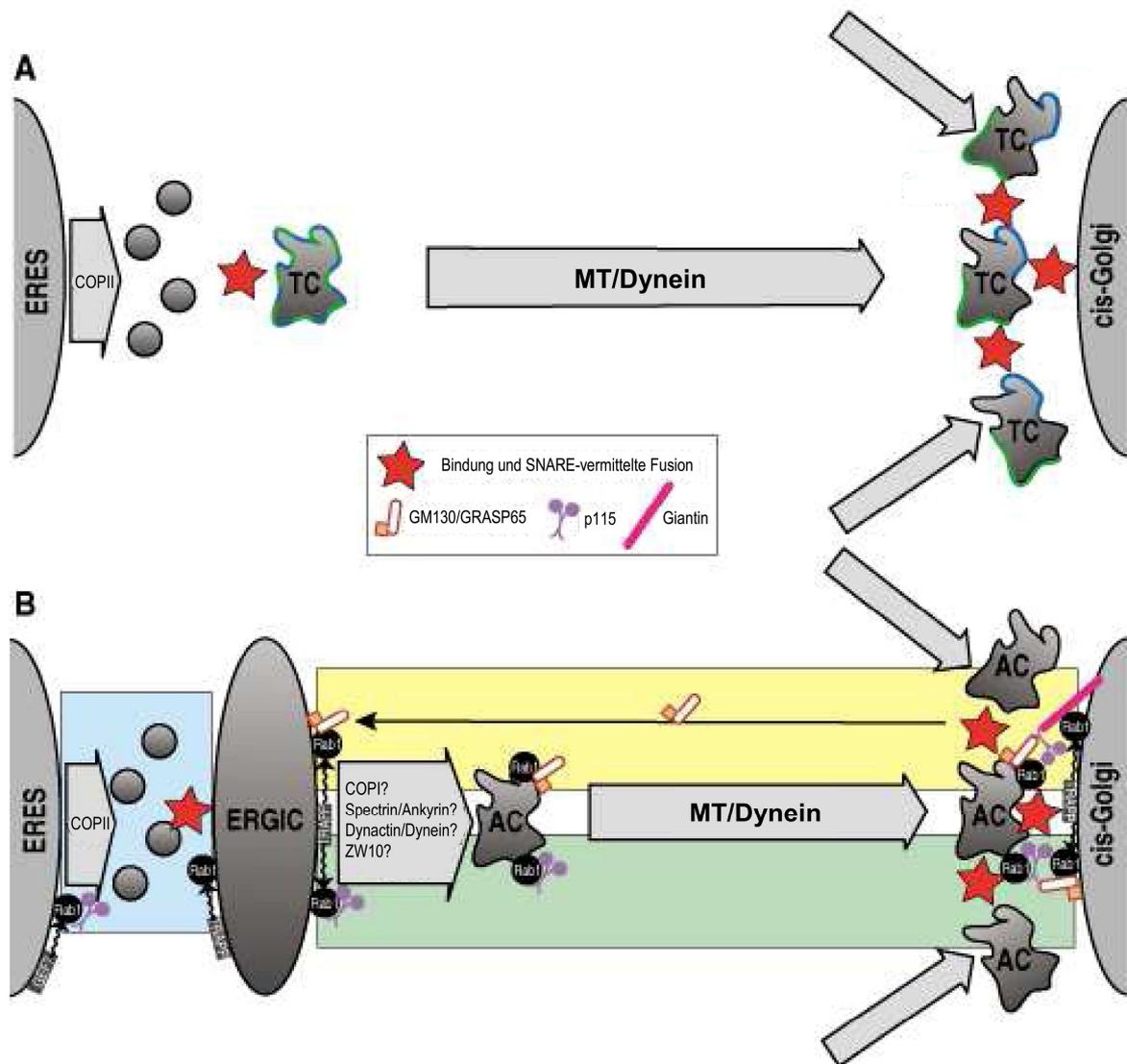
Das ERGIC wurde in Säugerzellen als spezialisierte Domäne des ER (Sitia und Meldolesi, 1992) oder des cis-Golgi (Mellman und Simons, 1992) beschrieben. Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) besitzen kein ERGIC. Hier vermitteln ausschließlich COPII-haltige Vesikel den Transport zwischen ER und Golgi-Apparat (Bonifacino und Glick, 2004). In höheren Eukaryoten wird der Transport an den Protein-Austrittsstellen an der ER-Membran (ERES = *ER-exit sites*) ebenfalls durch COPII-Vesikel vermittelt (Hammond und Glick, 2000). Bei diesem Transportkomplex-Modell (TC-Modell) werden die ERGIC-Membranen nur transient durch die Fusion von ER-verlassenden COPII-Vesikeln gebildet (s. Abb. 1.3 A) (Bannykh et al., 1998; Stephens und Pepperkok, 2001). Diese migrieren zum cis-Golgi und fusionieren mit diesem (Mironov et al., 2003; Zeuschner et al., 2006). Nach dem TC-Modell wäre das ERGIC kein stabiles, eigenständiges Kompartiment.

Biochemische Analysen zeigten aber, dass sich die Proteinzusammensetzung der ERGIC-Membranen von denen des benachbarten ER und Golgi-Apparates unterscheidet (Schweizer et al., 1991). Das 53 kDa Membranprotein ERGIC-53 ist vorwiegend im ERGIC lokalisiert und ermöglicht die eindeutige Identifizierung der ERGIC-Membranen (Schweizer et al., 1988; Schweizer et al., 1990; Saraste und Svensson, 1991; Hauri et al., 2000a). Serielle Sektionierung und ultrastrukturelle 3-dimensionale Rekonstruktionsanalysen von pankreatischen Azinuszellen verstärkten die Vermutung, dass das ERGIC nicht dem ER oder dem cis-Golgi zuzuordnen ist (Sesso et al., 1994; Klumperman et al., 1998; Fan et al., 2003), sondern ein eigenes stabiles Kompartiment bildet. Klumperman et al. (1998) konnten durch Immunelektronenmikroskopie zeigen, dass das Fusionsprotein GFP-ERGIC-53 in langlebigen stationären Membrankompartimenten lokalisiert ist, die getrennt von den ERES sind und den

---

tubulär-vesikulären Strukturen des ERGIC entsprechen (Klumperman et al., 1998). Diese Beobachtungen widersprechen dem TC-Modell und unterstützen ein weiteres Modell, in dem der anterograde Transport von Membranproteinen über ein stabiles ERGIC-Kompartiment erfolgt (s. Abb. 1.3 B). In diesem Modell werden die Proteine vom ER durch COPII-Vesikel zum ERGIC transportiert. In den stationären ERGIC-Membranen werden die Proteine in große anterograde Transportvesikel (AC) sortiert, die das ERGIC verlassen und zum cis-Golgi transportiert werden (Ben-Tekaya et al., 2005).

Innerhalb des Qualitätskontrollsystems kommt dem ERGIC wahrscheinlich die Rolle eines zweiten Sicherheitsnetzes zu, das fehlgefaltete Proteine erkennt, die die ER-Barriere überwinden konnten. Diese Proteine werden dann zum ER zurücktransportiert und dort degradiert. Die zugrunde liegenden Mechanismen des retrograden Transports sind noch nicht vollständig geklärt. Höchstwahrscheinlich reagieren die Proteine mit der COPI-Hülle von retrograden Transportvesikeln und ermöglichen dadurch die Rückführung (Hermosilla et al., 2004). Korrekt gefaltete Proteine erreichen vom ER/ERGIC aus zunächst den cis-Golgi-Apparat. Hier und im medialen Golgi finden weitere Modifikationen zur Reifung der neusynthetisierten Proteine statt.



**Abb. 13: Modelle des anterograden Proteintransports zwischen ER und Golgi-Apparat.** Modifiziert nach Appenzeller-Herzog und Hauri (2006).

- (A) Das Transportkomplex-Modell: An den ER-Austrittsstellen (ERES) binden und fusionieren COPII-Vesikel zu Transportkomplexen (TC), die Dynein-abhängig entlang des mikrotubulären Zytoskeletts (MT) transportiert werden. Beim intra-Golgi Transport (Rabouille und Klumperman, 2005) fusionieren am cis-Golgi ankommende TCs entweder direkt mit der ersten Zisterne des cis-Golgi oder bilden eine neue cis-Golgi Zisterne durch homotypische Fusionierung.
- (B) Modell zum anterograden Transport von Membranproteinen über ein stabiles ERGIC: Der kurze vesikuläre Transport von den ERES zum ERGIC wird von COPII-Vesikeln vermittelt. Im ERGIC werden die Proteine in anterograde Transporter (AC) sortiert. Der Langstreckentransport dieser ACs vom ERGIC zum cis-Golgi erfolgt Dynein-abhängig entlang von Mikrotubuli. In die Abschnürung von anterograden ACs vom ERGIC können außerdem das Spectrin/Ankyrin-Skelett, ZW10 oder Dynein und sein Membranadapterkomplex Dynactin involviert sein. Die Anheftung der Transporter an den cis-Golgi-Apparat erfolgt durch eine Bindungsmaschinerie: Zuerst wird Rab1 aktiviert und durch Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs = *Guanine nucleotide exchange factors*), wie dem TRAPP-Komplex (Zickzack-Pfeile), an die Membran rekrutiert. Aktiviertes Rab1 rekrutiert p115 zu den ERES (Allan et al., 2000), was die Bindung von nachfolgenden, ER verlassende Vesikel, an die ERGIC-Membran ermöglicht (Cao et al., 1998). Für den Transport vom ERGIC zum Golgi-Apparat sind zwei verschiedene Möglichkeiten denkbar. Im ersten Modell (grüne Box), bindet p115 an das ERGIC durch aktiviertes Rab1. In den Andockprozess sind vermutlich eine Reihe von Rab1-aktivierten Proteinen involviert: p115, Rab1, GM130, GRASP65 (Moyer et al., 2001) und GM130-p115, das mit dem Transmembranprotein Giantin interagiert (Sonnichsen et al., 1998; Beard et al., 2005). Anschließend

---

vermitteln SNARE-Proteine die Membranfusion durch die Katalyse von p115 (roter Stern) (Sapperstein et al., 1996; Shorter et al., 2002). Zur Einfachheit ist der retrograde Transportweg vom Golgi-Apparat zum ER ist nicht dargestellt.

### 1.1.3 Der Golgi-Apparat

Der Golgi-Apparat ist aus Stapeln von Membranzisternen zusammengesetzt. Enzyme im Golgi-Apparat prozessieren Glykoproteine, indem mannosereiche Zuckerketten durch komplexe Glykane ersetzt werden. Die komplexen Glykosylierungen entstehen durch die Verknüpfung von N-Acetylgalaktosamin. Ferner werden im Golgi-Apparat auch O-Glykosylierungen durch die Verknüpfung von Oligosacchariden mit den Hydroxylgruppen von Serin- und Threoninresten angefügt. Zusätzlich können im Golgi-Apparat auch Palmitylierungen an Cysteinresten eingefügt werden (Abeijon et al., 1997). Die komplett prozessierten, reifen Proteine werden durch das trans-Golgi-Netzwerk, je nach ihrem Bestimmungsort, in verschiedene Vesikel sortiert (Plasmamembran, Endosomen, Lysosomen).

Der Golgi-Apparat ist auch die letzte bekannte Station für die Qualitätskontrolle. Caldwell et al. (2001) demonstrierten mit Hilfe von zwei fehlgefalteten Proteinen, dass diese zum Golgi transportiert werden und dann über ein retrogrades Transportsystem zum ER zurückgeführt und dem ERAD zugeführt werden.

## 1.2 Das Qualitätskontrollsystem in eukaryotischen Zellen

Zu den Komponenten des Qualitätskontrollsystems zählen Chaperone und Enzyme, die sowohl die korrekte Proteinfaltung unterstützen, als auch Fehlfaltungen erkennen. In Tabelle 1 sind die bisher bekannten Komponenten zusammengefasst und ihre Lokalisation und Funktion innerhalb der Qualitätskontrolle aufgeführt.

Chaperone sind Proteine, die mit hydrophoben Gruppen oder Glykosylierungen noch ungefalteter Proteine interagieren, ihnen dadurch bei der Faltung helfen und eine Aggregation verhindern. Die Chaperon-vermittelte Faltung von Membranproteinen erfolgt kotranslational. Chaperone führen ferner eine Qualitätskontrolle durch, indem sie Proteine, die ihre native

Struktur nicht erreichen können, verlängert binden und dem Abbau zuführen (Ellgaard und Frickel, 2003; Ahner et al., 2004; Schwieger et al., 2008).

**Tab. 1:** Komponenten des Qualitätskontrollsystems im sekretorischen Weg. Die beteiligten Chaperone und Enzyme, ihre Lokalisation und ihre Funktion in der Qualitätskontrolle sind angegeben. (Kleizen und Braakman, 2004; Breuza et al., 2004; Ni und Lee, 2007; Anelli und Sitia, 2008).

Chaperone und Enzyme	Name	Lokalisation	Funktion
Chaperone	BiP/GRP78	ER-Lumen	Faltung von Proteinen Erkennung ungefalteter Intermediate Regulation von IRE1, PERK und ATF6 in ER Signalwegen
	GRP94	ER-Lumen	Faltung von Proteinen
	ORP150	ER-Lumen	Faltung von Proteinen, Hypoxie
	HERP	ER-Membran	ERAD
	SEL1L	ER-Membran	ERAD
Co-Chaperone	Sil1/BAP	ER-Lumen	ATP-Austauschfaktor
	ERdjs	ER-Lumen	BiP Kofaktor
Lektine	Calnexin (Cnx)	ER-Membran	Faltung von Proteinen
	Calretikulin (Crt)	ER-Lumen	Faltung von Proteinen
	ERGIC-53	ERGIC	Transport von Glykanen
	VIPL	ER-Lumen	Transport
	VIP-36	Cis-Golgi	Transport
	EDEM1, 2, 3	ER-Lumen	ERAD
	OS9	ER-Membran	ERAD
	Erlektin/XTP3-B	ER-Membran	ERAD
Reoxidasen	Ero1 $\alpha$	ER+ERGIC	Oxidase
	Ero1 $\beta$	ER-Lumen	Oxidase
	PDI	ER-Lumen	Oxidase, Isomerase, Reduktase Untereinheit der Prolyl-4-Hydroxylase Untereinheit von mikrosomalem Triacylglycerol Transferprotein
	ERp57	ER-Lumen	Isomerase, Oxidase?
	ERp72	ER-Lumen	?
	ERp44	ERGIC cis-Golgi	Thiol-vermittelte Retention/IP3R1 Regulation
Prolinisomerasen	PPIasen	ER-Lumen	Prolin-Isomerisierung
	Cyclophiline	ER-Lumen, Mitochondrien, Zellkern, Zytosol	Prolin-Isomerisierung
Enzyme zur Glykanprozessierung	Glukosidase I	ER-Lumen	Faltungssensor
	Glukosidase II	ER-Lumen	Faltungssensor

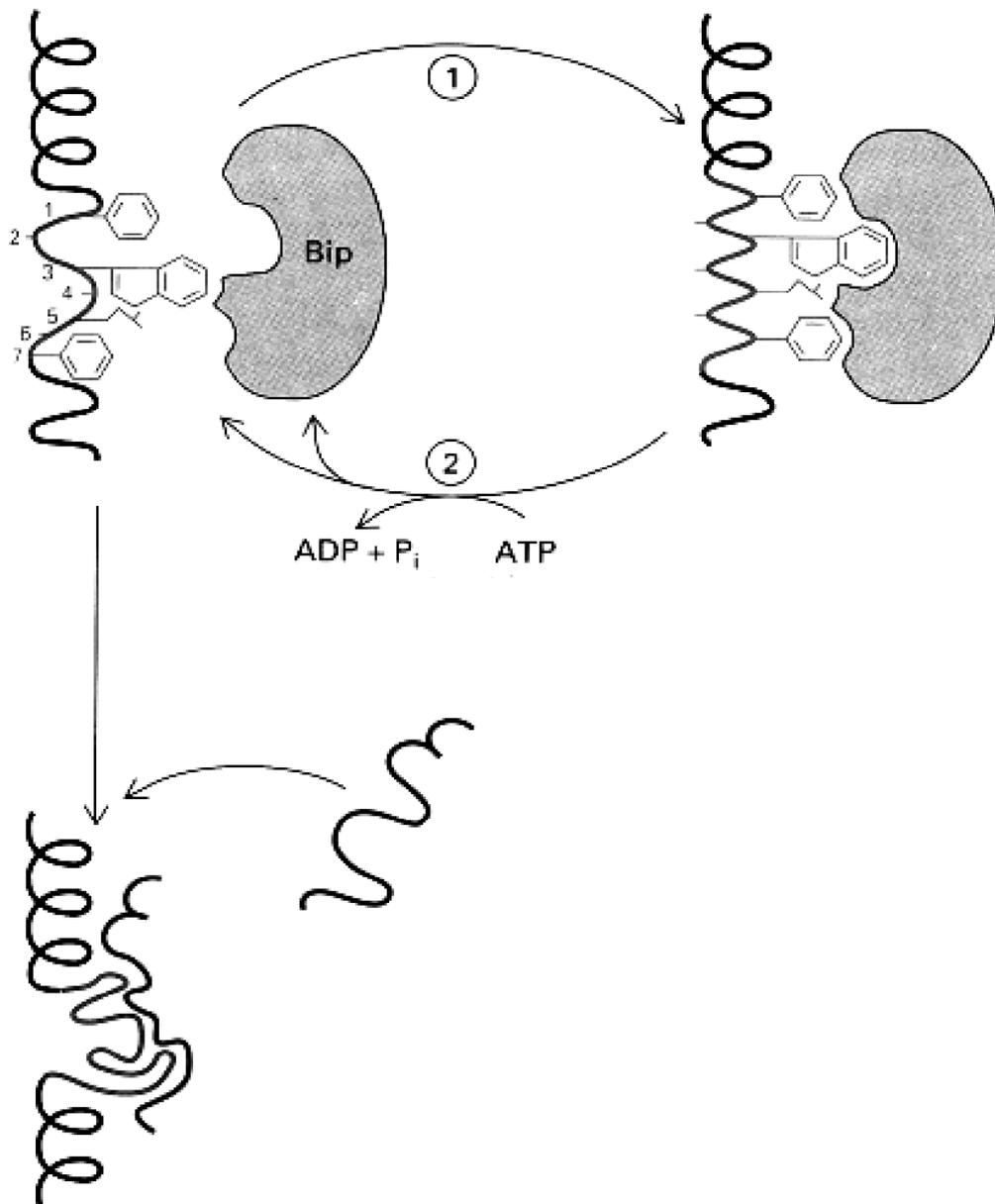
	ER Mannosidase I	ER-Lumen	Faltungssensor
	ER Mannosidase II	ER-Lumen	Faltungssensor
	UGGT	ER-Lumen	Faltungssensor
	Mannosidase IA, IB, IC	Golgi	Faltungssensor
	UGT1	ER-Lumen	QK Faltungssensor
ERAD-Proteine	Derlin1, 2, 3	ER-Membran	ERAD Translokon?
	HERP	ER-Membran	ERAD Ubiquitin-ähnliches Protein
	HRD1	ER-Membran	ERAD E3 Ubiquitinligase
	ATF6	ER-Membran Golgi	ER-Stress-Sensor
	IRE1 $\alpha$	ER-Lumen	ER-Stress-Sensor Endonuklease
	PERK	ER-Membran	ER-Stress-Sensor

### 1.2.1 Molekulare Chaperone

Molekulare Chaperone assistieren definitionsgemäß bei der Faltung von Proteinen und verhindern Nebenreaktionen bzw. Aggregationen. Dabei katalysieren sie keine Reaktionsschritte, sondern erhöhen die Ausbeute korrekt gefalteter Proteine (Bukau, 1999). Zu den molekularen Chaperonen zählen lektinartige Chaperone und klassische Chaperone, die sich in den molekularen Mechanismen der Substraterkennung unterscheiden.

#### 1.2.1.1 Klassische Chaperone

Klassische Chaperone, wie die Hsp70-Familie und die Hsp90-Familie, assoziieren transient mit exponierten hydrophoben Gruppen von noch ungefalteten Polypeptidketten und verhindern so deren Aggregation. Diese Chaperone, mit Ausnahme von Hsp47, besitzen ATPase-Aktivität und agieren in Zyklen (Bukau, 1999). Klassische Chaperone enthalten eine konservierte ATPase-Domäne und eine Peptid-Bindedomäne, die die repetitiven Zyklen aus ATP-Hydrolyse und ADP-Freisetzung sowie Bindung und Freisetzung des ungefalteten Proteins koordinieren (s. Abb. 1.4). Diese Zyklen werden von Co-Chaperonen, wie Erdj 1-5 (ATP-Hydrolyse), Bag-1 (ADP-Austausch) oder dem J-Protein, beeinflusst (Kleizen und Braakman, 2004).



**Abb. 1.4: Chaperonvermittelte Proteinfaltung am Beispiel von BiP (Grp78)** (entnommen aus Lodish et al., 1996).

- (1) Das molekulare Chaperon bindet an die Seitenketten hydrophober Aminosäuren der naszierenden Polypeptidkette. Abschnitte mit der höchsten Affinität für BiP sind Heptapeptide mit alternierenden hydrophoben Aminosäuren.
- (2) Das Chaperon wird nach der Faltungsvermittlung durch ATP-Hydrolyse wieder freigesetzt, um dann erneut binden zu können. Hat das Protein seine native Struktur nicht erreicht (z.B. aufgrund von Mutationen), wird es erneut von BiP gebunden. Nicht-native Polypeptide neigen aufgrund exponierter hydrophober Bereiche zur Aggregation.

Im ATP-gebundenen Stadium zeigt das Chaperon eine geringe Affinität zum Substrat. Die Binderegion im C-Terminus ist flexibel und die Bindungsstelle dadurch geöffnet. In diesem Zustand können die ungefalteten Proteine schnell an die Bindungsstelle assoziieren und dissoziieren, was hohe Austauschraten ermöglicht. Die Hydrolyse von ATP im N-Terminus

---

bewirkt eine Konformationsänderung der C-terminalen Domäne. Im ADP-gebundenen Zustand hat das Chaperon eine hohe Affinität zum Substrat. Die Binderegion ist geschlossen und das ungefaltete Substrat wird durch Interaktionen hydrophober Aminosäuren fest in der Bindungstasche gehalten (Bukau und Horwich, 1998; Bukau et al., 2006).

Zur Faltung kann ein Protein von mehreren Chaperonen gleichzeitig gebunden werden. Der gesamte Mechanismus wird von Co-Chaperonen reguliert. Die Aktivität der Co-Chaperone wurde für das bakterielle Chaperon DnaK im Detail beschrieben (DnaK ähnelt dem eukaryotischen Chaperon Hsp70). Der Zyklus beginnt mit der Interaktion der ungefalteten Polypeptidkette mit dem Co-Chaperon DnaJ. DnaJ interagiert daraufhin mit der ATP-gebundenen Form von DnaK (bakterielles Hsp70). Diese Interaktion beinhaltet zwei Reaktionsschritte: Das ungefaltete Protein wird in die Bindungstasche von DnaK geführt und ATP wird zu ADP+P hydrolysiert. Daraufhin schließt sich die Bindungstasche und DnaJ dissoziiert. In diesem Stadium ist das Substrat fest an DnaK gebunden und das Co-Chaperon GrpE bindet an die N-terminale Domäne von DnaK. Diese Bindung bewirkt eine Konformationsänderung des Chaperons, die Freisetzung von ADP und schließlich wieder die Bindung von ATP. Dadurch wird die Bindungstasche im C-Terminus von DnaK wieder geöffnet, das Substrat freigesetzt und ein neuer Zyklus kann beginnen. Das Substratprotein faltet sich vollständig oder bindet erneut an DnaK bzw. an andere Chaperone (Bukau, 1999).

#### 1.2.1.2 Lektinartige Chaperone

Die lektinartigen Chaperone Calnexin und Calretikulin interagieren im ER mit Proteinen, die eine N-Glykosylierung tragen. Während der Prozessierung des Glykans wird der erste Glukoserest gleich nach der Übertragung durch die Glukosidase I abgespalten (s. Abb. 1.6). Danach erfolgt eine zweite Deglukosylierung durch die Glukosidase II. Diese besteht aus einer katalytischen Untereinheit ( $\alpha$ ) und einer Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-ähnlichen Untereinheit ( $\beta$ ). Das noch ungefaltete monoglukosylierte Polypeptid wird von den Chaperonen Calnexin (Cnx) (membrangebunden) und Calretikulin (Crt) (löslich) erkannt und gebunden. Diese Bindung wird durch die Abspaltung des letzten Glukoserestes durch die Glukosidase II gelöst. Das Enzym UDP-Glukose-Glykoprotein-Glykosyltransferase (UGGT) überprüft anschließend die Faltung und nur richtig gefaltete Proteine können das ER verlassen. Noch ungefaltete oder als fehlgefaltet erkannte Proteine werden durch die UGGT

reglukosyliert und gehen wieder in den Calnexinzyklus ein (Ellgaard et al., 2001). Bemerkenswert an diesem System ist, dass nicht die eigentlichen Chaperone (Cnx/Crt) fehlgefaltete von korrekt gefalteten Proteinen unterscheiden, sondern das Hilfsenzym UGGT. Die UGGT erkennt Fehlfaltungen höchstwahrscheinlich an exponierten hydrophoben Domänen, analog zu klassischen Chaperonen (Ruddock und Molinari, 2006).

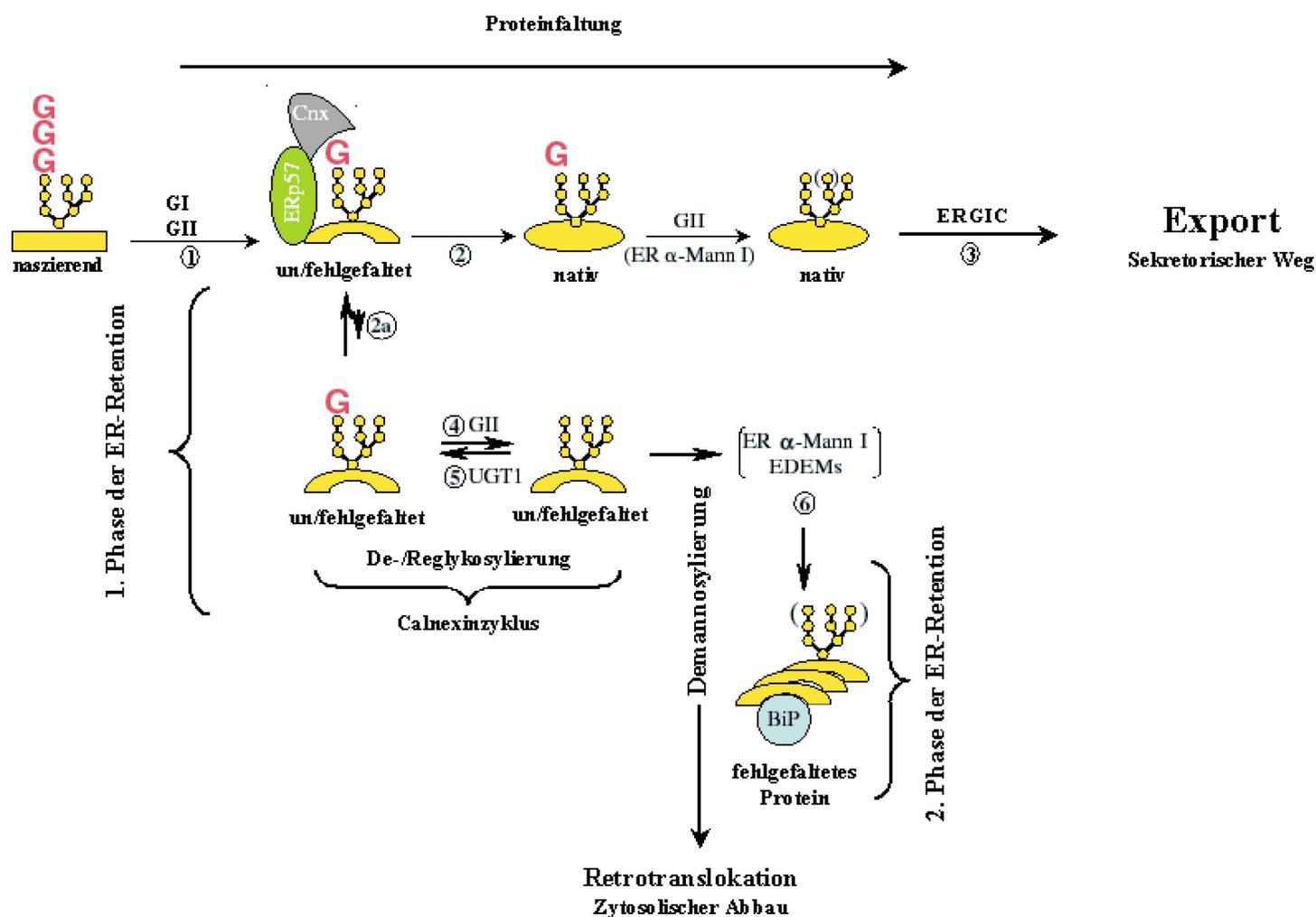


Abb. 1.6: Mechanismus der chaperonvermittelten Proteinfaltung durch die lektinartigen Chaperone Calnexin und Calretikulin. Modifiziert nach Ruddock und Molinari (2006).

- (1) Die Glukosereste eins und zwei des Glykans werden durch die Glukosidase I und II abgespalten.
- (2) Das noch ungefaltete monoglukosylierte Polypeptid wird von den lektinartigen Chaperonen Calnexin und Calretikulin gebunden.
- (3) Diese Bindung wird durch die Abspaltung des letzten Glukoserestes durch die Glukosidase II gelöst.
- (4) Das Enzym UGGT überprüft die Faltung. Noch ungefaltete bzw. fehlgefaltete Proteine werden durch UGGT reglukosyliert und durchlaufen den Zyklus erneut.

---

### 1.2.2 Zusammenwirken der Kontrollmechanismen des Qualitätskontrollsystems im sekretorischen Weg

Aus Studien an Hefen und tierischen Zellen ist bekannt, dass verschiedene Wege der Qualitätskontrolle simultan ablaufen. Einige Proteine werden zum Golgi-Apparat transportiert und zum Abbau erneut dem ER zurückgeführt, während andere Substrate direkt im ER retiniert und dem ERAD zugeführt werden (Hammond et al., 1994; Caldwell et al., 2001; Vashist et al., 2001; Yamamoto et al., 2001). In Hefen wurde gezeigt, dass einige fehlgefaltete Proteine die Qualitätskontrolle des ER völlig umgehen und zum Abbau direkt in lysosomale Kompartimente (in Hefen: Vakuolen) transportiert werden (Hong et al., 2002). Dieser Weg wird Golgi-Qualitätskontrolle genannt (Arvan et al., 2002) und dient ebenso dazu Substrate abzubauen, die in gestressten Zellen nicht durch das ER-Qualitätskontrollsystem erkannt wurden (Spear und Ng, 2003). Bis jetzt ist unbekannt, warum fehlgefaltete Proteine auf unterschiedlichen Wegen dem Abbau zugeführt werden. In Hefen wurde gezeigt, dass fehlgefaltete lösliche Proteine erst im Golgi-Apparat dem Abbau zugeführt werden, während integrale Proteine direkt im ER retiniert werden (Caldwell et al., 2001; Vashist et al., 2001). Vashist und Ng (2004) untersuchten in Hefen anhand verschiedener ERAD-Substrate mit definierten fehlgefalteten Domänen, ob Mutationen in zytosolischen oder luminalen Bereichen zur Retention in unterschiedlichen Kompartimenten des sekretorischen Wegs führen. Die Ergebnisse zeigten, dass Proteine nicht aufgrund ihrer Membranassoziiierung auf die verschiedenen Abbauwege verteilt werden. Vielmehr war der Ort der Mutation im Protein ausschlaggebend. Membranproteine mit Defekten in den zytosolischen Domänen wurden im ER retiniert, während Proteine mit luminalen Defekten das ER verlassen konnten. Das lässt vermuten, dass ausgeprägte luminale and zytosolische Kontrollmechanismen für die Qualitätskontrolle im ER existieren. Die Autoren postulierten ein Modell, in dem die Qualitätskontrolle für die sekretorische Proteinfaltung aus einer Serie von Kontrollpunkten besteht. Proteine, die an einem Kontrollpunkt verbleiben, werden degradiert. Im ER überprüft der ERAD-C Weg den Faltungsstatus der zytosolischen Domänen von Membranproteinen. Fehlgefaltete Proteine werden dem ERAD zugeführt. Dies geschieht ohne Beachtung der Faltung in den luminalen Domänen. Wenn ein Protein den ERAD-C Kontrollpunkt passiert hat, durchläuft es den ERAD-L Kontrollpunkt, der die luminalen Domänen überprüft. Wenn eine Fehlfaltung mit Hilfe von spezifischen ERAD-L Faktoren detektiert wird, wird das Protein erst hier dem ERAD zugeführt. Nach den Kontrollpunkten ERAD-C und ERAD-L

---

können noch weitere ER-Kontrollpunkte existieren bis die Proteine über den Golgi-Apparat (mit weiteren Kontrollpunkten) zu ihrem Zielort transportiert werden.

Dieses Modell berücksichtigt aber keine Fehlfaltungen in den transmembranären Bereichen ( $\alpha$ -Helizes). Es muss also noch einen speziellen ERAD-Membran Reaktionsweg (ERAD-M) geben (Carvalho et al., 2006). Ferner ist nicht bekannt, ob die in Hefen beschriebenen Qualitätskontrollmechanismen, in Säugerzellen analog ausgebildet sind. Der Golgi-Apparat fungiert als distaler Kontrollpunkt zur Sortierung von fehlgefalteten Proteinen, die nicht durch die ER-Qualitätskontrolle erkannt wurden oder während des Transports zum Golgi-Apparat beschädigt wurden (Arvan et al., 2002). Der Kontrollpunkt im Golgi-Apparat könnte auch einen alternativen Abbauweg darstellen, falls z.B. die ER-assoziierte Degradation überlastet ist.

Nach dem ER und dem Golgi-Apparat scheint auch eine Qualitätskontrolle in der Plasmamembran möglich zu sein. Nicht-native Proteine, die die Plasmamembran erreicht haben, werden schnell endozytiert und über vacuoläre/lysosomale Proteasen abgebaut (Ferreira et al., 2002; Fayadat und Kopito, 2003). Der Mechanismus der Erkennung ist noch völlig unbekannt.

### 1.3 Mutationen in den Genen von Membranproteinen können Fehlfaltungen und Erkrankungen auslösen

Es sind viele Krankheiten beschrieben, die durch die Retention von Proteinen, die das Qualitätskontrollsystem nicht passieren konnten, verursacht werden. Diese Proteine erreichen nicht ihren Bestimmungsort, was zu einem Verlust von spezifischen Zellfunktionen führt. Krankheiten wie die zystische Fibrose, Retinis pigmentosa und der X-chromosomal vererbte Nephrogene Diabetes insipidus (NDI) sind wichtige Beispiele, die auf fehlgefaltete Membranproteine zurückzuführen sind. Zystische Fibrose wird bei der Mehrzahl der Patienten durch eine Deletion von Phenylalanin an der Position 508 ( $\Delta F508$ ) im Gen des *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) hervorgerufen (Kerem et al., 1990). Die mutierten Chloridkanäle verbleiben fast ausschließlich im ER und werden über den ERAD-Weg abgebaut (Lukacs et al., 1994). Bei der autosomal dominant vererbten Retinis pigmentosa werden durch Mutationen des Lichtrezeptors Rhodopsin Netzhautdegradationen hervorgerufen. Der X-chromosomal vererbte NDI, wird durch

---

Mutationen im *AVPR2* Gen hervorgerufen, das für den Vasopressin- $V_2$ -Rezeptor ( $V_2R$ ) codiert. Bis jetzt sind 170 verschiedene Mutationen des  $V_2R$  beschrieben, die über alle Rezeptordomänen verteilt sind. Inaktivierende Mutationen des *AVPR2*-Gens können zu Veränderungen in der 3-dimensionalen Struktur des  $V_2R$  und damit zu einem Funktionsverlust führen. Die häufigsten Formen sind Punktmutationen, die zu einem Austausch von einzelnen Aminosäuren führen, aber auch Mutationen, die zur Verschiebung des Leserasters, Deletion oder Insertion von Aminosäuren führen. Die Rezeptormutanten können in 3 Gruppen unterteilt werden:

1. Mutanten, die an die Zelloberfläche gelangen, aber nicht mit 8-Arginin-Vasopressin (AVP) oder dem G-Protein/Adenylzyklase-System interagieren können
2. intrazellulär retinierte Mutanten
3. Mutationen, die zu einer instabilen mRNA führen

Die meisten Rezeptormutanten werden durch das Qualitätskontrollsystem im ER, ERGIC und Golgi-Apparat erkannt und in verschiedenen Kompartimenten des sekretorischen Wegs retiniert (Hermosilla et al., 2004; Schwieger et al., 2008). Deshalb ist der  $V_2R$  ein exzellentes Modellprotein zur Untersuchung von Qualitätskontrollmechanismen im sekretorischen Weg.

### **1.3.1 Pharmakologische Strategien zur Faltungsverbesserung fehlgefalteter Rezeptoren**

In den letzten Jahren wurden auch pharmakologische Strategien entwickelt, um die Faltung mutierter Rezeptoren und anderer Membranproteine zu verbessern. Substanzen, die auf Faltungsprozesse einen Einfluss nehmen, werden als chemische bzw. pharmakologische Chaperone bezeichnet (Papp und Csermely, 2006). Chemische Chaperone, wie die Osmolyte Glycerol und Trimethylamin, haben einen unspezifischen Effekt auf die Proteinstruktur, erhöhen die Löslichkeit und verhindern damit die Aggregation von ungefalteten Proteinen. Hydrophobe Substanzen wie Phenylbutyrat (PBA) verhindern eine Aggregation, indem sie hydrophobe Domänen fehlgefalteter Proteine maskieren. Der Nachteil solcher Substanzen besteht darin, dass sie erst in sehr hohen, in der Regel toxischen Konzentrationen wirken, was eine *in vivo*-Anwendung bei Patienten ausschließt.

Pharmakologische Chaperone binden dagegen spezifisch an ungefaltete Proteine und stabilisieren die Proteinstruktur (Arakawa et al., 2006; Conn et al., 2007). Bei Rezeptoren können z.B. Agonisten oder Antagonisten zuerst die Faltung der Ligandenbindungstasche und

damit die des gesamten Rezeptors stabilisieren. Voraussetzung für eine Wirkung als pharmakologisches Chaperon ist, dass die Moleküle während der Proteinfaltung vorhanden sind. Dies ist nur bei entsprechend hydrophoben Molekülen möglich, da mehrere Membranen überwunden werden müssen.

Für NDI-verursachende  $V_2R$ -Mutationen wurde der Antagonist SR121463 als pharmakologisches Chaperon beschrieben (Wüller et al., 2004). Dieser bindet quasi irreversibel an seine Zielstruktur, bewirkt eine Stabilisierung der Proteinstruktur und damit eine Überwindung des Faltungs- und Transportdefekts. Von Nachteil ist, dass durch die hochaffine Bindung, der Rezeptor durch einen Antagonisten blockiert bleibt.

Es wurden kürzlich auch zellpenetrierende Peptide (KLAL und Penetratin) beschrieben, die wahrscheinlich spezifisch Komponenten des Qualitätskontrollsystems im ERGIC hemmen. Durch diese Peptide konnten Mutanten des  $V_2R$ , die das ERGIC erreichen und dort retiniert werden, wieder zur Plasmamembran transportiert werden. Von Nachteil ist, dass diese Substanzen auch den Transport anderer Proteine beeinflussen (Oueslati et al., 2007).

#### 1.4 Der Vasopressin- $V_2$ -Rezeptor

Der Vasopressin- $V_2$ -Rezeptor, das Modellprotein dieser Arbeit, besteht aus 371 Aminosäuren und gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). GPCR bilden eine große Proteinfamilie und dienen als Zielstrukturen für zahlreiche Pharmaka. Die Rezeptoren haben eine charakteristische Struktur mit sieben Transmembranhelices und drei extra- und drei intrazellulären Schleifen. In der Aufsicht betrachtet sind die  $\alpha$ -Helices der transmembranären Domänen (TMD) eines GPCR entgegen dem Uhrzeigersinn angeordnet (Unger et al., 1997). Dabei liegt die dritte transmembranäre Domäne fast im Zentrum des Moleküls, und die 1. TMD und die 7.TMD liegen relativ nah beieinander (Liu et al., 1995; Mizobe et al., 1996).

GPCR können durch verschiedene Liganden wie Amine (Noradrenalin, Dopamin, Serotonin, Histamin), Peptide (Angiotensin, Vasopressin, Opioide), Aminosäuren (Glutamat, GABA) oder Lipide (Sphingosin-1-Phosphat) aktiviert werden (Marinissen und Gutkind, 2001). Die Rezeptoren transduzieren diese extrazellulären Stimuli mit Hilfe einer Konformationsänderung, die die Interaktion mit heterotrimeren G-Proteinen ermöglicht.

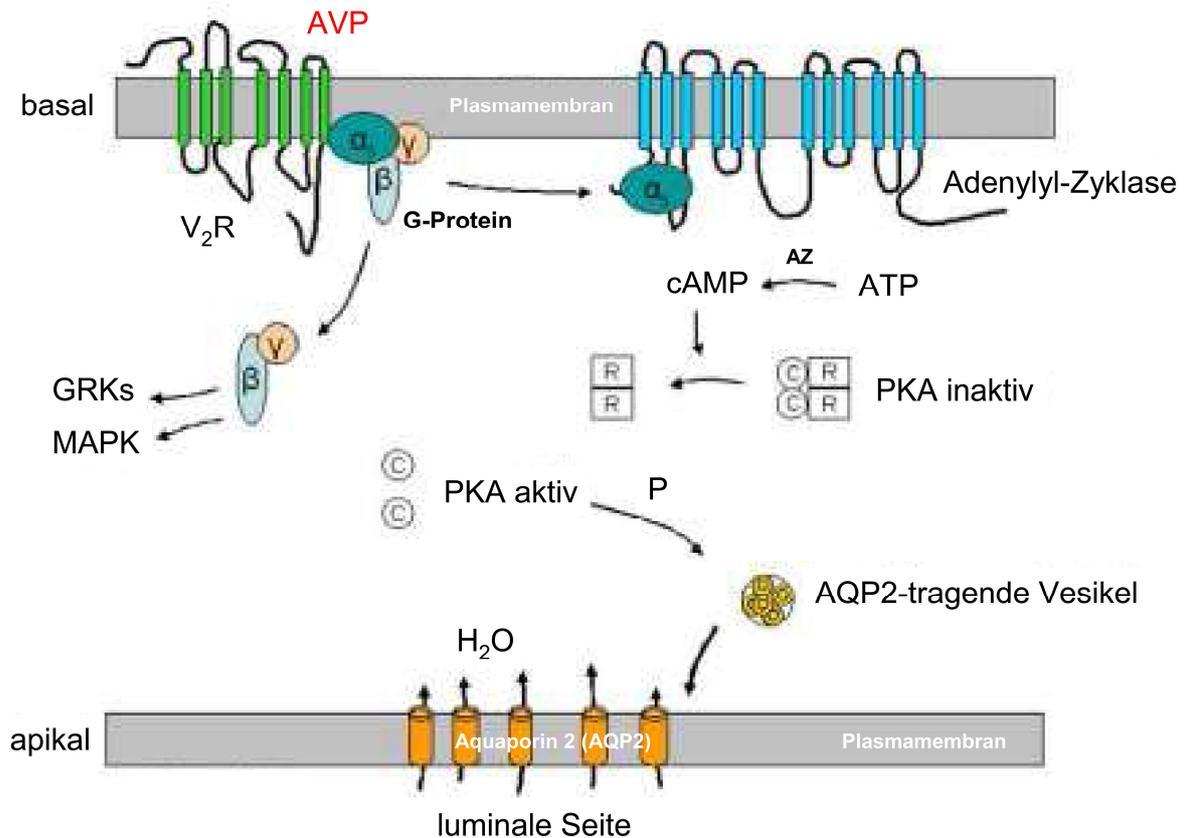
Diese aktivieren dann intrazelluläre Signalkaskaden. Heterotrimere G-Proteine bestehen aus einer  $\alpha$ -Untereinheit und einem  $\beta/\gamma$ -Dimer. Nach Aktivierung der GPCR katalysiert dieses Dimer den Austausch von GDP zu GTP an der  $\alpha$ -Untereinheit.  $\beta/\gamma$ -Dimer und  $\alpha$ -Untereinheit dissoziieren und können so ein breites Spektrum absteigender Effektoren stimulieren. Die Art der  $\alpha$ -Untereinheit bestimmt den aktivierten Signalweg.  $G\alpha_s$  und  $G\alpha_i$  modulieren Adenylylzyklen und damit cAMP-Konzentrationen, während  $G\alpha_{q/11}$  die Phospholipase C aktiviert, die die Spaltung von Phosphatidylinositol-Diphosphat in die Botenstoffe Diacylglycerol und Inositol-(1, 4, 5)-Triphosphat katalysiert (Marinissen und Gutkind, 2001).  $G\alpha_{12/13}$  vermittelt die Aktivierung von Rho-GTPasen. Das  $\beta/\gamma$ -Dimer kontrolliert den Ionentransport durch Membrankanäle und die Modulation von Phospholipasen und Lipidkinasen und reguliert damit ebenfalls Zellfunktionen.  $\beta/\gamma$ -Dimere können auch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und Mitglieder des Mitogen-aktivierten-Proteinkinase-(MAPK)-Reaktionswegs (Src, Ras) aktivieren.

Der  $V_2R$  zeigt die typische Struktur eines GPCR. In seiner reifen und posttranslational modifizierten Form weist der  $V_2R$  eine N-Glykosylierung am Asparagin 22 (N22) (Sadeghi et al., 1997) und O-Glykosylierungen an N-terminalen Serinen und/oder Threoninen auf (Sadeghi und Birnbaumer, 1999). Eine Disulfidbrücke wird zwischen C112 in der 1. extrazellulären Schleife und C192 in der 2. extrazellulären Schleife geknüpft. Der  $V_2R$  wird an den benachbarten Cysteinen C341 und C342 im C-Terminus palmitoyliert und damit zusätzlich in der Membran verankert (Schüle et al., 1996; Schüle et al., 2000).

In der stationären Phase sind Synthese und Abbau des  $V_2R$  im Gleichgewicht. Neusynthetisierte, unreife Rezeptoren sind im ER und ERGIC lokalisiert, während reife Rezeptoren im Golgi-Apparat und an der Plasmamembran zu finden sind. Um eine konstante Rezeptorzahl in der Plasmamembran zu erhalten, werden redundante Rezeptoren von der Plasmamembran konstitutiv internalisiert, indem sie stabil mit  $\beta$ -Arrestin2 und Ubiquitin assoziieren. Internalisierte Rezeptoren werden in Lysosomen abgebaut und recyceln daher nicht zur Plasmamembran (Shenoy und Lefkowitz, 2003; Schmidt et al., 2009; Schwieger et al., 2008).

### 1.4.1 Physiologische Bedeutung des Vasopressin-V<sub>2</sub>-Rezeptors

Der V<sub>2</sub>R wird durch das *APVR2*-Gen codiert, das auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms lokalisiert ist (Rosenthal et al., 1992; Oksche und Rosenthal, 1998). Der V<sub>2</sub>R wird in den epithelialen Prinzipalzellen des Sammelrohrs der Niere, im dünnen und dicken aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife (Nonoguchi et al. 1995; Schülein et al. 1998a) und in den Arkaden des Nierenkortex (Kishore et al., 1996) exprimiert. In den Epithelzellen wird der Rezeptor vorwiegend an die basolaterale Membran, d.h. zur Blutseite transportiert (Nonoguchi et al., 1995). Der Ligand des V<sub>2</sub>R, das 8-Arginin-Vasopressin (AVP) (auch antidiuretisches Hormon, ADH genannt), gelangt über das Blut zum Rezeptor und wird bei Wassermangel, bzw. bei einem Anstieg der Plasmaosmolarität auf 2%, von der Neurohypophyse freigesetzt (Oksche et al., 1998). AVP bewirkt im Sammelrohr eine regulierte Wasserrückresorption (Klussmann et al., 2000) (s. Abb. 1.7). Die hochaffine Bindung von AVP an den V<sub>2</sub>R führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und auf der zytosolischen Seite zur Aktivierung des G<sub>s</sub>-Proteins. Durch die  $\alpha$ -Untereinheit erfolgt eine Stimulation der membranständigen Adenylzyklase, die aus ATP den intrazellulären Botenstoff cAMP bildet. Die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) wird aktiviert und das in der Membran von Vesikeln vorliegende Wasserkanalprotein Aquaporin2 (AQP2) phosphoryliert. Die Phosphorylierung führt schließlich zur Fusion der Vesikel mit der apikalen Membran der Sammelrohrzelle (Klussmann et al., 2000). An der apikalen Urinseite ermöglichen die Wasserkanäle den Einstrom von Wassermolekülen aus dem Urin in die Zelle und damit die Konzentration des Primärharns. Das Wasser wird von der Zelle basolateral durch konstitutiv exprimierte AQP3- und AQP4-Kanäle ins Interstitium geleitet. Die treibende Kraft ist dabei der osmotische Gradient zwischen dem Lumen des Sammelrohrs und dem Interstitium.



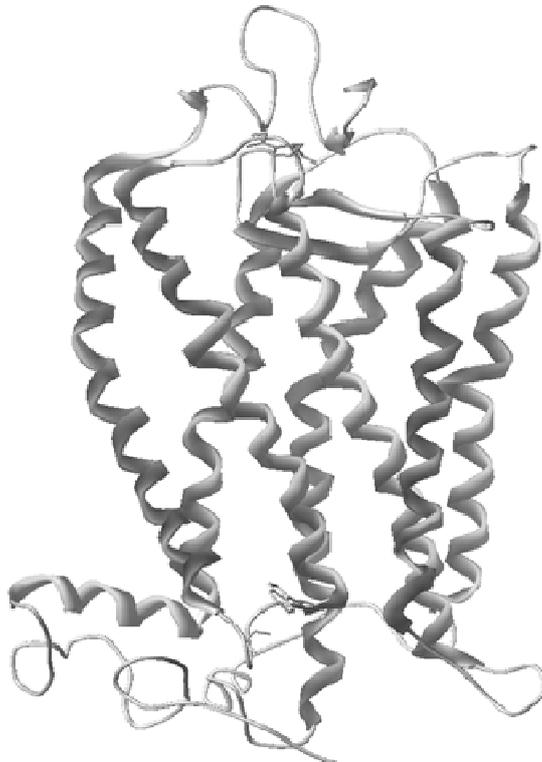
**Abb. 1.7: Mechanismus der AVP-vermittelten Wasserrückresorption aus dem Primärharn in der Niere.** Modifiziert nach Schwieger (2008). Die Bindung von AVP an den  $V_2R$  führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und damit zur Aktivierung des  $G_s$ -Proteins. Die  $\alpha$ -Untereinheit von  $G_s$  stimuliert die membranständige Adenylzyklase, die aus ATP cAMP bildet. Durch die erhöhte cAMP-Konzentration wird die Proteinkinase A (PKA) aktiviert, die das Wasserkanalprotein AQP2, das in Vesikeln vorliegt, phosphoryliert. Die phosphorylierten Vesikel fusionieren mit der apikalen Membran der Sammelrohrzelle (Klussmann et al., 2000). Durch die Wasserkanäle können Wassermoleküle aus dem Urin in die Zelle strömen und der Primärharn wird aufkonzentriert.

### 1.4.2 Topologiemodelle für den Vasopressin- $V_2$ -Rezeptor

Für den humanen  $V_2R$  ist keine kristalline Struktur bekannt. In der Literatur wurde aber ein Strukturmodell beschrieben, das auf der Struktur des Rhodopsins beruht (Krause et al., 2000). Hier basiert die räumliche Anordnung der  $\alpha$ -helikalen Domänen auf den Elektronendichtekarten des Frosch-Rhodopsins (Unger et al., 1997). Diese Domänen wurden als transmembranäre Bereiche des Rezeptors definiert. Die Startkonformationen der ersten, zweiten und dritten intrazellulären Schleife und des intrazellulären C-Terminus basieren auf der NMR-Struktur der zytosolischen Bereiche des Rinder-Rhodopsins (Yeagle et al., 1997). Zur Modellierung der extrazellulären Schleifen wurden bereits bekannte Peptidstrukturen ausgewählt.

Das dreidimensionale Modell des V<sub>2</sub>R konnte durch die Aufklärung der kristallinen Struktur des  $\beta$ -adrenergen Rezeptors (Rosenbaum et al., 2007; Cherezov et al., 2007) in Kooperation mit der AG Strukturelle Bioinformatik (G. Krause, FMP Berlin) weiter verbessert werden. Die genaue Vorgehensweise zur Modellierung ist in Abschnitt 3.1 beschrieben. Durch diese Vorgehensweise konnten insbesondere die Grenzen der  $\alpha$ -helikalen Domänen neu festgelegt werden. Die vorliegende Arbeit basiert auf dem neuen 3D-Modell des V<sub>2</sub>R. Ein vereinfachtes, in die Ebene projiziertes zweidimensionales Topologiemodell zeigt Abbildung 1.9. Das neue Topologiemodell stellt die Grenzen  $\alpha$ -helikaler Strukturen in Homologie zum Rhodopsin und zum  $\beta$ -adrenergen Rezeptor dar. Wichtig ist, dass die  $\alpha$ -Helizes nicht nur auf die Membran beschränkt sein müssen, sondern auch in die hydrophile Umgebung reichen können. Für Rhodopsin und den  $\beta$ -adrenergen Rezeptor ist bereits beschrieben, dass die  $\alpha$ -Helizes der 5. und 6. intrazellulären Schleife aus der Membran herausreichen. Dabei sind die hydrophoben Bereiche der Helizes einander zugewandt und die hydrophilen zeigen in das wässrige Milieu (Rosenbaum et al., 2007; Cherezov et al., 2007). Es ist deshalb nicht mehr sinnvoll den Verlauf der Membran in diesem Modell darzustellen, wie es früher üblich war. Zusätzlich konnte in Homologie zum  $\beta$ -adrenergen Rezeptor (Cherezov et al., 2007) eine 8.  $\alpha$ -Helix im intrazellulären Bereich des Rezeptors modelliert werden, die über die Palmitoylierungen der Cysteine C341 und C342 an der Membran verankert ist.

(A)



(B)

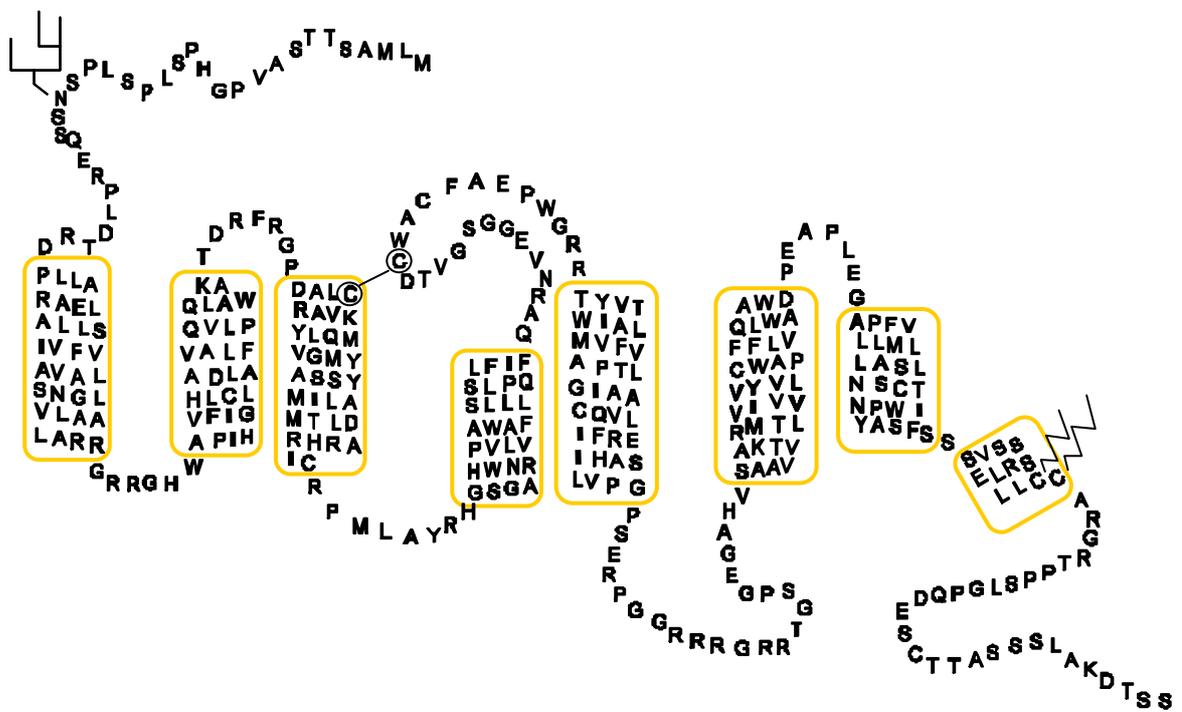


Abb. 1.8: Neues Rezeptormodell des Vasopressin-V<sub>2</sub>-Rezeptors.

(A) Dreidimensionales Rezeptormodell des V<sub>2</sub>R, bei dem die  $\alpha$ -helikalen Strukturen in Homologie zum Rinderrhodopsin und zum humanen  $\beta$ -adrenergen Rezeptor berechnet wurden.

- (B) Vereinfachtes zweidimensionales Topologiemodell, das auf dem 3D-Modell in (A) beruht. Das Topologiemodell eignet sich besser zur Darstellung der Positionen der Aminosäuren im Rezeptor. Die 371 Aminosäuren des V<sub>2</sub>R sind im Einbuchstaben-Code aufgeführt. Die Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen C112 und C192, die Palmitoylierungen der Cysteine C341 und C342 und die N-Glykosylierung am Asparagin 22 sind gekennzeichnet. Die extrazellulären, intrazellulären und  $\alpha$ -helikalen (als gelbe Tonnen) Bereiche des Rezeptors sind schematisch dargestellt.

---

## 1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Es wurde bereits beschrieben, dass V<sub>2</sub>R-Mutanten in unterschiedlichen intrazellulären Kompartimenten retiniert werden können (Hermosilla et al., 2004; Oueslati et al., 2005). Klasse A-Mutanten werden vollständig im ER retiniert. Klasse B-Mutanten erreichen dagegen post-ER Kompartimente.

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe zahlreicher artifizieller V<sub>2</sub>R-Mutanten zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Lokalisation einer Mutation im Protein und dem Retentionsmechanismus gibt. So könnten z.B. Mutationen in den intra- und extrazellulären Schleifen zu weniger ausgeprägten Defekten führen, die ein Entkommen aus dem ER ermöglichen. Mutationen in den  $\alpha$ -helikalen Strukturen könnten dagegen zu schweren Faltungsdefekten führen, die zu einer ausschließlichen ER-Retention führen. Auch die Lokalisation einer Mutation im N- oder im C-terminalen Bereich des Rezeptors könnte einen Einfluss auf den Retentionsmechanismus haben, da die Glykosylierung des Rezeptors im N-Terminus erfolgt und lektinartige Chaperone damit bevorzugt N-terminal binden könnten.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte ein Assay etabliert werden, mit dem man im Hochdurchsatzverfahren nach Substanzen suchen kann, die den intrazellulären Transport der Rezeptormutanten beeinflussen. Mit diesem Assay könnten Substanzen detektiert werden, die die richtige Faltung von V<sub>2</sub>R-Mutanten erleichtern (chemische und/oder pharmakologische Chaperone) und diese so dem Qualitätskontrollsystem entziehen. Alternativ könnten auch Inhibitoren der Qualitätskontrolle gefunden werden.