

3. Ergebnisse

3.1 Modellierung und Herstellung von artifiziellen V₂R-Mutanten

Es sind bereits zahlreiche Mutationen des V₂R bekannt, die zu einem Faltungs- bzw. Transportdefekt der Rezeptoren führen und dadurch NDI verursachen (Oksche et al., 1998; Wüller et al., 2004). Allerdings sind diese krankheitsauslösenden Mutationen nicht gleichmäßig über den Rezeptor verteilt. Ferner finden sich unter den faltungsdefekten Rezeptormutanten auch Deletionsmutanten und Mehrfachmutanten, die für die geplante Untersuchung nicht geeignet sind. Um die Bandbreite von Punktmutationen zu erweitern, wurden in Kooperation mit der AG Strukturelle Bioinformatik (G. Krause, FMP Berlin) mit Hilfe eines *Molecular-Modelling* Ansatzes Mutationen abgeleitet, die zu einem maximalen Faltungs- und Transportdefekt führen sollten. Das hierfür notwendige Strukturmodell des V₂R wurde mit Hilfe der publizierten Kristallstruktur des Rhodopsins (Palczewski et al., 2000; Li et al., 2004; Okada, 2004) und des β -adrenergen Rezeptors berechnet (Cherezov et al. 2007; Rosenbaum et al. 2007).

Die Aminosäuresequenzen des V₂R, des Rhodopsins und des β -adrenergen Rezeptors wurden mit dem Programm SeqLab (Wisconsin Package Version 10.2, Accelrys Inc. San Diego, USA) verglichen und korrigiert. Die räumliche Struktur der α -helikalen Domänen des V₂R basierte auf der dreidimensionalen Struktur des Rinder-Rhodopsins (Proteindatenbank Zugangscode: 1F88, 1HZX, 1L9H, 1U19) und des humanen β -adrenergen Rezeptors (Proteindatenbank Zugangscode: 2RH1, 2RH5). Die extra- und intrazellulären Schleifen wurden modelliert, indem zunächst Teilsequenzen ausgewählt wurden, für die bereits Peptidstrukturen in einer Proteindatenbank hinterlegt waren (PDB 3D-Datenbank; Brookhaven National Laboratory, Brookhaven, USA). Hierfür wurden nur Fragmente verwendet, die mehr als einmal mit der gleichen Struktur in der Datenbank vorhanden waren. Die einzelnen Fragmente des Modells wurden unter Verwendung der Module des Sybyl-Programmpaketes zusammengefügt. Danach erfolgte eine Energiedynamiksimulation des V₂R-Modells mit Hilfe des AMBER 8.0 Kraftfelds (Case, 2002).

Bei dieser Energiedynamiksimulation wurde die Energie des Proteins bis zu einer Energieänderung von $\Delta E < 0,05 \text{ kcal}/(\text{mol} \cdot \text{\AA})$ minimiert. Dafür wurde das Modell in eine

dreiphasische Wasser-Vakuum-Wasser Umgebung überführt. Hier befinden sich die extra- und intrazellulären Bereiche des Rezeptors in einem Wassermilieu und der α -helikale Teil im Vakuum. Die Atome des Rezeptors wurden fixiert, so dass sich das Wasser frei bewegen konnte und sein minimales Energieniveau erreichte. Die Ladungen im Rezeptor wurden durch Zugabe von Ionen neutralisiert. Die Energiedynamiksimulation wurde bei 300 K durchgeführt. Die geometrische Qualität des Modells wurde mit dem Programm PROCHECK (Laskowski, 1993) überprüft.

Es wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt, dass verschiedene NDI-verursachende Mutationen in der Lage sind, das ER zu verlassen, dann aber in post-ER Kompartimenten (z.B. im ERGIC) als fehlgefaltet erkannt und retiniert werden (Hermosilla et al, 2004; Oueslati et al, 2007). Mit Hilfe der artifiziellen Mutanten sollte nun zum ersten Mal systematisch untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen Ort der Mutation im Rezeptor und Retentionsmechanismus gibt. Insgesamt wurden 46 Punktmutationen errechnet und durch gerichtete Mutagenese in den Rezeptor eingefügt. 31 Mutanten enthielten eine Mutation in den α -helikalen Domänen (P34E, A42K, L44R, F48A, F48R, A52I, A72W, A89I, A84E, Q92P, A125I, T134A, T134R, W156D, A163E, S171R, V213R, P217E, I221E, A223I, A223K, I232N, P238E, G239E, S263W, T273R, V277R, A314W, S318I, S318L, I324E). Für die extrazellulären Schleifen (EVS) wurden 10 Mutanten (P17R, R32E, G107R, P108E, F196K, E198A, R202A, A300R, P301D, E303R) und für die intrazellulären Schleifen des Rezeptors (IVS) wurden 5 Mutanten hergestellt (G69D, W71D, P144N, A147R, G250E). Die Verteilung der Mutationen im Rezeptor ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

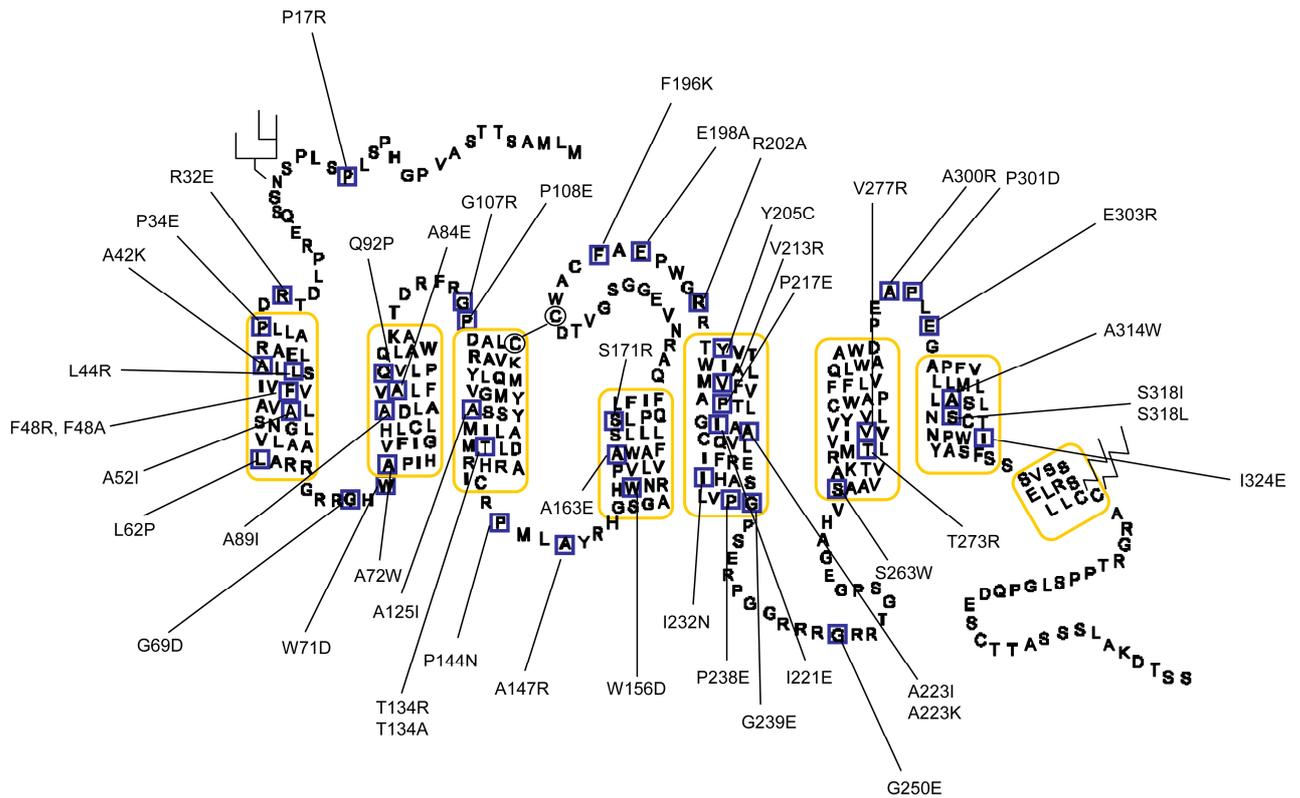


Abb. 3.1: Lokalisation der artifziellen Mutanten des V₂R in einem zweidimensionalen Topologiemodell. Dieses Topologiemodell ist von dem in Abschnitt 3.1 beschriebenen dreidimensionalen Modell des V₂R abgeleitet. Die 371 Aminosäuren des Rezeptors sind im Einbuchstaben-Code angegeben. Die α -helikalen Domänen sind als gelbe Tonnen gekennzeichnet. Die eingefügten Punktmutationen sind mit blauen Kästchen markiert.

Im Folgenden wurden die Mutanten *in situ* lokalisiert und die Schwere des Faltungsdefekts mit biochemischen Methoden charakterisiert. Ferner wurde untersucht, ob die Mutanten in der Lage waren das ER zu verlassen und in welchem Umfang sie die Plasmamembran erreichen.

3.2 Charakterisierung der artifiziellen V₂R-Mutanten

Die errechneten Mutationen wurden durch Mutagenese in die cDNA des V₂R eingefügt. Zur Überprüfung, ob die eingefügten Mutationen zu einem faltungs- und damit transportdefekten Protein führen, wurden zunächst mikroskopische Methoden (*konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie*) eingesetzt.

3.2.1 Lokalisation der GFP-markierten Rezeptoren in transient transfizierten HEK293 Zellen mit Hilfe *konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie*

Die Einteilung der Mutanten in transportdefekt bzw. wildtypisch erfolgte zunächst qualitativ. Hierfür wurden alle Rezeptoren mit dem *grünfluoreszierenden Protein* (GFP) fusioniert und mittels *konfokaler Laser Scanning Mikroskopie* (LSM) in lebenden, transient transfizierten HEK293 Zellen lokalisiert.

Es wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt, dass der GFP-Anteil des Moleküls die Rezeptorfunktion und den Transport nicht beeinflusst (Oksche et al., 1998). Um festzustellen, ob die Rezeptoren die Plasmamembran erreichen, wurden zuerst die GFP-Signale aufgenommen (Abb. 3.2 linkes Bild, grüner Kanal). Danach wurden die Plasmamembranen derselben Zellen mit Trypanblau gefärbt (Abb. 3.2 mittleres Bild, roter Kanal) und die Signale aus beiden Kanälen mit Hilfe des Computers überlagert (Abb. 3.2 rechtes Bild). Eine Kolokalisation der GFP- und Trypanblaufluoreszenzen ist in gelb dargestellt.

Die GFP-Signale des wildtypischen Rezeptors (Positivkontrolle) zeigten eine Überlagerung mit den Trypanblausignalen der Plasmamembran (Abb. 3.2, WT). Daraus folgt, dass der wildtypische Rezeptor erwartungsgemäß die Plasmamembran erreicht. Es waren aber auch intrazelluläre vesikuläre GFP-Signale erkennbar. Dabei handelte es sich um internalisierte Rezeptoren aus Endosomen (Schmidt et al., 2009).

Es lässt sich aber nicht ausschließen, dass es sich hierbei auch um retinierte Rezeptoren handelt. Eine Retention könnte durch die Überexpression der Rezeptoren nach transienter Transfektion entstehen, da diese zum Teil zu einer Absättigung der Transportmechanismen des sekretorischen Weges führen könnten.

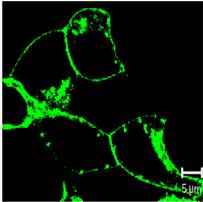
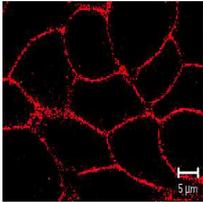
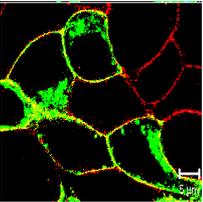
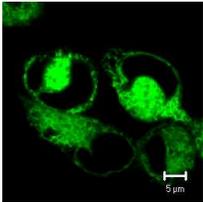
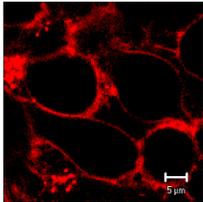
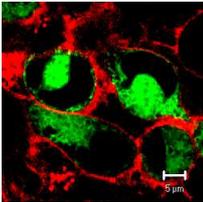
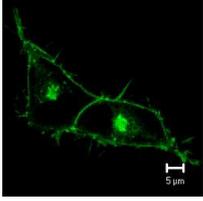
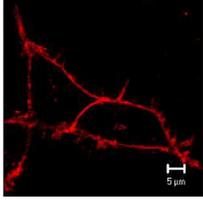
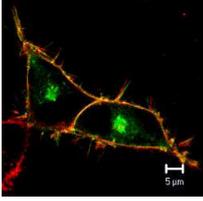
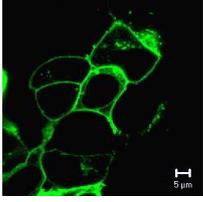
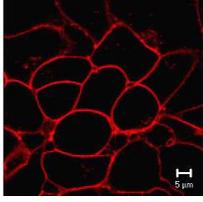
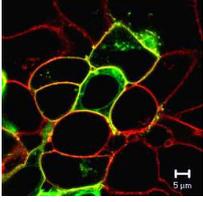
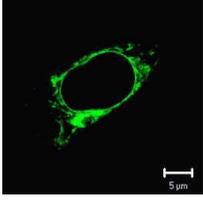
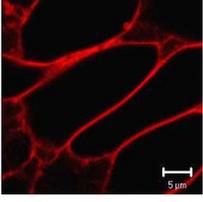
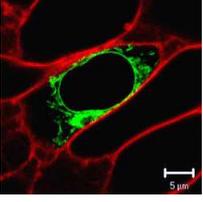
	GFP-Fluoreszenz	Trypan Blau-Fluoreszenz	Überlagerung	Lokalisation der Mutation im Rezeptor	Intrazellulärer Transport
WT					erreicht Plasmamembran
F48A				1. α -Helix	intrazellulär retiniert
R202A				2. extrazelluläre Schleife	erreicht Plasmamembran
G250E				3. intrazelluläre Schleife	intrazellulär retiniert erreicht aber auch die Plasmamembran
A314W				7. α -Helix	intrazellulär retiniert

Abb. 3.2: Lokalisation des wildtypischen Rezeptors (WT) und GFP-markierter V_2R -Mutanten (F48A, R202A, G250E, A314W) in der Plasmamembran in lebenden, transient transfizierten HEK293 Zellen. Die Rezeptormutanten wurden beispielhaft ausgewählt, um die unterschiedlichen Transportraten darzustellen (vollständige Analyse im Anhang). Die Bilder zeigen x/y-Scans, die mit Hilfe des Laser-Scanning-Mikroskops aufgenommen wurden. Links ist in grün die GFP-Fluoreszenz der Rezeptoren dargestellt. Die Bilder in der Mitte zeigen die Färbung der Plasmamembran derselben Zellen durch Trypanblau (rot). Die rechten Bilder zeigen die computergestützte Überlagerung der GFP- und Trypanblau-Fluoreszenzen. Kolokalisationen werden in gelb dargestellt. Der Größenmaßstab beträgt 5 μ m.

Für die artifiziellen Mutanten wurden unterschiedliche Transporteffizienzen gefunden (s. Abb. 3.2, es sind nur einige Mutanten exemplarisch gezeigt; die vollständige Analyse befindet sich im Anhang). Erwartungsgemäß erreichten nur wenige die Zellmembran. Die extrazelluläre Mutante R202A zeigte einen wildtypischen Transport (Abb. 3.2, R202A). Die extrazellulären Mutanten R32E, G107R, P108E, F196K, E303R, die α -helikalen Mutanten P34E, A42K, L44R, F48A, F48R, A52I, A72W, A84E, Q92P, A125I, T134A, T134R, W156D, A163E, S171R, V213R, P217E, I221E, A223I, I232N, P328E, G239E, S263W, T273R, V277R, A314W, S318I, S318L, I324E und die intrazellulären Mutanten G69D,

W71D, P144N, A147R zeigten eine starke intrazelluläre Retention und es konnte keine Lokalisation an der Plasmamembran detektiert werden (Abb. 3.2, siehe Mutanten F48A und A314W). Die GFP-Signale der extrazellulären Mutanten P17R, E198A, A300R, P301D, der α -helikalen Mutanten A89I und A223K und der intrazellulären Mutante G250E kolokalisierten schwach mit dem Membranmarker, was auf einen partiellen Transportdefekt hindeutet (Abb. 3.2, G250E).

Mit dieser Methode konnte ein erster Überblick über das Transportverhalten der V₂R-Mutanten gegeben werden. Die *Laser-Scanning-Mikroskopie* ist aber eine Einzelzellmethode, so dass keine quantitative Aussage über die Transportdefekte der Mutanten getroffen werden konnten. Zur quantitativen Bestimmung wurde deshalb im nächsten Schritt mittels Biotinylierungsexperimenten die Oberflächenexpression der Rezeptormutanten bestimmt. Mit dieser biochemischen Methode kann eine Vielzahl von Zellen analysiert werden und es lässt sich eine genauere Aussage über die Transporteffizienzen der Mutanten treffen.

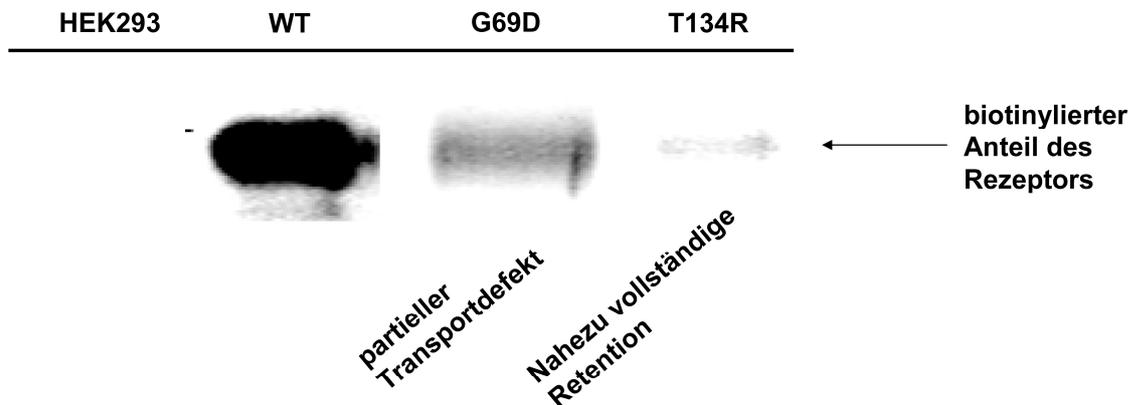
3.2.2 Oberflächenexpression des GFP-markierten V₂R und seiner Mutanten

Die Biotinylierungsexperimente wurden in transient transfizierten HEK293 Zellen durchgeführt. Bei dieser Methode werden freie Aminogruppen in den extrazellulären Bereichen von Proteinen an der Zelloberfläche zunächst mit Sulfo-NHS-Biotin markiert. Nach Zellyse wurden alle V₂R mit dem polyklonalen GFP-Antikörper GFP02 immunpräzipitiert und die biotinylierten Rezeptoren auf einem Immunoblot mit Hilfe eines monoklonalen GFP-Antikörpers detektiert und quantifiziert. Als Kontrollen wurden die NDI-Mutanten L62P und Y205C mitgeführt. Die Eigenschaften dieser Mutanten sind bereits gut charakterisiert und eignen sich daher gut, um unterschiedliche Transporteffizienzen zuordnen zu können (Hermosilla et al., 2004; Oueslati et al., 2007; Schwieger et al., 2008). Die Mutante L62P ist ein Beispiel für einen vollständig transportdefekten Rezeptor, der ausschließlich im ER retiniert wird. Im Gegensatz dazu ist die Mutante Y205C in der Lage, das ERGIC und in geringem Umfang die Plasmamembran zu erreichen. Diese Mutante ist daher eine gute Kontrolle für partiell retinierte Rezeptormutanten.

Mit Hilfe eines Biotinylierungsexperiments können alle Rezeptoren, die die Zelloberfläche erreichen, in Form einer immunreaktiven Proteinbande bei 63 kDa detektiert werden. Mannosereiche Formen sind nicht an der Zellmembran zu finden. In Abb. 3.3 sind beispielhaft die Proteinbanden für den wildtypischen Rezeptor und die Rezeptormutanten G250E (3. IZS) und T134R (3. α -Helix) dargestellt.

Im Vergleich zum wildtypischen Rezeptor war die Expression der Mutante G250E in der Plasmamembran deutlich schlechter (partieller Transportdefekt). Die Mutante T134R wurde dagegen nahezu vollständig intrazellulär retiniert (Abb. 3.3 a). Die Proteinbanden und damit die Expression in der Plasmamembran wurden durch Messung der Farbdichte mit dem Analyseprogramm *Quant1 analysis* von *Odyssey*[®] *LI-COR*[®] densitometrisch quantifiziert (Abb. 3.3 b).

(A)



(B)

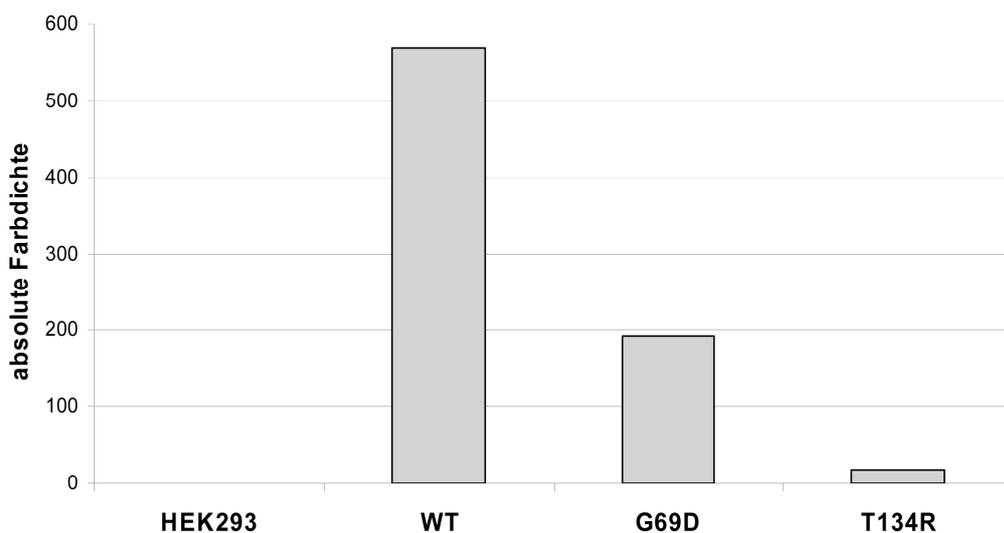


Abb. 3.3: Oberflächenexpression exemplarischer V₂R-Mutanten und des wildtypischen Rezeptors.

(A) Die Oberflächenproteine von transient transfizierten HEK293 Zellen wurden biotinyliert, die gesamten Rezeptoren mit dem polyklonalen GFP-Antikörper GFP02 präzipitiert und die biotinylierten Rezeptoren an der Plasmamembran mit einem Anti-Biotin polyklonalen Primärantikörper und einem fluoreszenzmarkierten 2. Antikörper (IRdye 800, anti-Kaninchen IgG) detektiert. Es sind beispielhaft die biotinylierten Proteinbanden des wildtypischen Rezeptors und die Rezeptormutanten G250E (3. IZS) und T134R (3. α -Helix) dargestellt. Im Vergleich zum wildtypischen Rezeptor erreicht ein deutlich geringerer Teil der Rezeptormutante G250E die Plasmamembran, während T134R nahezu vollständig intrazellulär retiniert ist.

(B) Densitometrische Analyse der Proteinbanden mit dem Analyseprogramm *Quant1 analysis* von *Odyssey[®] LI-COR[®]*.

Mit Hilfe dieser Methode wurden die Intensitäten der biotinylierten Proteinbanden aller Rezeptormutanten bestimmt und auf den wildtypischen Rezeptor normalisiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.4 zusammengefasst.

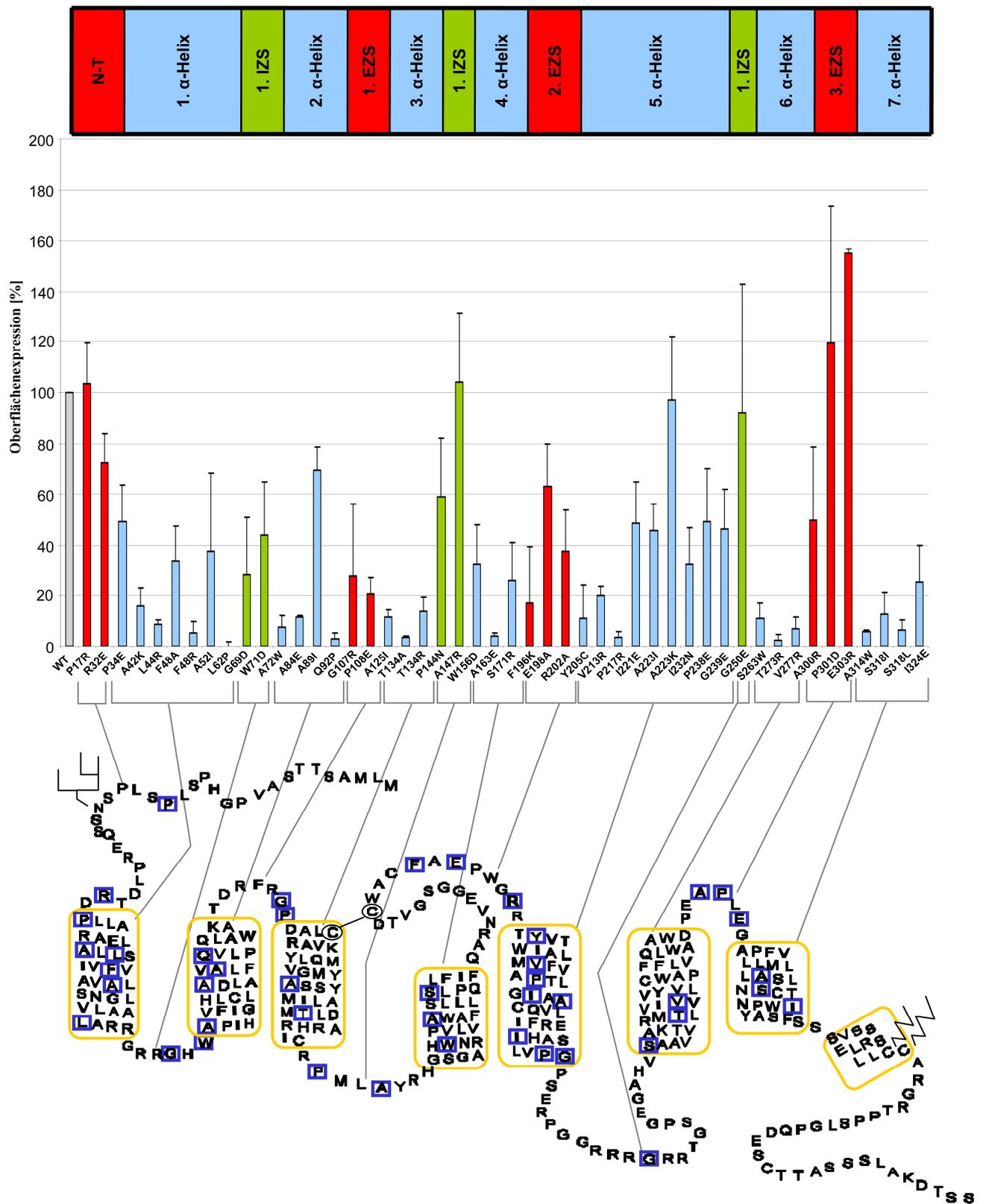


Abb. 3.4: Prozentuale Oberflächenexpression aller künstlichen V₂R Mutanten im Vergleich zum wildtypischen Rezeptor. Die Oberflächenproteine intakter HEK293 Zellen wurden biotinyliert, die V₂-Rezeptoren anschließend immunpräzipitiert. Nach der SDS-PAGE wurde der membranständige Teil der Rezeptoren auf einem Immunoblot mit Hilfe eines polyklonalen anti-Biotin-Antikörpers und eines fluoreszenzmarkierten Sekundäntikörpers (IRdye 800, anti-Kaninchen IgG) detektiert und densitometrisch quantifiziert. Dargestellt ist die Oberflächenexpression der α -helikalen (blaue Säulen), intrazellulären (grüne Säulen) und extrazellulären (rote Säulen) Rezeptormutanten (in % des wildtypischen Rezeptors). Die Lokalisation der Mutationen im Rezeptor zeigt schematisch der untere Teil der Abbildung.

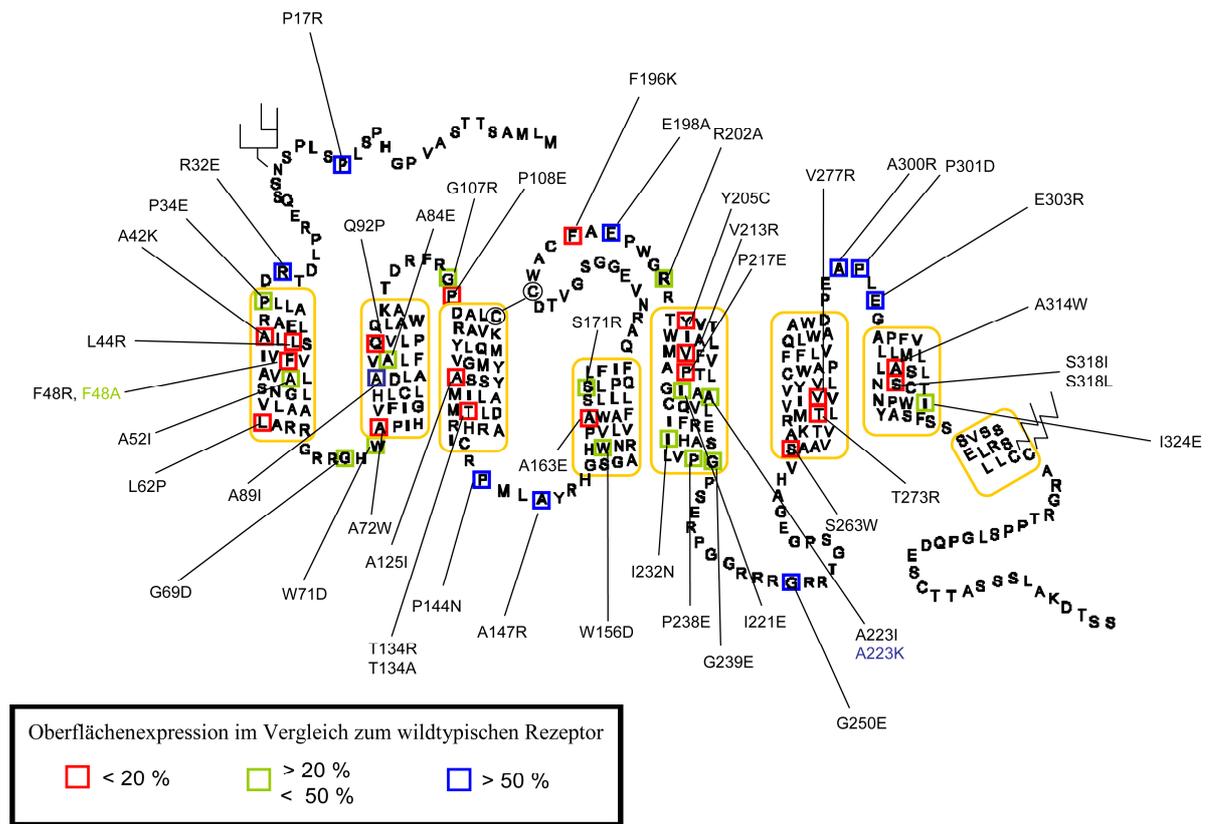
Um eine Übersicht über die Expression der einzelnen Mutanten in der Plasmamembran zu erhalten, wurden diese in Klassen eingeteilt. Bezugspunkt war hierbei der wildtypische Rezeptor. Alle Mutanten, die eine Oberflächenexpression $\leq 20\%$ im Vergleich zum wildtypischen Rezeptor zeigten, wurden als stark transportdefekt definiert. 58 % der α -helikalen Mutationen führten zu einem starken Faltungsdefekt und damit zu einer fast vollständigen Retention im ER (A42K, L44R, F48R, A72W, A84E, Q92P, A125I, T134A, T134R, A163E, V213R, P217R, S263W, T273R, V277R, A314W, S318I und S318L). In den extrazellulären Bereichen wurden nur 20 % (P108E, F196K) und in den intrazellulären Bereichen des Rezeptors wurde keine Mutation stark retiniert.

Mutanten, die eine Oberflächenexpression $> 20\% \leq 50\%$ im Vergleich zum wildtypischen Rezeptor zeigten, wurden als teilweise transportdefekt definiert. 36 % der Mutanten mit einer Mutation in den α -helikalen Domänen waren partiell transportdefekt (F48A, P34E, A52I, W156D, S171R, I221E, A223I, P328E, G239E, I232N, I324E). Für Mutanten mit einer Mutation im extrazellulären Bereich traf dies auf 30 % (G107R, R202A, A300R) und im intrazellulären Bereich auf 40 % (G69D, W71D) zu.

Die extrazellulären Mutanten R32E und E198A zeigten keinen Transportdefekt. Gleiches traf auf die α -helikalen Mutanten A89I, A223K und die intrazellulären Mutanten P144N, G250E zu. Die extrazellulären Mutanten P17R, P301D und E303R, sowie die intrazelluläre Mutante A147R zeigten im Vergleich zum wildtypischen Rezeptor sogar einen verbesserten Transport zur Plasmamembran.

Zusammengefasst wurden insgesamt 94 % der α -helikalen, 50 % der extrazellulären und 40 % der intrazellulären Mutanten als fehlgefaltet erkannt und stark oder partiell retiniert. Zur besseren Übersicht wurde die Expression der Rezeptormutanten im Rezeptormodell farbig dargestellt (s. Abb. 3.5a). Die prozentuale Verteilung der Transportdefekte zeigt Abb. 3.5b.

(A)



(B)

	stark transportdefekt	partiell transportdefekt
extrazellulär	20 %	30 %
α-helikale	58 %	36 %
intrazellulär	0 %	40 %

Abb. 3.5: Schematische Darstellung der Verteilung der künstlichen V₂R-Mutanten.

(A) Lokalisation der Mutationen im Rezeptormodell und Ausmaß des Transportdefekts. Mutanten mit einer Oberflächenexpression $\leq 20\%$ (stark transportdefekt) sind rot markiert. Partiiell transportdefekte Mutanten (Oberflächenexpression $> 20\% \leq 50\%$) sind grün markiert. Mutanten mit wildtypischen Transportraten sind blau gekennzeichnet.

(B) Prozentuale Verteilung von stark transportdefekten und partiell transportdefekten V₂R-Mutanten.

Diese Daten zeigen, dass Mutationen in den α -helikalen Bereichen zu schwereren Faltungs- und damit Transportdefekten führen, die deutlich stärker von den Komponenten des Qualitätskontrollsystems im sekretorischen Weg erkannt werden. Mutanten in den extrazellulären und intrazellulären Bereichen sind dagegen eher in der Lage post-ER Kompartimente zu erreichen.

Die Mutanten A52I, G250E und P301D zeigten in den Biotinylierungsexperimenten hohe Standardabweichungen. Vermutlich handelte es sich hier um Mutanten, die eine recht instabile Struktur haben und je nach physiologischem Zustand der Zellen mehr oder weniger gut vom Qualitätskontrollsystem erkannt wurden (s. Abb. 3.4).

Die aus den Transportstudien erhaltenen Daten erlauben auch eine Evaluierung des *Molecular-Modelling* Ansatzes zur Vorhersage von faltungsdefekten Mutanten. Von den insgesamt 46 hergestellten Mutanten waren 36 transportdefekt. Davon zeigten 20 Mutanten einen starken und 16 Mutanten einen partiellen Transportdefekt. *Molecular-Modelling* Methoden scheinen daher gut geeignet, entsprechende Studien auch zukünftig mit anderen Rezeptoren durchführen zu können.

3.2.2.1 Modellierung von V₂R-Mutanten mit vom Schema abweichenden Retentionsmustern

Wie in den Biotinylierungsexperimenten beschrieben, waren α -helikale Mutanten stärker faltungsdefekt und wurden stärker retiniert als Mutanten, die eine Mutation im extra- oder intrazellulären Bereich tragen. Von diesem Muster gab es Abweichungen. Die α -helikalen Mutanten A89I und A223K zeigten nur eine geringe Retention, während die intrazelluläre Mutante G69D und die extrazellulären Mutanten G107R, P108E und F196K nahezu vollständig im ER retiniert wurden. Für diese Mutanten wurde noch einmal in Kooperation mit der AG Strukturelle Bioinformatik (G. Krause, FMP Berlin) ein Strukturmodell berechnet, um Hypothesen für deren abweichendes Verhalten abzuleiten (s. Abb. 3.6).

Die extrazelluläre Mutante F196K (2. EZS) zeigte eine Oberflächenexpression von nur 17 % im Vergleich zum wildtypischen Rezeptor und wurde damit sehr stark retiniert. Diese Mutante trägt eine Mutation in der 2. extrazellulären Schleife. Das Modell in Abbildung 3.6 A deutet an, dass die unpolare hydrophobe Seitenkette von F196 mit dem Benzolring in Richtung der α -helikalen Domänen 5, 6 und 7 wechselwirken konnte. Dabei interagiert die Seitenkette des Phenylalanins mit weiteren aromatischen Strukturen der Aminosäuren W193 (2. EZS), F307 (7. α -Helix) und mit den hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren A294 (6. α -Helix) und V206 (5. α -Helix). Diese sogenannte *knob and hole* –Interaktion wäre sehr stabil. Durch den Austausch des Phenylalanins durch Lysin in der F196-Mutante wurde ein

hydrophiler Rest eingefügt, der diese stabile Bindung zerstört. Dies könnte die beobachtete starke Retention dieser Mutante erklären.

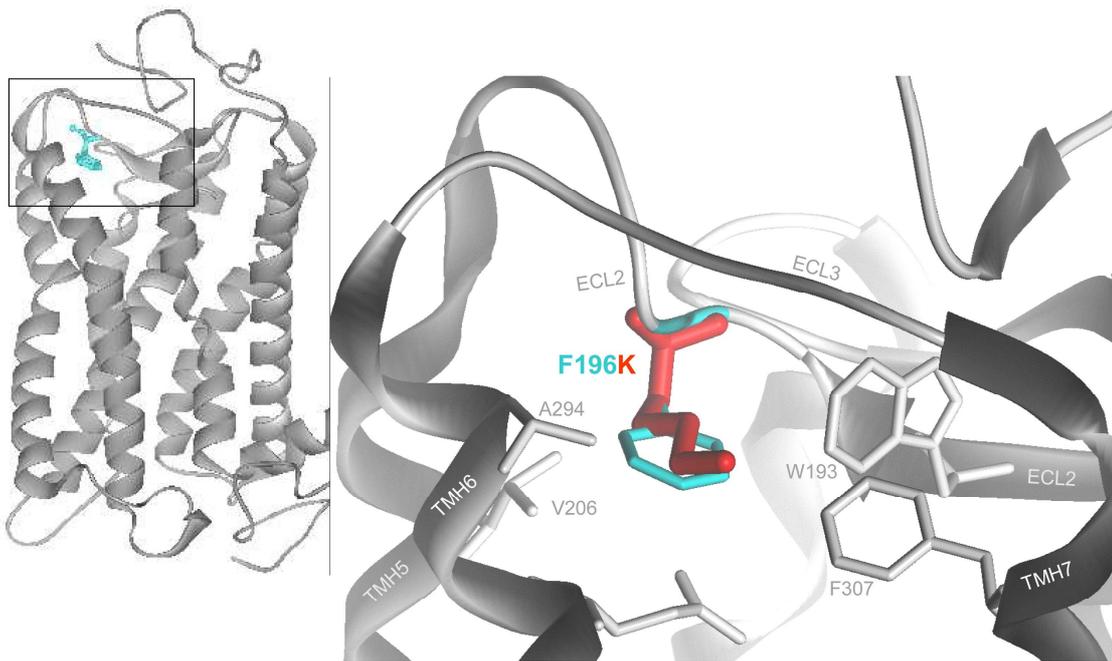
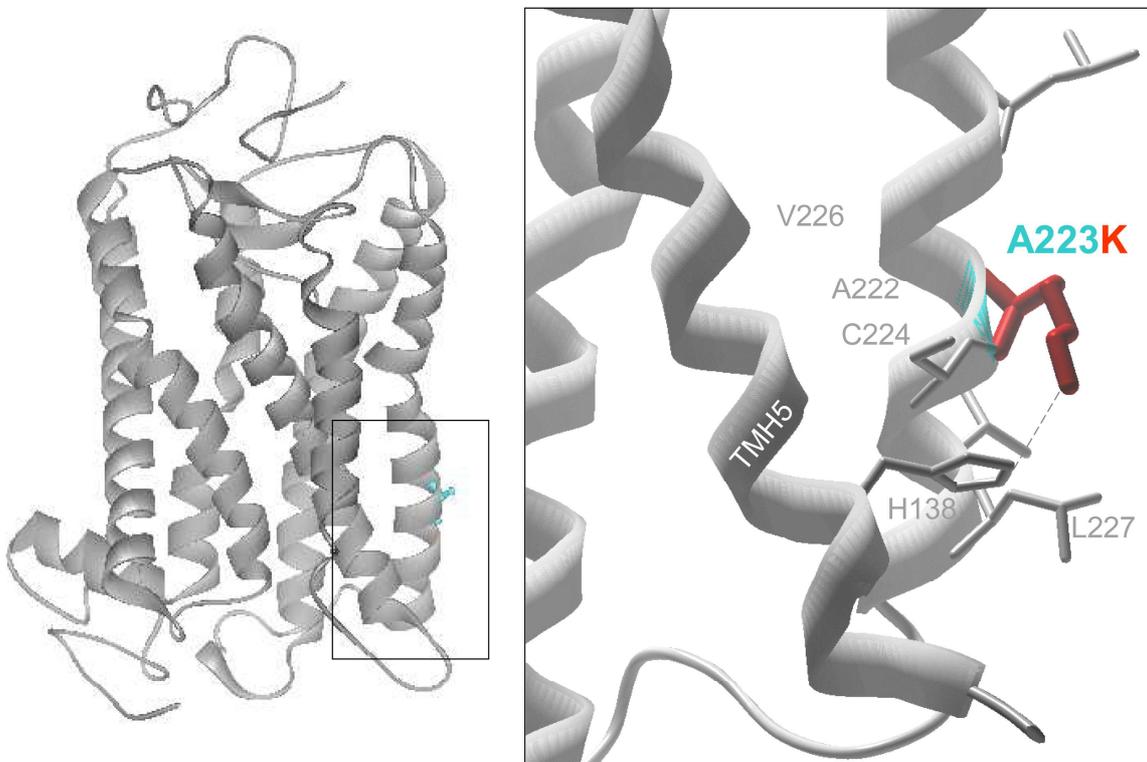
In den α -helikalen Domänen des V₂R zeigten 94 % der Mutanten eine starke bzw. partielle Retention. Eine Ausnahme bildete die Mutante A223K (5. α -Helix), die mit einer Oberflächenexpression von 97 % keinen Transportdefekt aufwies. Hier wurde die kurze Seitenkette des Alanins an Position 223 durch die basische Seitenkette des Lysins ausgetauscht (s. Abb. 3.6 B). Die Lysinseitenkette könnte eine Wasserstoffbrücke mit Histidin an der Position 138 in der 3. α -helikalen Domäne bilden. Dadurch konnte der Rezeptor wieder stabilisiert und so dem Qualitätskontrollsystem entzogen werden.

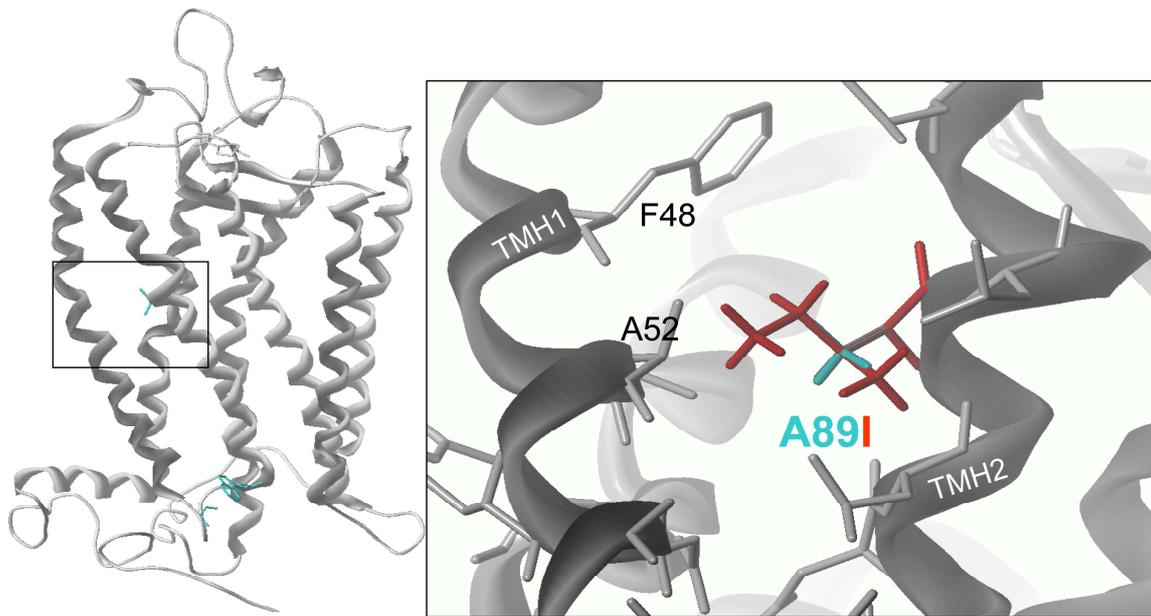
Die α -helikale Mutante A89I zeigte ebenfalls nur einen schwachen Transportdefekt (Oberflächenexpression: 69 %). Das dreidimensionale Modell in Abbildung 3.6 C zeigt den Austausch der kurzen Seitenkette des Alanins an Position 89 (2. α -Helix) gegen die unpolare Seitenkette des Isoleucins. Durch die Interaktion der Seitenkette des Isoleucins mit der kurzen Seitenkette des Alanins an Position 52 (2. α -Helix) könnte auch hier die Rezeptorstruktur wieder stabilisiert werden und dadurch der Faltungs- bzw. Transportdefekt geringer ausfallen.

Die extrazellulären Mutanten G107R und P108E (2. EZS) wurden fast vollständig retiniert. Sie sind Bestandteile des hochkonservierten FXGP-Motivs in der ersten extrazellulären Schleife (s. Abb. 3.6 D). Hier sorgen die Aminosäuren Glycin und Prolin für ein Abknicken der Schleife zur 3. α -helikalen Domäne. Der Bereich in dem sich der Rezeptor hier falten kann, ist sehr kompakt, sodass eine Mutation in diesem Bereich die korrekte Faltung erheblich stören und so den Transportdefekt erklären könnte.

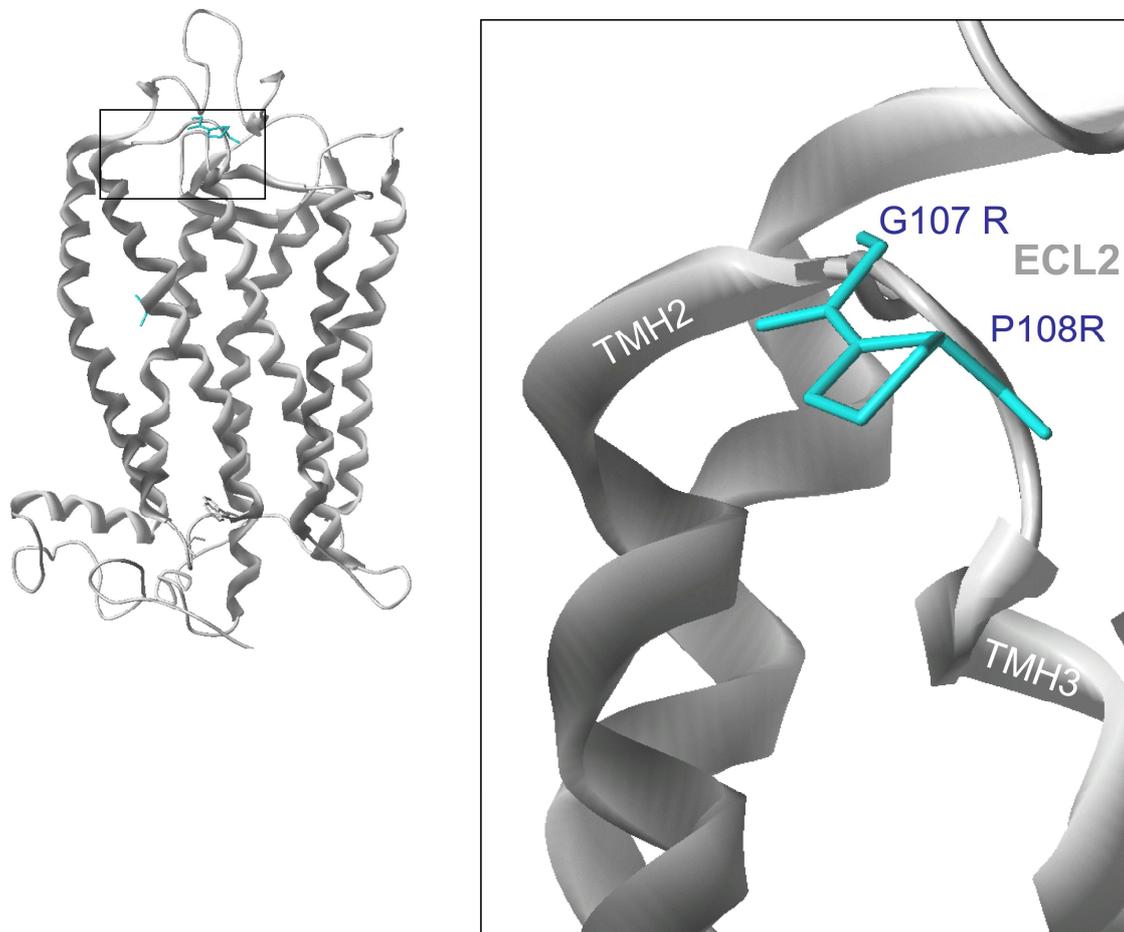
Die intrazelluläre Mutante G69D trägt eine Mutation in der 1. intrazellulären Schleife und zeigte ebenfalls eine starke intrazelluläre Retention (Oberflächenexpression: 28 %). Im Strukturmodell zeigt die 1. IZS eine dichte räumliche Struktur und interagiert mit der 8. α -Helix (s. Abb. 3.6 E). Durch den Austausch von Glycin gegen Asparaginsäure könnte diese stabile Struktur durch die negative Ladung aufgebrochen werden und so die Retention dieser Mutante erklären.

(A) F196K (2. EZS): extrazellulär

(B) A223K (4. α -Helix): α -helikal

(C) A89I (2. α -Helix): α -helikal

(D) G107R/P108E (2. EZS): extrazellulär



(E) G69D (1. IZS): intrazellulär

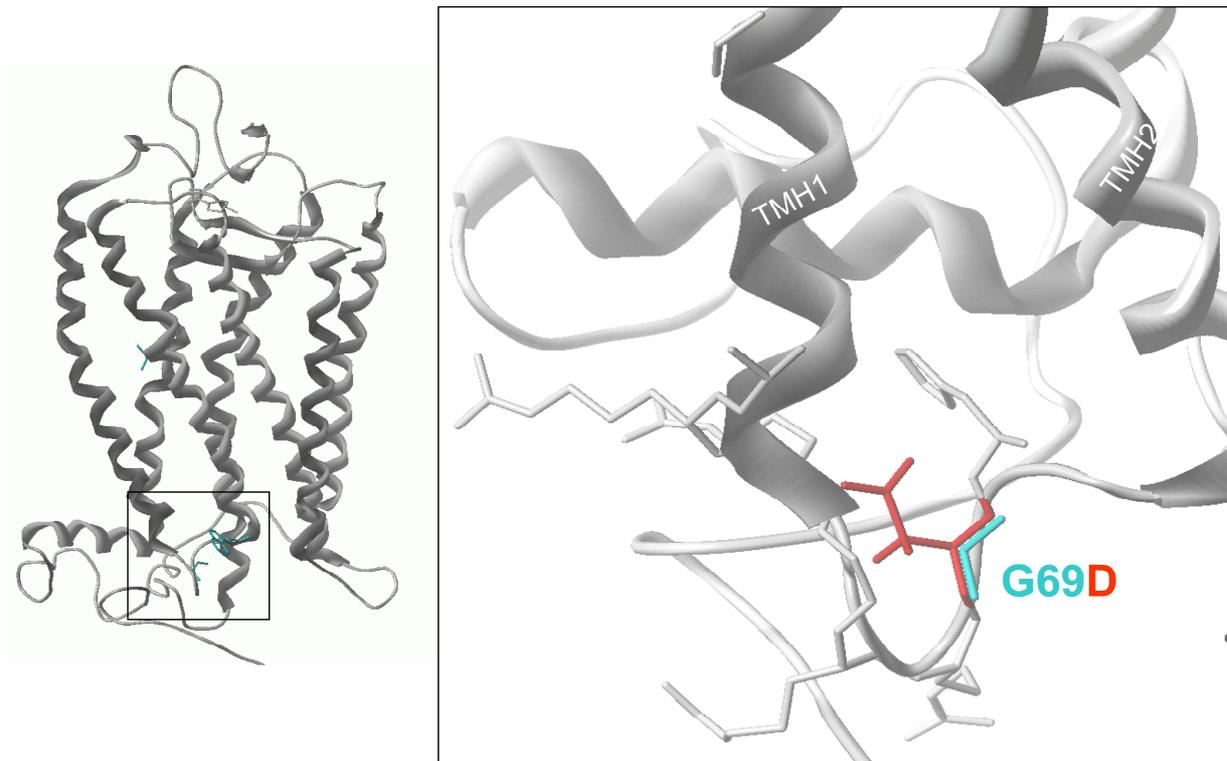


Abb. 3.6: Ausschnitte aus den Strukturmodellen für die V₂R-Mutanten F196K (A), A223K (B), A89I (C), G107R/P108E (D) und G69D (E). Die Seitenketten der wildtypischen Aminosäuren sind in grün eingezeichnet und die resultierenden Seitenketten nach Mutation in rot. Zusätzlich sind die errechneten Interaktionspartner in der Umgebung der Rezeptormutanten angegeben.

Die Analyse der Oberflächenexpression zeigte, dass Mutationen in den α -helikalen Domänen zu stärker transportdefekten Rezeptoren führten als Mutationen in den intra- und extrazellulären Bereichen. Diese Ergebnisse sollten sich im Glykosylierungsstatus der Mutanten widerspiegeln. Im stationären Zustand können bei einem GPCR komplex glykosylierte und mannosereich glykosylierte Formen detektiert werden (s. Abb. 3.7 A). Die mannosereiche Form ist charakteristisch für den unreifen noch ungefalteten Rezeptor, wie er im ER vorliegt. Erst wenn der gefaltete Rezeptor das ER verlassen kann, wird er im medialen Golgi-Apparat komplex glykosyliert und kann danach die Plasmamembran erreichen. Daraus folgt, dass die Stärke eines Faltungs- und Transportdefekts einer Rezeptormutante normalerweise mit der Menge an mannosereich glykosyliertem Protein korreliert.

Die Analyse eines Transportdefekts über den Glykosylierungsstatus hat den Vorteil, dass im Gegensatz zur Mikroskopie eine Vielzahl von Zellen analysiert werden können. Von Nachteil ist, dass nur zwischen ER und medialem Golgi-Apparat eindeutig unterschieden werden kann.

Es ist strittig, ob auch Mutanten, die das ERGIC erreichen, komplex glykosyliert werden (Yamamoto et al., 2001; Hermosilla et al., 2004).

3.2.3 Analyse des Glykosylierungsstatus des GFP-markierten V₂R und seiner Mutanten

Zur Analyse des Glykosylierungsstatus wurden die GFP-markierten V₂R aus den Lysaten von transient transfizierten HEK293 Zellen mit einem polyklonalen α -GFP-Antikörper immunpräzipitiert. Anschließend wurden diese mit Endoglykosidasen verdaut. EndoH spaltet nur mannosereiche Glykane ab, PNGaseF dagegen mannosereiche und komplexe N-Glykosylierungen. Die durch Abspaltung der Glykane verringerte Größe der Proteine wurde mittels SDS-PAGE und Immunoblot detektiert. Der Immunoblot für den wildtypischen Rezeptor ist exemplarisch in Abb. 3.7 gezeigt. In Übereinstimmung mit der Literatur konnten für den unbehandelten Rezeptor zwei Banden (48 kDa und 63 kDa) identifiziert werden.

Nach EndoH-Behandlung wurde die 48 kDa-Bande auf 45 kDa reduziert. Die 63 kDa-Bande war EndoH-resistent. Die 48 kDa-Bande entspricht somit der mannosereich glykosylierten Form, die 63 kDa-Bande der komplex glykosylierten und die 45 kDa-Bande der nicht glykosylierten Form. Nach PNGaseF-Verdau verminderte sich die apparente Masse der mannosereichen Form ebenfalls auf 45 kDa. Die komplex glykosylierte Bande konnte nicht bis zur unmodifizierten Form, sondern nur bis zu einer 55 kDa Bande reduziert werden. Diese Differenz beruht auf einer O-Glykosylierung des V₂R, die im Golgi-Apparat erfolgt (Sadeghi und Birnbaumer, 1999) und durch PNGaseF nicht abspaltbar ist.

Die starke Proteinbande der mannosereichen Form zeigt, dass ein großer Teil des wildtypischen Rezeptors intrazellulär retiniert wurde. Diese Rezeptoren stellen entweder fehlgefaltete wildtypische Rezeptoren und/oder Transportintermediate auf dem Weg zur Plasmamembran dar (Schüle et al., 1998b).

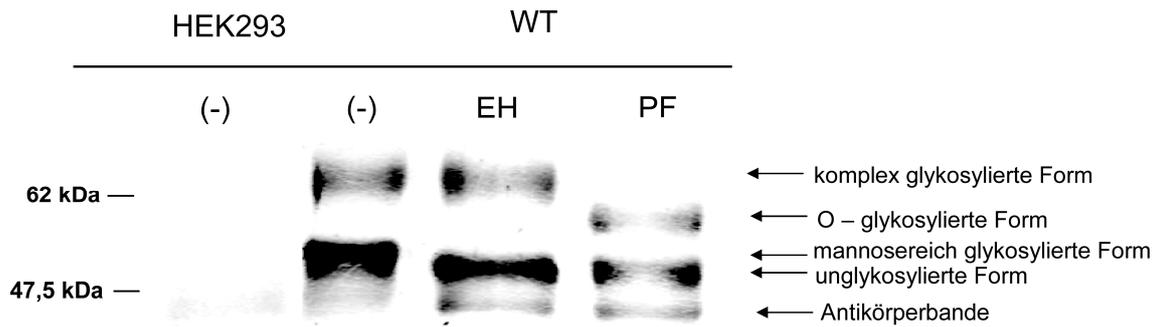


Abb. 3.7: Glykosylierungsmuster des wildtypischen V₂R. Der wildtypische Rezeptor wurde nach Immunpräzipitation aus transient transfizierten HEK293 Zellen mit den Endoglykosidasen EndoH (EH) oder PNGase F (PF) verdaut bzw. blieb unbehandelt (-). Die Proteinbanden wurden mittels SDS-PAGE getrennt und der Rezeptor mit einem monoklonalen primären GFP-Antikörper und IRdye 700 fluoreszenzmarkierten anti-Maus IgG detektiert.

Die Analyse der Glykosylierungsstadien der Rezeptormutanten ist für einige Mutanten exemplarisch in Abb. 3.8 dargestellt (die vollständige Analyse befindet sich im Anhang). Bei allen Mutanten konnte eine mannosereich glykosylierte Form detektiert werden, die sich durch EndoH und PNGaseF zur unglykosylierten Form (45 kDa) reduzieren ließ. Die komplexe Glykosylierung war in den einzelnen Mutanten erwartungsgemäß unterschiedlich stark ausgeprägt und spiegelt den Transportdefekt wieder. Die Mutanten A42K, L44R und A163E zeigten nur die mannosereiche Glykosylierung. Für die Mutanten A89I, A147R und G329E konnten sowohl mannosereiche als auch komplexe Glykosylierungen detektiert werden.

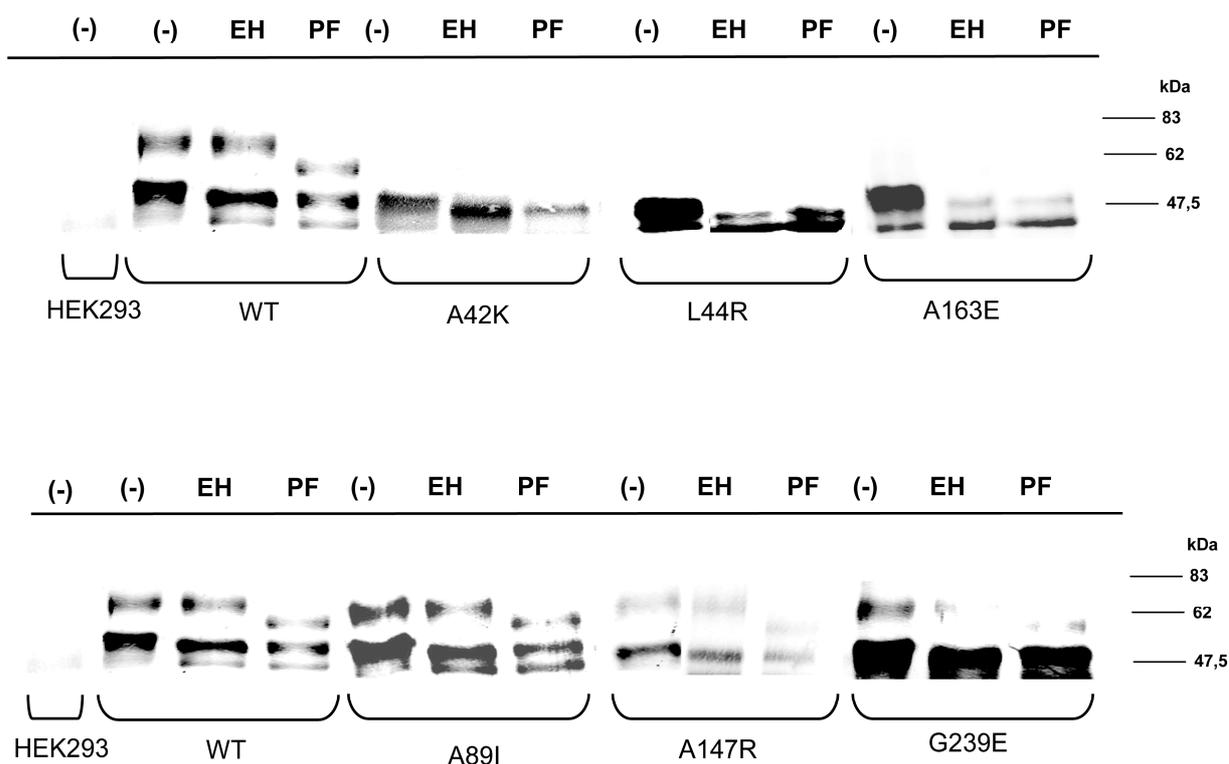


Abb. 3.8: Glykosylierungsstatus ausgewählter Vasopressin-V₂-Rezeptor Mutanten. Die hier gezeigten Mutanten wurden wie oben beschrieben durch Immunpräzipitation aus transient transfizierten HEK293 Zellen isoliert und mit dem monoklonalen primären GFP-Antikörper und dem fluoreszenzmarkierten IRdye 700 anti-Maus, IgG detektiert.

Zur Quantifizierung des Glykosylierungsstatus wurde für jede Mutante und den wildtypischen Rezeptor die Ratio aus den im Immunoblot gemessenen Intensitäten der beiden Glykosylierungsformen bestimmt (s. Abb. 3.9). Hierzu wurde die Farbdichte der Banden mit dem Analyseprogramm *Quant1 analysis* von *Odyssey[®] LI-COR[®]* densitometrisch analysiert. Je höher dieses Verhältnis war, desto mehr Protein wurde komplex glykosyliert und somit zur Plasmamembran transportiert. Als Kontrolle wurde die NDI-Mutante L62P mitgeführt. Aufgrund ihrer starken intrazellulären Retention zeigt die L62P nur eine mannosereiche Glykosylierung und dient daher als Modell für eine vollständige Retention im ER (Hermosilla et al., 2004).

Der wildtypische Rezeptor zeigte eine Ratio von 0,45 und damit das normale Verhältnis von mannosereicher zu komplexer Glykosylierung. Die NDI-Mutante L62P hingegen zeigte nur eine Ratio von 0,02 und stellte den Bezugspunkt für vollständig retinierte Mutanten dar.

Die α -helikalen Mutanten A42K, L44R, F48A, F48R, A72W, A84E, Q92P, A125I, T134A, W156D, A163E, P217R, I232N, S263W, T273R, V277R, A314W, S318I, S318L, I324E und die intrazelluläre Mutante G69D zeigten ähnlich niedrige Ratios (0,01 bis 0,05) wie die L62P-Mutante, was auf eine vollständige Retention hindeutet. Diese Mutanten waren nicht in der Lage den Golgi-Apparat zu erreichen. Alle anderen Mutanten zeigten eine komplexe Glykosylierung und erreichten post-ER Kompartimente. Allerdings wurden bei den Mutanten R32E, G107R, P108E, F196K (extrazellulär), A52I, A89I, T134R, W156D, S171R, V213R, P238E, G239E (α -helikal) und W71D, P144N (intrazellulär) schwächere Ratios gemessen, als beim wildtypischen Rezeptor (0,1 bis 0,3). Die Mutanten P17R, E198A, R202A, A300R, P301D, E303R (extrazellulär), P34E, I221E, A223I, A223K (α -helikal) und A147R, G250E (intrazellulär) zeigten Ratios, die im Bereich des wildtypischen Rezeptors lagen.

Mutationen in den α -helikalen Domänen führten eher zur vollständigen Retention, als Mutationen im intra- und extrazellulären Bereich. Dies unterstützt die Ergebnisse der Biotinylierungsexperimente (s. Abschnitt 3.2.2). Eine Ausnahme bildeten hier aber die Mutanten der 5. α -Helix, die komplex glykosyliert wurden. Auch in den Biotinylierungsexperimenten zeigten diese Mutanten eine erhöhte Oberflächenexpressionen im Vergleich zu den anderen α -helikalen Rezeptormutanten.

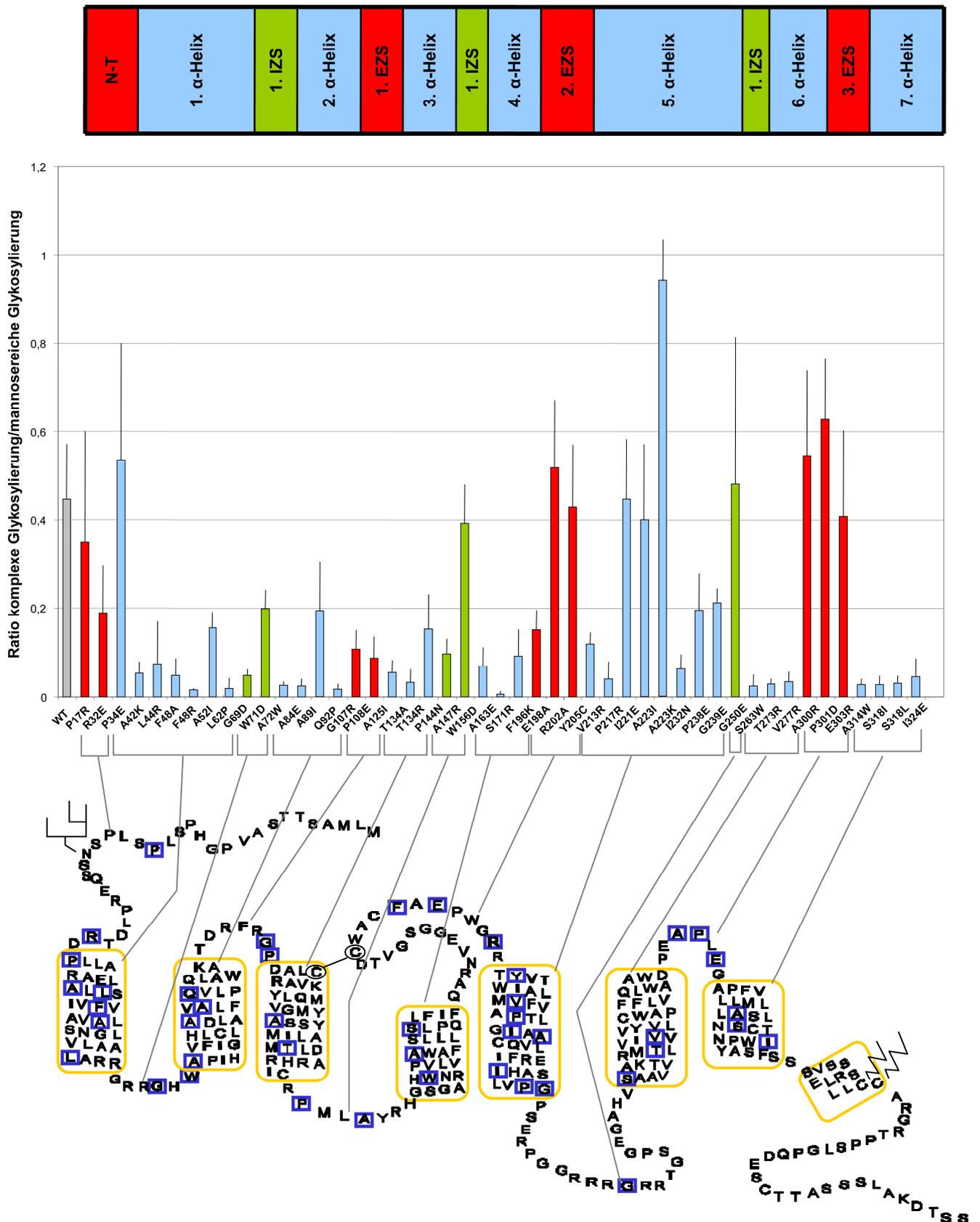


Abb. 3.9: Verhältnis der komplex und der mannosereich glykosylierten Form beim wildtypischen Rezeptor und bei den artifiziellen V₂R-Mutanten. Die Rezeptoren wurden aus transient transfizierten HEK293 Zellen immunpräzipitiert, in der SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt und auf dem Immunoblot mit Hilfe eines monoklonalen primären GFP-Antikörpers und eines fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers (IRDye 700, anti-Kaninchen IgG) detektiert. Zur Berechnung der Ratio wurde der Quotient aus der Intensität der komplexen Form und der mannosereichen Form des Proteins gebildet. Dargestellt sind die Ratios des wildtypischen Rezeptors (graue Säule), der α-helikalen (blaue Säulen), intrazellulären (grüne Säulen) und extrazellulären (rote Säulen) Rezeptormutanten. Zur Übersicht ist die Lokalisation der Mutationen im Rezeptor schematisch dargestellt.

In den bisherigen Analysen der Mutanten mittels *Laser-Scanning-Mikroskopie* und Biotinylierungsexperimenten konnte nur zwischen intrazellulärer Retention und Membranständigkeit unterschieden werden. Auch mit Hilfe des Glykosylierungsstatus konnte nur zwischen Mutanten unterschieden werden, die vollständig im ER retiniert wurden und Mutanten, die den medialen Golgi erreichen konnten. In der Literatur gibt es aber Hinweise auf ein Qualitätskontrollsystem im ERGIC (Hermosilla et al., 2004, Oueslati et al., 2007). Mit keiner Methode war es bisher möglich, Mutanten zu identifizieren, die zwar das ER verlassen können, aber vielleicht schon vor dem medialen Golgi von einem Qualitätskontrollsystem erkannt werden. Über den Glykosylierungsstatus sind solche Mutanten nicht identifizierbar, weil diese noch keine komplexe Glykosylierung zeigen. Um diese Frage zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzstudien für alle artifiziellen Rezeptormutanten an fixierten HEK293 Zellen durchgeführt. Rezeptorproteine, die das ERGIC erreichen, wurden durch Kollokalisierung mit dem ERGIC-Markerprotein ERGIC-53 identifiziert (Hauri et al., 2000).

3.2.4 Lokalisation transportdefekter Rezeptormutanten im ERGIC

Das ERGIC ist dem ER im sekretorischen Weg nachgeschaltet und im Vergleich zum ER sehr klein. Um die Detektion der Rezeptormutanten im ERGIC zu erleichtern, wurde der retrograde Transport der Proteine vom ERGIC zum ER mit Bafilomyzin A1 inhibiert (Hermosilla et al., 2004). So können vorhandene Proteine im ERGIC angereichert werden. Das Makrolidantibiotikum Bafilomyzin A1 hemmt dabei die vesikuläre ATP-getriebene Protonenpumpe. Durch diese Protonenpumpe werden die Vesikel im retrograden bzw. endosomalen Transport angesäuert, was eine Voraussetzung für die Vesikelabschnürung ist.

Abb. 3.10 zeigt exemplarisch die Ergebnisse für einige V₂R-Mutanten und den wildtypischen Rezeptor (vollständige Analyse im Anhang). Der wildtypische Rezeptor konnte mit dem ERGIC-53-Protein kolokalisiert werden. Dies war zu erwarten, denn der wildtypische Rezeptor wird über den sekretorischen Weg an die Plasmamembran transportiert.

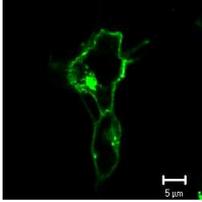
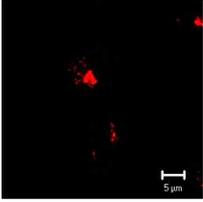
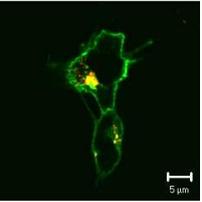
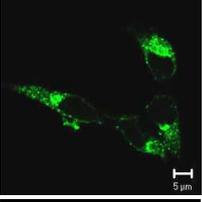
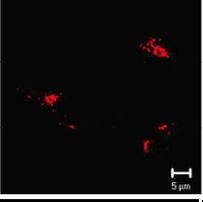
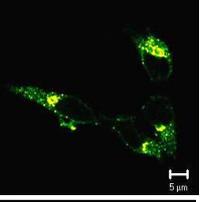
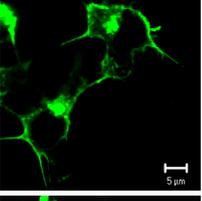
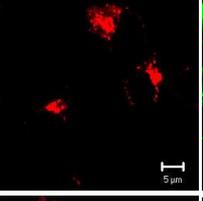
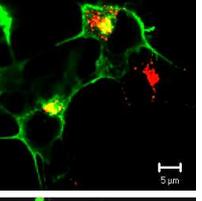
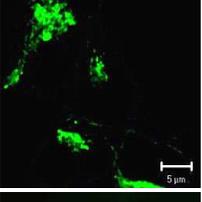
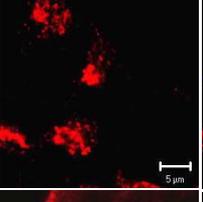
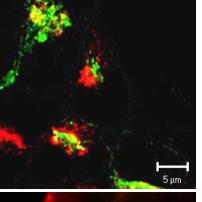
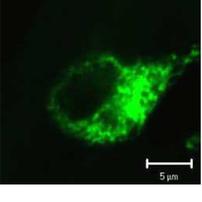
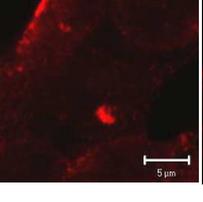
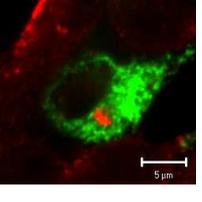
	GFP-Fluoreszenz	ERGIC-53	Überlagerung	Lokalisation der Mutation im Rezeptor	Kolokalisation mit ERGIC-53
WT					+
F48A				1. α -Helix	+
R202A				2. extrazelluläre Schleife	+
G250E				3. intrazelluläre Schleife	+
A314W				7. α -Helix	-

Abb. 3.10: Immunfluoreszenzstudien zur Lokalisation von GFP-markierten V₂R-Mutanten (F48A, R202A, G250E, A314W) und dem wildtypischen Rezeptor (WT) im ER-Golgi-Intermediärkompartiment (ERGIC) an fixierten und permeabilisierten, transient transfizierten HEK293 Zellen. Die vollständige Analyse aller Rezeptormutanten befindet sich im Anhang. Das ERGIC wurde in den mit Bafilomycin A1 behandelten Zellen mit dem ERGIC-Marker ERGIC-53 und Cy3 konjugiertem anti-Maus IgG sichtbar gemacht. Die Bilder zeigen x/y-Scans, die mit Hilfe des *Laser-Scanning*-Mikroskops aufgenommen wurden. Links ist die GFP-Fluoreszenz der Rezeptoren in grün dargestellt. Die Bilder in der Mitte zeigen die Lokalisation des ERGIC-Markers ERGIC-53 in rot. Die rechten Bilder zeigen die computergestützte Überlagerung der GFP- und Cy3-Fluoreszenzen. Eine Gelbfärbung in der Überlagerung zeigt Kolokalisationen an. Der Größenmaßstab beträgt 5 μ m.

Die intrazelluläre Mutante G69D, die α -helikalen Mutanten A42K, L44R, F48R, A84E, Q92P, W156D, A163E, S171R, V213R, P217R, I221E, T273R, V277R, A314W, S318I und I324E, sowie die extrazellulären Mutanten P108E, A300R waren nach Bafilomycin A1-Behandlung diffus in der Zelle verteilt und zeigten keine Kolokalisation mit dem ERGIC Marker ERGIC-53. Diese Rezeptormutanten wurden offensichtlich ausschließlich im ER

retiniert. Damit waren 55 % der α -helikalen Mutanten und jeweils 20 % der intrazellulären und extrazellulären Mutanten auf das ER beschränkt. Die α -helikalen Mutanten P34E, F48A, A52I, A72W, A89I, A125I, T134A, T134R, A223K, I232N, P328E, S263W, S318L und A223I, die extrazellulären Mutanten P17R, R32E, G107R, E198A, R202A und die intrazellulären Mutanten W71D, A147R, G250E akkumulierten dagegen eindeutig im ERGIC und waren damit in der Lage das ERGIC zu erreichen. Die Mutanten F196K, P301D, E303R (extrazellulär) und P144N, G239E (intrazellulär) waren mit dieser Methode nur schwer zuzuordnen. Diese Mutanten waren in einigen Zellen stark retiniert und zeigten eine klare Lokalisation mit dem ERGIC-Marker, sodass hier keine eindeutige Aussage getroffen werden konnte.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit bisher, dass die Lokalisation einer Mutation im Rezeptormolekül das Ausmaß der Fehlfaltung und damit des Transportdefekts bestimmt. Eine starke Retention wurde vor allem bei Mutationen in den α -helikalen Domänen beobachtet. Es sollte nun bestimmt werden, ob sich dieses unterschiedliche Retentionsverhalten auch in unterschiedlich ausgeprägten Interaktionen mit Komponenten des Qualitätskontrollsystems widerspiegelt.

3.3 Analyse der Komponenten des Qualitätskontrollsystems, die an der Retention der V₂R-Mutanten beteiligt sind

Zur Detektion von Komponenten des Qualitätskontrollsystems, die mit den V₂R-Mutanten interagieren und damit an deren Faltung bzw. Retention beteiligt sind, wurden Co-Immunpräzipitationen durchgeführt. Die Rezeptoren wurden hierfür mit Hilfe von polyklonalen anti-GFP-Antikörpern präzipitiert.

In Vorversuchen fiel auf, dass endogene freie Chaperone an hydrophobe Gruppen von Protein A bzw. die Zuckerreste der Sepharose binden können. Dadurch war eine Detektion von Chaperonen, die mit den Rezeptoren interagieren unmöglich, weil in den Negativkontrollen (untransfizierte HEK293 Zellen) bereits Chaperonsignale detektierbar waren. Dieses Problem konnte durch zusätzliches Blocken der Protein A-Sepharose mit dem amphipatischen Peptid KLAL und BSA gelöst werden.

3.3.1 Co-Immunpräzipitation des V₂R und endogener Chaperone (Vorversuche)

Aus der Literatur sind bereits direkte Interaktionen des V₂R mit den Chaperonen Calnexin und Calretikulin bekannt (Morello J.P., 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde überprüft, ob noch weitere Chaperone mit den V₂R-Mutanten interagieren und ob bezüglich dieser Interaktion Unterschiede zwischen den einzelnen Mutanten bestehen.

In einem Vorversuch wurde zunächst überprüft, welche Chaperone mit den V₂R-Mutanten interagieren. Hierfür wurden der wildtypische Rezeptor und die NDI-Mutante Y205C ausgewählt. Die Y205C-Mutante eignete sich für die Vorversuche, weil deren Retentionsverhalten bereits gut charakterisiert ist (Oueslati et al., 2007). Sie gehört zu den Mutanten, die das ERGIC erreichen und die deshalb mit einer Vielzahl von Chaperonen im ER und in post-ER Kompartimenten interagieren könnten.

Zunächst wurde überprüft, ob neben Calnexin und Calretikulin auch GRP94, BiP, Hsp90, Hsp70 und Hsc70 mit dem wildtypischen Rezeptor und/oder der NDI-Mutante Y205C kopräzipitieren. Ferner wurde eine mögliche Interaktion mit Derlin1 untersucht. Derlin1 ist kein Chaperon im eigentlichen Sinn, sondern Teil eines Membranproteinkomplexes, der an der

Erkennung von ungefalteten Proteinen im ER beteiligt ist und wahrscheinlich deren Transfer über die ER-Membran zurück in das Zytosol vermittelt (Retrotranslokation). Derlin1 sollte daher ein sehr guter Marker für fehlgefaltete und retinierte Rezeptormutanten sein. Als Negativkontrolle in den Versuchen dienten untransfizierte HEK293 Zellen. Als Positivkontrolle wurden alle Chaperone sowie Derlin1 in HEK-Zelllysaten detektiert. Nach Co-Immunpräzipitation konnte auf den Immunoblots Calnexin, Hsp70 und Derlin1 nachgewiesen werden (Abb. 3.11). BiP, GRP94, Hsc70, Calretikulin und Hsp90 waren dagegen nicht detektierbar.

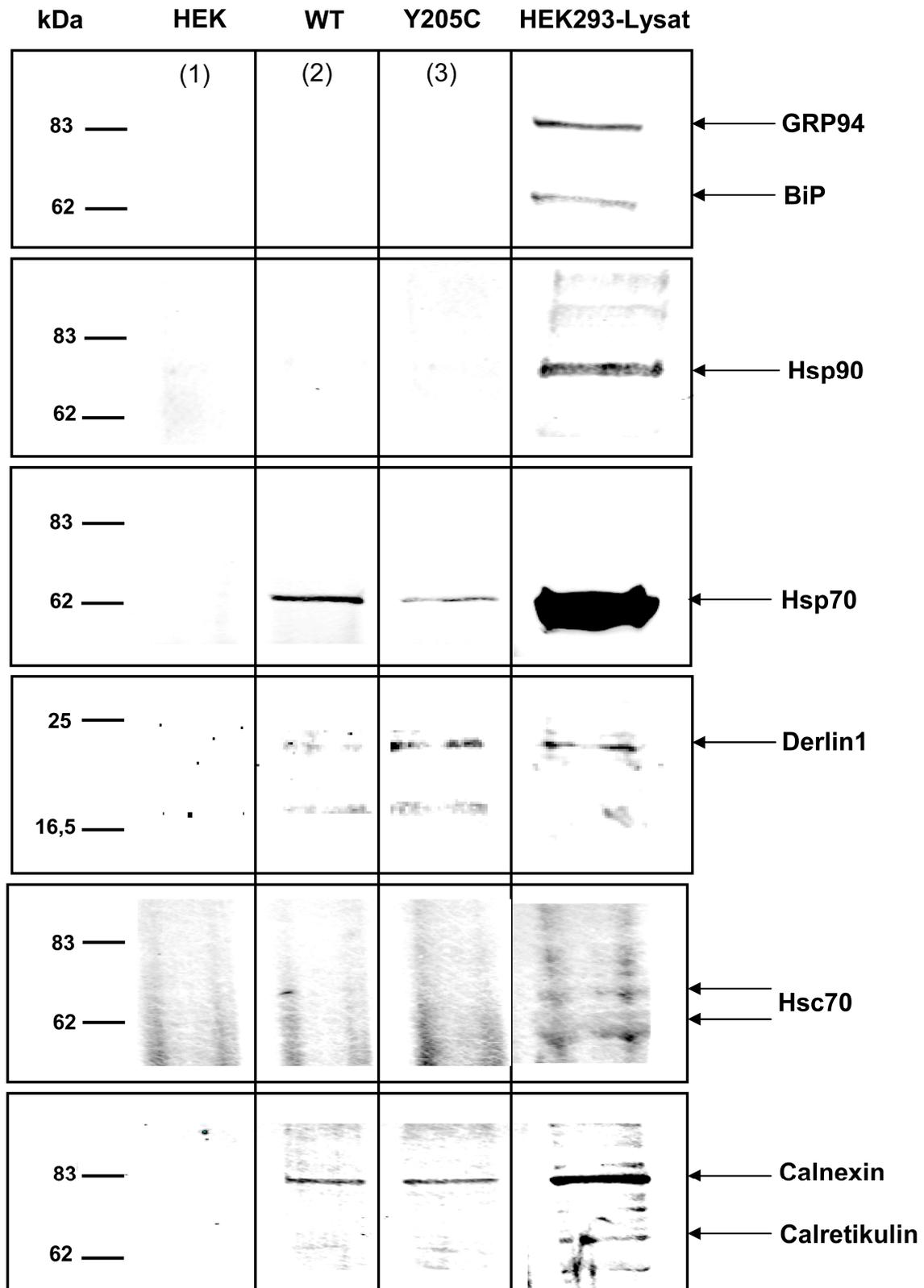


Abb. 3.11: Co-Immunpräzipitation des V₂R, der Rezeptormutante Y205C und verschiedenen Chaperonen sowie Derlin1. HEK293 Zellen wurden transient mit dem wildtypischen Rezeptor (WT) und mit der Rezeptormutante Y205C (Y205C) transfiziert oder blieben untransfiziert (HEK). Die Rezeptoren wurden mit dem polyklonalen GFP-Antikörper GFP02 präzipitiert und nach SDS-PAGE die co-präzipitierten Chaperone (GRP94, BiP, Hsp90, Hsp70, Hsc70, Calnexin, Calretikulin sowie Derlin1) mit Hilfe von Chaperon-spezifischen Antikörpern und IRdye800 konjugiertem anti-Kaninchen IgG bzw. IRdye700 konjugiertem anti-Maus IgG detektiert (Spur 1, 2 und 3). Als Positivkontrolle wurden die Chaperone in HEK-Zell-Lysaten nachgewiesen (HEK293-Lysat).

In analogen Versuchen wurde nun die Stärke der Bindung von Calnexin, Hsp70 und Derlin1 an die einzelnen V₂R-Mutanten analysiert, um eine mögliche Korrelation mit deren unterschiedlichem Retentionsverhalten abzuleiten. Für diese Versuche wurden artifizielle Mutanten, die Mutationen in unterschiedlichen Bereichen des Rezeptors tragen und unterschiedliche Retentionsgrade aufwiesen, gewählt. Zum einen wurden Rezeptormutanten ausgewählt, die eine starke intrazelluläre Retention zeigten (1. α -Helix: L44R, F48A, F48R, 2. α -Helix: A72W, Q92P, 3. α -Helix: T134A, T134R, 4. α -Helix: W156D, A163E, 2. EZS: F196K, 7. α -Helix: A314W, S318I, S318L). Ferner wurden Mutanten getestet, die nur partiell intrazellulär retiniert wurden (E189A in der 2. EZS, A223I in der 5. α -Helix: G250E in der 3. IZS). Als Kontrollen wurde der wildtypische Rezeptor, untransfizierte HEK293 Zellen sowie die NDI-Mutante L62P und Y205C eingesetzt. Die L62P-Mutante stellt dabei wieder den Prototyp einer ausschließlich im ER retinierten Mutante dar (keine komplexe Glykosylierung, starke Retention). Die Y205C-Mutante hat dagegen nur einen partiellen Transportdefekt (komplexe Glykosylierung, geringer Transport zur Plasmamembran). Die Präzipitate mit den unterschiedlichen Rezeptoren wurden mittels SDS-PAGE getrennt und die kopräzipitierten Chaperone wie oben beschrieben mit anti-Calnexin (polyklonal), anti-Hsp70 (monoklonal) und anti-Derlin1 (polyklonal) Antikörpern detektiert. In Abbildung 3.12 ist angegeben, wieviel Derlin1, Calnexin und Hsp70 mit den unterschiedlichen Rezeptormutanten präzipitiert werden konnte. Um Expressionsunterschiede zu berücksichtigen wurde jeweils das Verhältnis der kopräzipitierten Chaperone zur Gesamtmenge des Rezeptors (Gesamt-GFP) berechnet. Je höher dieser Wert ist, desto mehr Chaperon bindet an den Rezeptor.

Das Chaperon Hsp70 ist ein zytosolisches Chaperon, das hydrophobe Domänen erkennt (Bukau B, 2006; Multhoff, G., 2007), an diese bindet und so mögliche Aggregationen verhindert. Es interagiert im Vergleich zum wildtypischen Rezeptor besonders stark mit den Mutanten F48A, F48R (1. α -Helix), A72W, Q92P, T134A und T134R (2. α -Helix), A163E (4. α -Helix) und S318I (7. α -Helix). Die Mutanten L44R, L62P (1. α -Helix), W156D (2. α -Helix), F196K, E198A (2. EZS), Y205C (3. α -Helix) A223K (5. α -Helix), G250E (3. EZS) A314W und S318L (7. α -Helix) zeigten dagegen keine verstärkte Interaktion mit Hsp70. Dieses Chaperon bindet offensichtlich v. a. an Rezeptormutanten mit Mutationen in den α -helikalen Domänen und im intrazellulären Bereich. Es zeigte keine Interaktionen mit Rezeptoren, die Mutationen in den extrazellulären Schleifen trugen. Ferner fällt auf, dass Hsp70 nicht mehr an Mutanten mit einer Mutation ab der 4. α -helikalen Domäne des Rezeptors bindet (Ausnahme S318I). Für die Interaktion mit Hsp70 scheint also die

Lokalisation der Mutanten im Rezeptormolekül eine große Rolle zu spielen. Aus der Lokalisation der Mutanten im sekretorischen Weg lassen sich dagegen keine Rückschlüsse auf eine Interaktion mit Hsp70 schließen. Hsp70 konnte sowohl mit Mutanten, die im ER retiniert wurden (F48R, Q92P, T134A, T134R, A163E), als auch mit Mutanten, die post-ER Kompartimente erreichen (F48A, A72W) kopräzipitiert werden.

Ein anderes Ergebnis wurde für Calnexin erhalten, ein Chaperon, das vor allem in der ER-Membran beschrieben wurde (Okazaki et al., 2000; Molinari et al., 2004). Calnexin interagiert zwar ebenfalls stärker mit Rezeptoren, die in den α -helikalen Domänen 1 bis 4 mutiert wurden. Mit Ausnahme der L44R interagiert es aber nur mit Mutanten, die ausschließlich im ER retiniert wurden (F48R, Q92P, T134A, T134R und A163E) und nicht mit Mutanten, die post-ER Kompartimente erreichen. Dass die Position der Mutation im Rezeptormolekül für die Calnexinbindung nicht so sehr von Relevanz ist, zeigte sich besonders deutlich bei den Mutanten F48A und F48R. Die Mutante F48A war im ERGIC nachweisbar und zeigte keine signifikant höhere Bindung von Calnexin im Vergleich zum wildtypischen Rezeptor. Die vollständig im ER retinierte Mutante F48R interagiert dagegen mit diesem Chaperon.

Derlin1, ein Markerprotein für den ER-assoziierten Abbau, zeigte im Vergleich zum wildtypischen Rezeptor nur mit Mutanten, die in den α -helikalen Bereichen mutiert waren und im ER retiniert wurden, eine stärkere Interaktion (L44R, F48R, Q92P, T134A, T134R, A163E und S318I). Mutanten, die das ER verlassen konnten und die α -helikalen Mutanten L62P und W156D, wurden von diesem Protein nicht erkannt. Derlin1 interagiert ebenfalls stärker mit Mutanten, die eine Mutation bis zur 4. α -Helix trugen.

Die stark retinierten Mutanten L44R, L62P und W156D sind im 1. und 2. α -helikalen Bereich des Rezeptors lokalisiert. Diese Rezeptormutanten zeigten, wie die Mutanten mit einer Mutation ab der 4. α -helikalen Domäne, keine signifikante Interaktion mit den hier untersuchten Proteinen. Es ist also wahrscheinlich, dass an der Retention dieser Mutanten noch unbekannte Chaperone beteiligt sind.

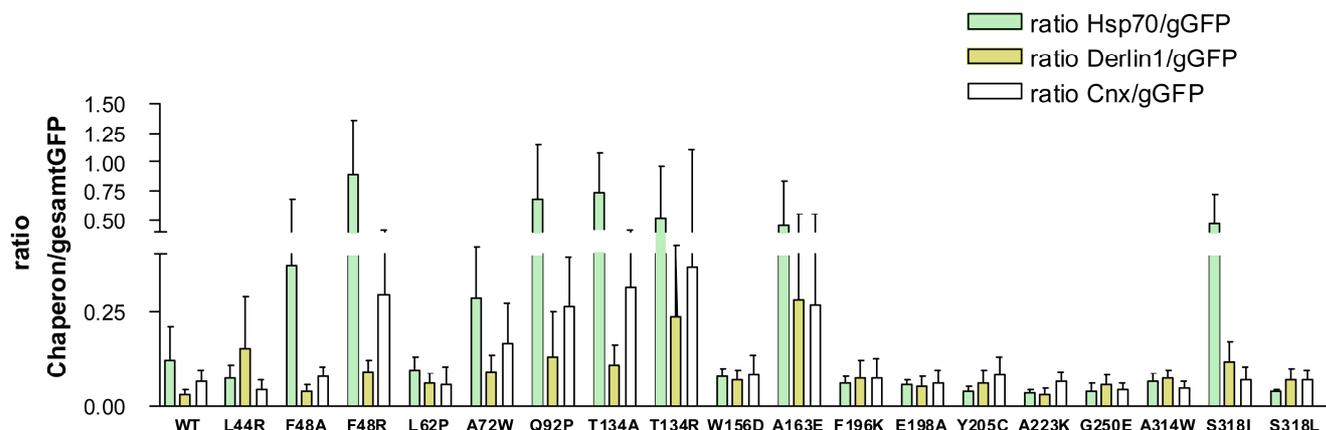


Abb. 3.12: Komponenten des Qualitätskontrollsystems eukaryotischer Zellen, die mit den V₂R-Mutanten interagieren. Die Rezeptoren wurden aus transient transfizierten HEK293 Zellen präzipitiert. Kopräzipitierte Chaperone (Hsp70, Calnexin) sowie Derlin1 wurden mittels spezifischer Primäntikörper und IRdye800 konjugiertem anti-Kaninchen IgG bzw. IRdye700 konjugiertem anti-Maus IgG detektiert. Gezeigt ist hier der Quotient aus der Intensität der Chaperonbande und der Gesamtintensität der GFP-Fluoreszenz der Rezeptormutanten.

3.4 Aufbau eines Testsystems zur Identifizierung neuer pharmakologischer Chaperone mit Hilfe von Hochdurchsatz-Durchmusterungen und automatischer Mikroskopie

Mutationen in den Genen von Membranproteinen können zu Faltungs- und Transportdefekten führen und Erkrankungen auslösen. Die Entwicklung pharmakologischer Strategien, um diese Faltungsdefekte zu überwinden, stellt eine große Herausforderung dar. Für den V₂R wurde der Antagonist SR121463 als pharmakologisches Chaperon beschrieben. Dieser Antagonist bindet während der Faltung an den Rezeptor und stabilisiert dessen korrekte Faltung. Dadurch wird der Rezeptor dem Qualitätskontrollsystem entzogen und der Transportdefekt überwunden. Ein Problem ist, dass SR121463 quasi irreversibel mit der Bindungstasche interagiert und daher zwar zu einem korrekt gefalteten und transportkompetenten Rezeptor führt, dieser aber dennoch durch den Antagonisten blockiert bleibt (Wüller et al. 2004; Morello et al., 2000; Welch et al., 2000). Dieser Antagonist ist für eine Therapie daher nicht geeignet. Es wurden auch zellpenetrierende Peptide, wie KLAL und Penetratin beschrieben, die ebenfalls den Transport einiger V₂R-Mutanten zur Plasmamembran ermöglichen, wahrscheinlich indem sie Ca²⁺-abhängige Komponenten des Qualitätskontrollsystems

inhibieren. Diese Peptide sind aber instabil und eignen sich ebenfalls nicht als Grundlage zur Herstellung neuer Pharmaka.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Cellular Imaging (B. Wiesner, FMP Berlin) ein Testsystem zur Durchmusterung von Substanzbibliotheken im Hochdurchsatzverfahren mit Hilfe eines automatischen Mikroskops entwickelt werden. Anhand dieses Systems sollten kleine Moleküle gefunden werden, die die Faltung und/oder den intrazellulären Transport von GPCR in lebenden Zellen beeinflussen. Das Testsystem sollte ferner für die Anwendung bei anderen faltungs- und transportdefekten Proteinen geeignet sein. Hierfür erscheint eine Methode, mit der man die Überwindung eines Transportdefekts untersucht, sehr gut geeignet.

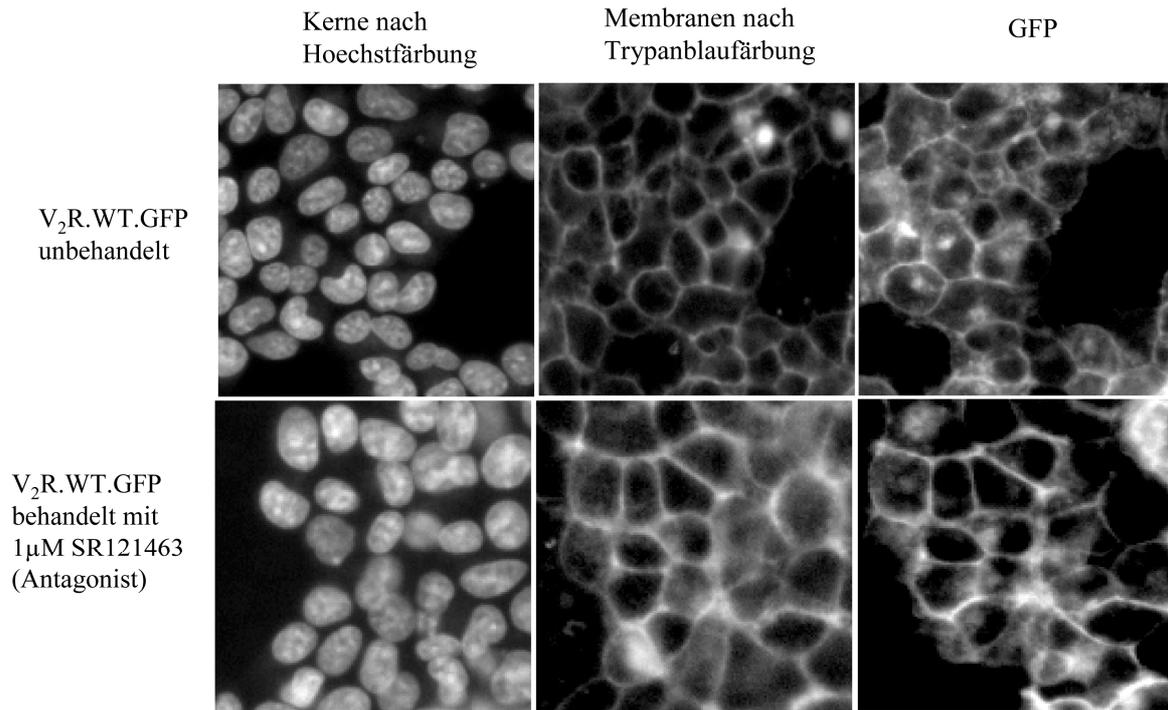
3.4.1 Aufbau des Testsystems

Die zu durchmusternde Substanzbibliothek *ChemBioNet* umfasst 17000 Substanzen. Es musste deshalb eine Methode entwickelt werden, mit der man diese hohe Anzahl im Hochdurchsatzverfahren analysieren kann. Für die Analyse der Substanzen war es wichtig, die Messungen an lebenden Zellen durchzuführen, um toxische Effekte sofort identifizieren zu können.

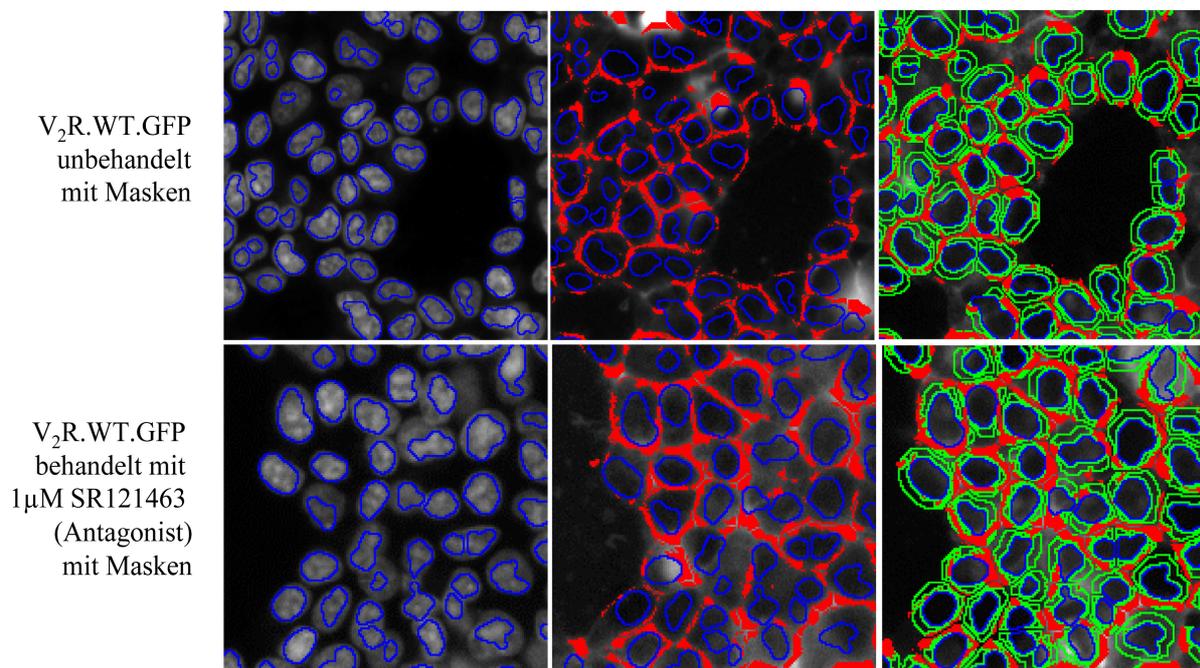
Als Modellproteine dienten der wildtypische V_2R , der murine V_2R (mV_2R) und die humane V_2R -Mutante L336T. Diese Modellproteine wurden ausgewählt, weil der Einfluss des Antagonisten SR121463 auf deren Transport bereits gut untersucht ist (Wüller et al. 2004; Morello et al., 2000; Welch et al., 2000). Der murine V_2R (V_2R aus der Maus) wird im Gegensatz zum humanen V_2R fast vollständig retiniert (Oksche et al., 2002). Dieser Rezeptor stellt somit, wie viele NDI-verursachende Mutationen, ein Modell für faltungs- und transportdefekte V_2R dar (Oksche et al., 2002). Interessant ist, dass bei der Maus der Transportdefekt des wildtypischen V_2R durch eine Mutation ausgeglichen wird, die die Affinität für AVP erhöht. Diese Mutation gewährleistet eine ausreichende Signalisierung durch die wenigen, die Oberfläche erreichenden Rezeptormoleküle (Oksche et al., 2002). Der Faltungs- und Transportdefekt des mV_2R kann durch Behandlung mit SR121463 korrigiert werden (Wüller et al., 2004). Gleiches gilt für die humane NDI-Mutante L336T, die ebenfalls retiniert wird.

Alle Versuche wurden in stabil transfizierten HEK293 Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden in eine 384-Kavitäten Zellkulturplatte ausgesät und mit dem Antagonisten SR121463 als Positivkontrolle für die Überwindung eines Transportdefekts 24h behandelt. Um dem automatischen Mikroskop Informationen zur Zellzahl und zur Lage der Zellen geben zu können, wurden zunächst die Zellkerne mit Hoechst 33258 gefärbt. Anhand der Zellkernfärbung (s. Abb. 3.13 A, C und E, linke Bilder) wurde eine Kernmaske definiert (s. Abb. 3.13 B, D und F, linke Bilder, in blau) und ein Bereich um die Zellkerne festgelegt, in dem sich Zellen und Zellmembranen für die folgenden Messungen befinden müssen. Dieser Bereich wurde als Zellareal bezeichnet. Im Folgenden wurden die Zellen mit dem Plasmamembranmarker Trypanblau gefärbt und die Fluoreszenz detektiert (s. Abb. 3.13 A, C und E, mittlere Bilder). Mit Hilfe dieser Fluoreszenzen wurde eine Membranmaske definiert (s. Abb. 3.13 B, D und F mittlere Bilder, in rot). Aus der Differenz der Membranmaske und der Zellkernmaske ergab sich der intrazelluläre Bereich der Zelle. Dieser ist in den Abbildungen 3.13 B, D und F in den rechten Bildern in grün dargestellt). Im 3. Kanal wurden die GFP-Intensitäten der Rezeptoren in der Membranmaske (I_{Membran}) und im intrazellulären Bereich (I_{Zytosol}) bestimmt. Pro Kavität wurden mindestens 300 Zellen gemessen. Aus diesen Intensitäten wurde die Ratio = $I_{\text{Membran}}/ I_{\text{Zytosol}}$ berechnet, die in Abbildung 3.14 grafisch dargestellt ist. Im Falle einer transportdefekten Mutante ist bei einem positiven Effekt des Antagonisten auf den intrazellulären Transport eine Verschiebung der Rezeptor-GFP-Fluoreszenz von der intrazellulären Maske zur Membranmaske zu erwarten, d.h. der Wert $I_{\text{Membran}}/I_{\text{Zytosol}}$ wird größer.

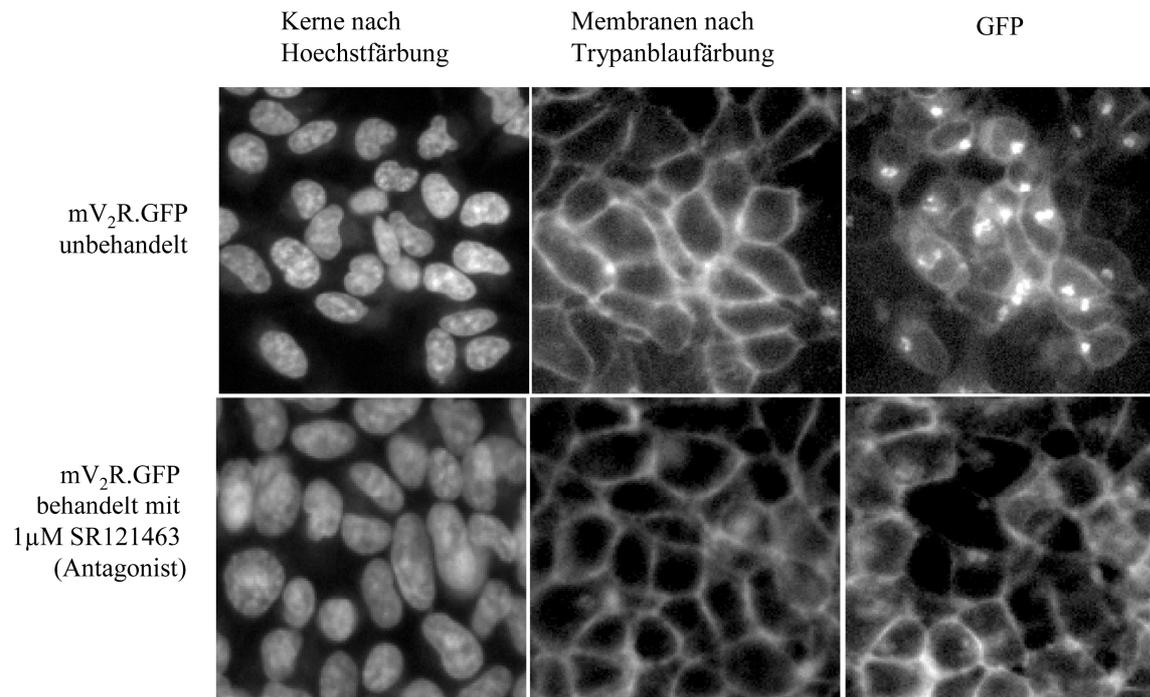
(A)



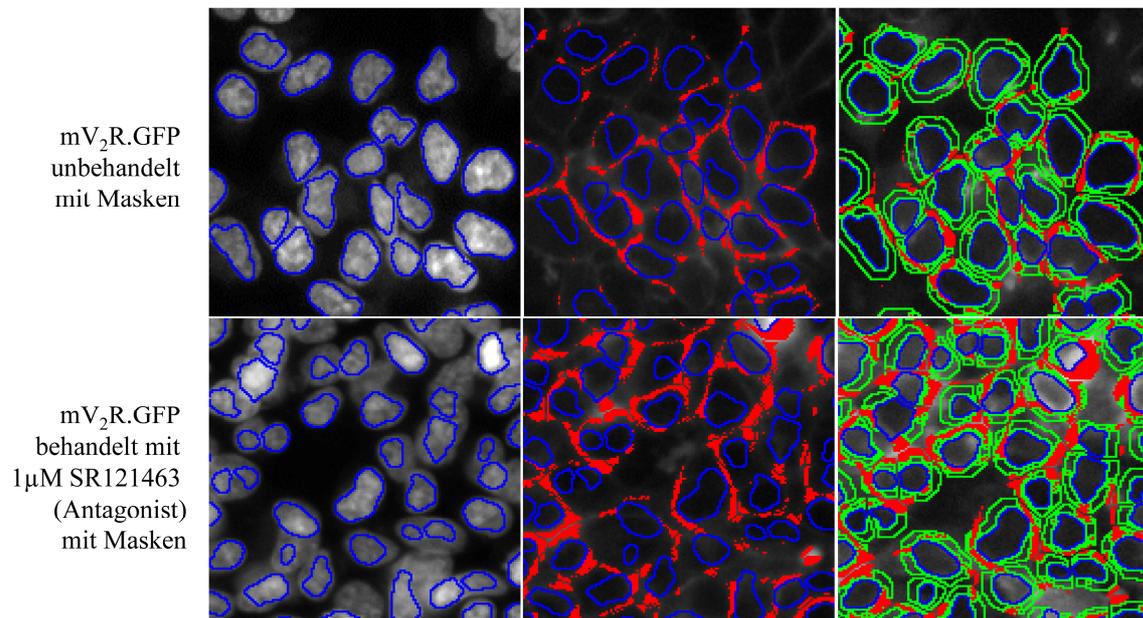
(B)



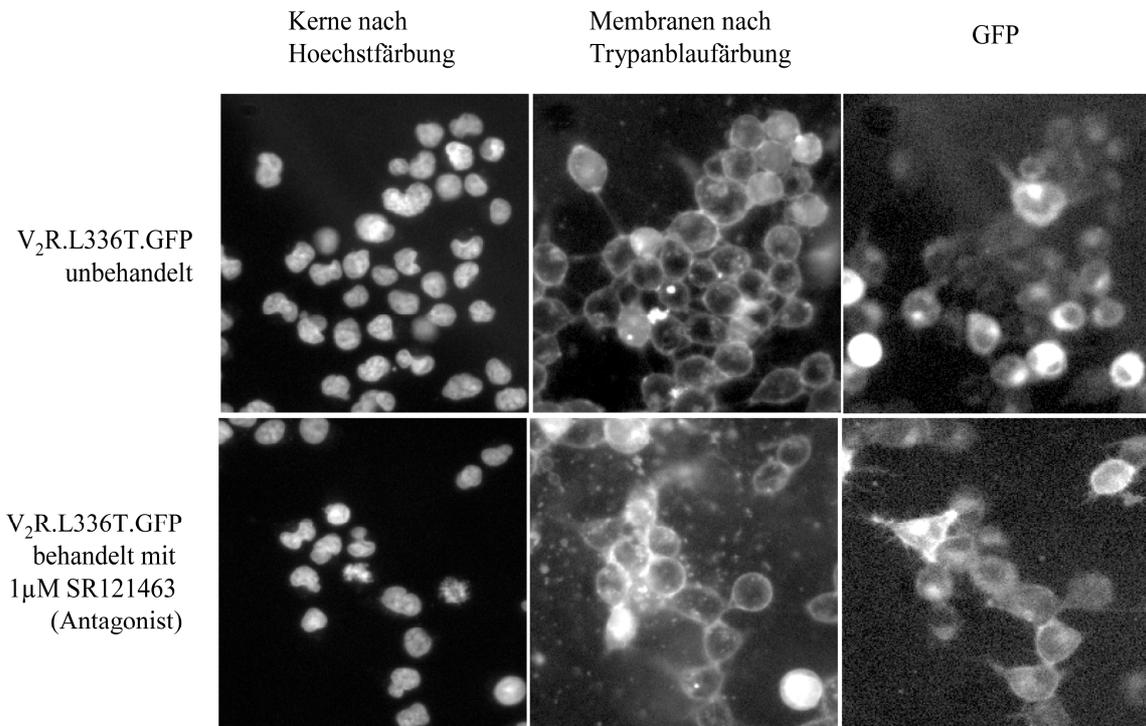
(C)



(D)



(E)



(F)

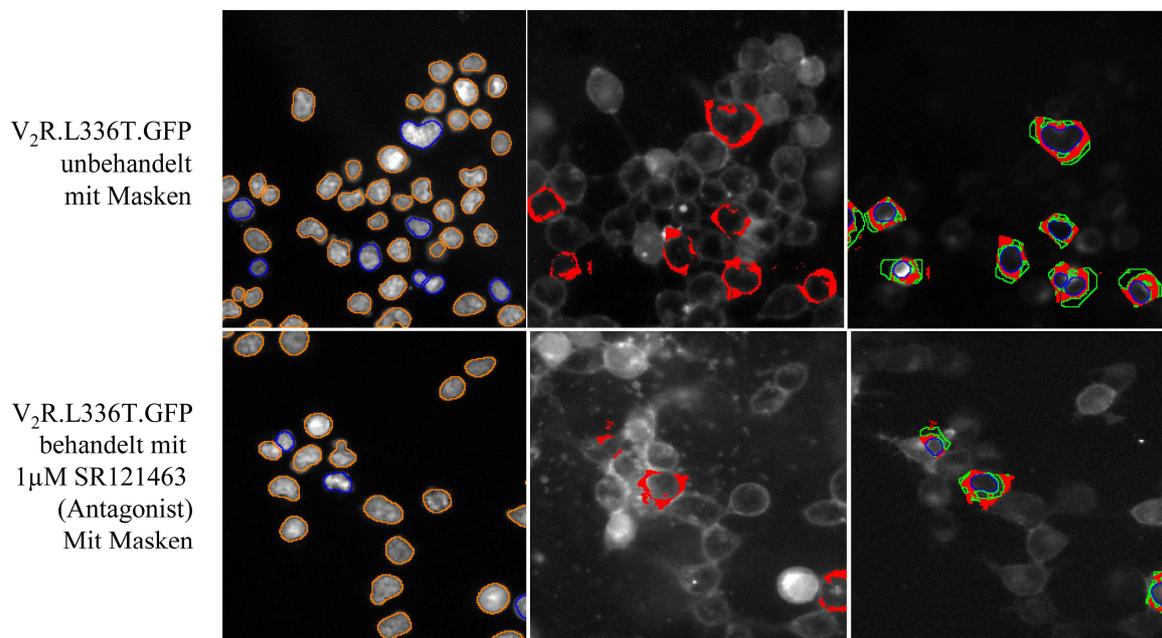


Abb. 3.13: Lokalisation von Hoechst-, Trypanblau und Rezeptor-GFP-Fluoreszenzen, mit Hilfe des automatischen Mikroskops. Stabil transfizierte HEK293 Zellen wurden in 384-Kavitäten-Zellkulturplatten ausgesät und mit dem Antagonisten SR121463 24h behandelt. Mit Hilfe des automatischen Mikroskops (Axiovert 200M, Carl Zeiss, Jena) wurde der Effekt des Antagonisten auf den intrazellulären Transport untersucht. Dargestellt sind die gemessenen Fluoreszenzen für den wildtypischen Rezeptor (A), den murinen V₂R (mV₂R) (C) und für die NDI-Mutante L336T (E) vor und nach Antagonistenbehandlung. In den linken Bildern sind im 1. Kanal die durch Hoechstfärbung detektierten Zellkerne dargestellt. Die mittleren Bilder zeigen die im 2. Kanal mittels Trypanblaufärbung detektierten Zellmembranen. In den rechten Bildern sind die GFP-Fluoreszenzen der Rezeptoren dargestellt (3. Kanal).

Die in den 3 Kanälen gemessenen Fluoreszenzen bildeten die Basis für die Definition der in B, D und F dargestellten Masken (Zellkernmaske in blau, Membranmaske in rot, Maske für den intrazellulären Bereich in grün). Die Maske für den intrazellulären Bereich ergab sich aus der Differenz der Zellkernmaske und der Membranmaske. Die GFP-Fluoreszenz der Rezeptoren wurde in der Membranmaske und in der Maske für den intrazellulären Bereich quantifiziert. Mit diesen Werten wurde eine Ratio ermittelt ($\text{Ratio} = I_{\text{Membran}} / I_{\text{Zytosol}}$), die Aussagen über die Transportraten vor und nach Behandlung mit SR 1121463 zuließ (s. Abb. 3.14).

Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 3.14 grafisch dargestellt. Der wildtypische V₂R zeigte nach Behandlung mit dem Antagonisten eine Erhöhung der Ratio. Das heißt, auch hier wurde Faltung und Transport durch das Pharmakochaperon verbessert. Der murine V₂R und die humane V₂R-Mutante L336T liegen unter natürlichen Bedingungen zum größten Teil intrazellulär vor. Nach Behandlung mit dem Antagonisten SR121463 stieg der Anteil des murinen V₂R an der Plasmamembran sehr stark an. Mit dieser Methode konnte der früher publizierte positive Einfluss von SR121463 auf Faltung und Transport nachvollzogen werden. SR121463 stellt damit eine sehr gute Positivkontrolle für das Auffinden neuer pharmakologischer Chaperone dar.

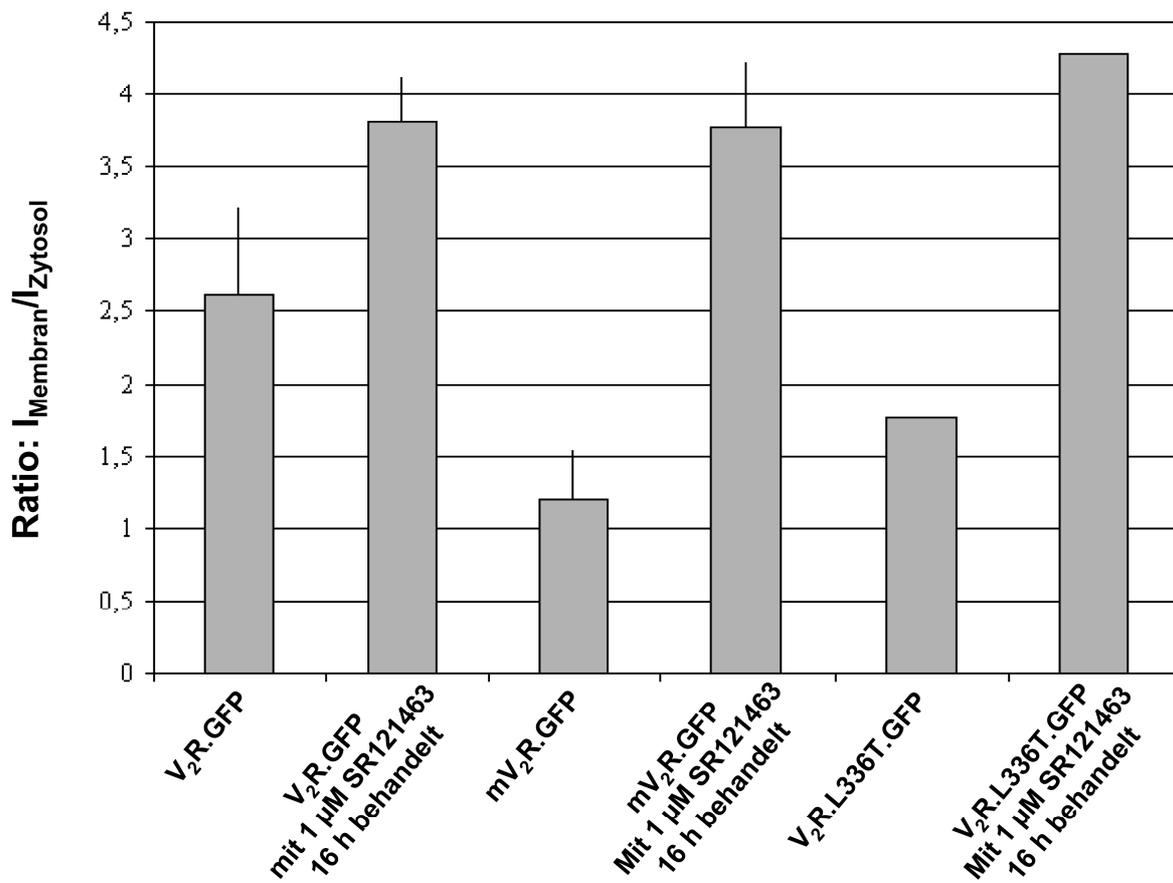


Abb. 3.14: Einfluss des Antagonisten SR121463 auf die Internalisierung und den intrazellulären Transport des V_2R , mV_2R und der NDI-Mutante L336T. HEK293 Zellen, die die Rezeptoren $V_2R.GFP$, $mV_2R.GFP$ und $L336T.GFP$ stabil exprimieren, wurden in 384-Kavitäten Zellkulturplatten ausgesät und mit dem Antagonisten SR121463 behandelt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen eingesetzt. Mit Hilfe des automatischen Mikroskops wurden GFP-Intensitäten im intrazellulären Bereich und an den Membranen der Zellen bestimmt und das Verhältnis dieser Intensitäten als Ratio dargestellt.

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit erfolgreich ein Testsystem am automatischen Mikroskop entwickelt werden, mit dessen Hilfe man zukünftig neue Pharmakochaperone für den V_2R im Hochdurchsatzverfahren identifizieren kann. Da man mit diesem System die Überwindung eines Transportdefekts detektiert, sollte es auch für andere faltungs- und transportdefekte Membranproteine geeignet sein.