
4. Diskussion

4.1 Das Qualitätskontrollsystem in Säugerzellen

Bei vielen erblich bedingten Erkrankungen ist eine mutationsbedingte intrazelluläre Anreicherung fehlgefalteter Proteine zu beobachten. Die Proteine werden dabei von einem intrazellulären Qualitätskontrollsystem erkannt und retiniert. Die Qualitätskontrolle hindert fehlgefaltete Proteine daran, über den sekretorischen Weg transportiert zu werden und stellt so sicher, dass nur funktionelle Proteine ihr Zielkompartiment erreichen. Die Komponenten des Qualitätskontrollsystems interagieren mit hydrophoben Gruppen oder Glykosylierungen noch ungefalteter Proteine. Durch abwechselndes Binden und Freisetzen wird einerseits der Faltungsprozess unterstützt und eine Aggregation verhindert, andererseits werden durch diesen Mechanismus fehlgefaltete Formen erkannt und retiniert. Frühere Arbeiten zeigten, dass das Qualitätskontrollsystem nicht auf das ER beschränkt ist. Eine post-ER Qualitätskontrolle findet im ERGIC und wahrscheinlich sogar im Golgi-Apparat statt (Arvan et al., 2002; Hermosilla et al., 2004; Carvalho et al., 2006; Oueslati et al., 2007). Aus Studien an Hefen und tierischen Zellen ist ferner bekannt, dass verschiedene Wege der Qualitätskontrolle im sekretorischen Weg existieren und diese simultan agieren. Bis jetzt war aber unbekannt, warum selbst die verschiedenen Mutanten eines Proteins unterschiedliche intrazelluläre Kompartimente erreichen können.

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob es einen Zusammenhang zwischen Ort der Mutation im Protein und Retentionsmechanismus gibt. Um eine genauere Aussage zu treffen, wurden mit Hilfe des *Molecular-Modelling* Ansatzes und gerichteter Mutagenese artifizielle Mutanten hergestellt, die gleichmäßig über den Rezeptor verteilt sind und zu einem maximalen Faltungsdefekt führen sollten. Zunächst wurde angenommen, dass die Lokalisation der Mutation im Rezeptor für den Retentionsmechanismus entscheidend ist. Für verschiedene NDI-Mutanten des V₂R (L62P, ΔL62-R64, H80R, S167L, G201D, T204D, Y205C, V206D, V226E, InsQ292, R337X) ist beschrieben, dass sie in unterschiedlichen Kompartimenten des sekretorischen Wegs von den Komponenten des Qualitätskontrollsystems erkannt und retiniert werden (Wüller et al., 2004; Hermosilla et al., 2004; Oueslati, 2005; Schwieger et al., 2008). L62P, ΔL62-R64, H80R und S167L werden

vollständig im ER retiniert, während T204D, Y205C, V226E, InsQ292 und R337X das ERGIC erreichen können. Für die Mutanten G201D und V206D war sogar eine Retention im Golgi-Apparat nachweisbar. Die NDI-Mutanten, die post-ER Kompartimente erreichen, werden höchstwahrscheinlich nach Erkennung durch die Qualitätskontrolle erst wieder zum ER zurücktransportiert bevor sie dem Abbau zugeführt werden (Hermosilla et al., 2004; Oueslati et al., 2007; Schwieger et al., 2008). Anhand von NDI-Mutanten des V₂R wurde bereits eine Klassifizierung nach dem Retentionsmechanismus in Klasse A- und Klasse B-Mutanten vorgenommen (s. Abb. 4.1) (Oueslati, 2005). Dabei waren Klasse B-Mutanten in der Lage, post-ER Kompartimente zu erreichen, während Klasse A-Mutanten vollständig im ER retiniert wurden. In diesem Modell führten Austausch in der N-terminalen Hälfte des Rezeptors zu Klasse A-Mutanten, Klasse B-Mutanten wurden dagegen durch C-terminale Mutationen verursacht.

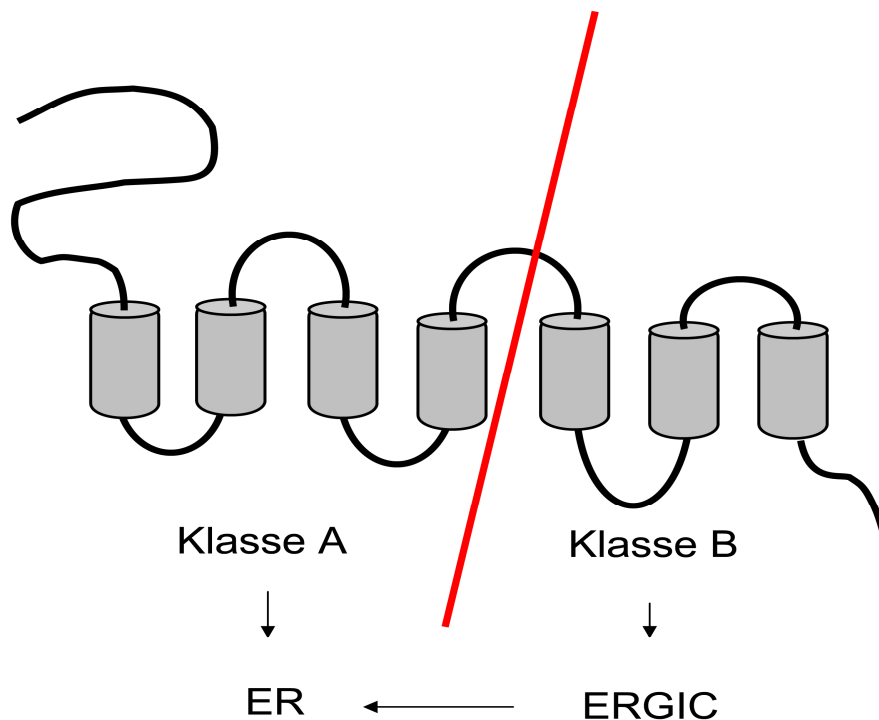


Abb. 4.1: Modell nach Oueslati (2005). Dieses Modell wurde anhand des Retentionsmusters bereits bekannter NDI-Mutanten erstellt und teilt diese in Klasse A- und Klasse B-Mutanten ein. Dabei führen Mutationen in der N-terminalen Hälfte des Rezeptors zu Klasse A-Mutanten, die zu einer Retention im ER führen. Mutationen in der C-terminalen Hälfte führen zu Klasse B-Mutanten, die das ERGIC erreichen können, dort aber retiniert werden und retrograd zum ER transportiert werden.

Für Hefen wurde ebenfalls beschrieben, dass die Lokalisation der Mutation den Retentionsmechanismus beeinflussen könnte. Vashist und Ng (2004) beschrieben verschiedene Kontrollpunkte zur Erkennung von fehlgefalteten löslichen und

membrangebundenen Proteinen. Sie postulierten die Existenz von 2 ERAD-Reaktionswegen: ERAD-C für Faltungsintermediate mit zytosolischen Defekten und ERAD-L für alle löslichen und integralen Proteine mit Mutationen in ER-luminalen Domänen. Carvalho et al. (2006) postulierten noch einen weiteren ERAD-M Reaktionsweg, der integrale Proteine mit einem Faltungsdefekt in den transmembranären Domänen erkennt.

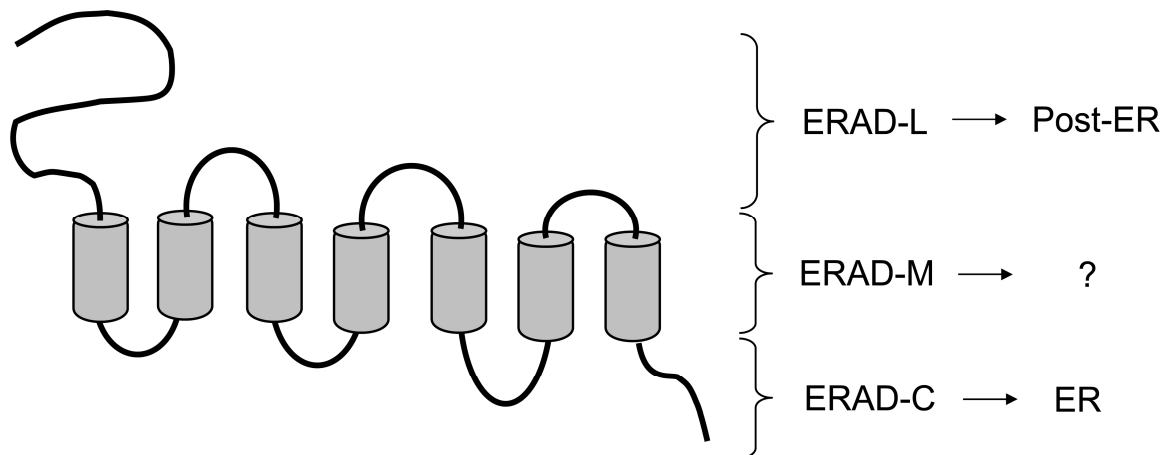


Abb. 4.2: Modell nach Vashist, Ng (2004) und Carvalho (2006). Die in Hefen aufgestellten Hypothesen postulierten ein Qualitätskontrollsystem, das aus verschiedenen Kontrollpunkten besteht, die die Faltung der unterschiedlichen Domänen des Rezeptors (extrazellulär, intrazellulär, transmembranär) überwachen.

Die an Hefen aufgestellten Modelle betonen ebenfalls die Wichtigkeit der Lokalisation der Mutation für den Retentionsmechanismus. Nach den bisher publizierten Daten steht damit das Modell von Ouelati (2005) über die Relevanz von N- bzw. C-terminaler Mutationen für das Säugerzellsystem dem Modell von Vashist, Ng (2005) und Carvalho (2006) über die Relevanz von extrazellulären, intrazellulären und transmembranären Mutationen in Hefen gegenüber.

In dieser Arbeit ist es gelungen, mit Hilfe zahlreicher artifizieller V₂R-Mutanten einen Zusammenhang zwischen der Lokalisation einer Mutation im Protein und dem Retentionsmechanismus in Säugerzellen herzustellen. Die Daten stützen eher das Modell wie von Vashist, Ng und Carvalho vorgeschlagen, allerdings mit wichtigen Modifikationen. Die Ergebnisse dieser Arbeit aus den mikroskopischen Studien an Lebendzellen und aus den Biotinylierungsexperimenten zeigten zwar, dass sich die Retentionsmuster der Mutanten in den unterschiedlichen Domänen unterscheiden, allerdings führten hier Mutationen in den α -

helikalen Domänen zu deutlich stärkeren Faltungsdefekten, als Mutationen in den extra- und intrazellulären Bereichen. Von den in dieser Arbeit untersuchten artifiziellen V₂R-Mutanten wurden insgesamt 94 % der α -helikalen, aber nur 50 % der extrazellulären und 40 % der intrazellulären Mutanten als fehlgefaltet erkannt und retiniert. Vashist und Ng dagegen postulierten, dass nur Mutationen in den intrazellulären Domänen zu einer ausschließlichen Retention im ER führten. Aufgrund der hier erhaltenen Daten, konnte eine neue Theorie über den Zusammenhang zwischen Retentionsmechanismus und Lokalisation der Mutation im Rezeptor aufgestellt werden. Diese besagt, dass der Retentionsmechanismus abhängig von der Position der Mutation im Rezeptor in longitudinaler Richtung ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Mutation zu einer Retention im ER führt, steigt, je weiter sich die Mutation in den α -helikalen Bereichen befindet (Longitudinaltheorie).

Die Glykosylierungsmuster der einzelnen Mutanten stützten ebenfalls die Ergebnisse der mikroskopischen Studien und der Biotinylierungsexperimente. 65% der α -helikalen Mutanten zeigten nur eine mannosereiche Glykosylierung und konnten nicht oder nur in sehr geringem Umfang den medialen Golgi-Apparat erreichen. Dagegen erreichten alle extrazellulären Mutanten, sowie 80 % der intrazellulären Mutanten post-ER Kompartimente und wurden komplex glykosyliert. Für die Mutanten P34E, I221E, A223I (α -helikal) und R202A, A300R (extrazellulär) konnte eine komplexe Glykosylierung auf wildtypischem Niveau detektiert werden. Trotzdem erreichten diese Mutanten nur partiell die Plasmamembran. Dies ist ein starker Hinweis dafür, dass diese Mutanten durch ein Qualitätskontrollsystem im Golgi-Apparat retiniert werden. Das Vorhandensein einer Qualitätskontrolle im Golgi-Apparat wurde auch von anderen Autoren bereits in Hefen postuliert (Hong et al., 2002; Arvan et al., 2002). Fehlgefaltete Proteine konnten die Qualitätskontrolle des ER völlig umgehen und wurden zum Abbau direkt vom Golgi-Apparat zu lysosomalen Kompartimenten transportiert. Dieser Reaktionsweg wurde auch in gestressten Zellen beschrieben, in dem Substrate abgebaut werden, die durch ein überlastetes ER-Qualitätskontrollsystem nicht erkannt wurden (Spear und Ng, 2003). Der Golgi-Apparat kann daher nicht nur den retrograden Transport von faltungsdefekten Proteinen, die aus dem ER entkommen sind, einleiten, sondern auch als distaler Kontrollpunkt zur Sortierung von fehlgefalteten Proteinen fungieren (Arvan et al., 2002). Die Glykosylierung der Proteine gab aber nur Aufschluss über den Transport vom medialen Golgi-Apparat zur Membran. Es ist strittig, ob auch Mutanten, die das ERGIC erreichen, komplex glykosyliert werden (Yamamoto et al., 2001; Hermosilla et al., 2004). In der Literatur gibt es bereits Hinweise auf ein Qualitätskontrollsystem im ERGIC (Hermosilla

et al., 2004, Oueslati et al., 2007). In Fluoreszenzstudien wurde der Frage nachgegangen, ob die als vollständig retiniert identifizierte Mutanten wirklich nur auf das ER beschränkt sind, oder möglicherweise doch das ERGIC erreichen können. Mutanten, die im ERGIC, aber nicht mehr im Golgi-Apparat nachweisbar sind, wären ein wichtiger Hinweis zur Bestätigung eines Qualitätskontrollsystems im ERGIC.

Aufgrund der Immunfluoreszenzstudien konnte gezeigt werden, dass 45 % der α -helikalen Mutanten und jeweils 80 % der intrazellulären und extrazellulären Mutanten mit dem ERGIC-Marker kolokalisierten. Die α -helikalen Mutanten F48A, A72W, A125I, T134A, I232N, S263W, S318L akkumulierten eindeutig im ERGIC, zeigten aber keine komplexe Glykosylierung. Diese Mutanten erreichten daher nicht den medialen Golgi-Apparat, um komplex glykosyliert zu werden und sind daher ein starker Hinweis für eine Qualitätskontrolle im ERGIC. Aufgrund dieser Ergebnisse erscheint es sehr wahrscheinlich, dass das ERGIC über ein eigenes Qualitätskontrollsystem verfügt.

Bis heute sind die Mechanismen der Retention verschiedener Mutanten eines Membranproteins in den unterschiedlichen Kompartimenten des sekretorischen Weges weitgehend unklar. Es ist vor allem auch unklar, warum einige Mutanten post-ER Kompartimente erreichen, andere dagegen nicht. Die Frage, wie das Qualitätskontrollsystem zwischen den strukturell oft ähnlichen Formen ungefalteter Proteine, Faltungsintermediate, fehlgefalteter Proteine und korrekt gefalteter Proteine unterscheidet und wie fehlgefaltete Proteine erkannt werden, ist nach wie vor unzureichend beantwortet.

Aufgrund der Ergebnisse aus den Glykosylierungs- und Biotinylierungsexperimenten dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass Mutanten in den unterschiedlichen Bereichen des Rezeptors mit unterschiedlichen Komponenten des Qualitätskontrollsystems interagieren können und dadurch ein unterschiedliches Retentionsverhalten zeigen. In der Literatur sind hierzu bereits verschiedene Hypothesen beschrieben. Zum einen wurden verschiedene Rücksortierungsmechanismen beschrieben, die eine große Rolle in der Qualitätskontrolle verschiedener Proteine spielen. Post-ER Erkennungsmechanismen wurden vor allem für fehlgefaltete Proteine in Hefen untersucht. Erd2p erkennt eine C-terminale HDEL-Sequenz (in Säugern KDEL) luminaler Proteine und rekrutiert diese in COPI-Vesikel (Semenza et al., 1990). Ein C-terminales Dilysinmotiv bei integralen Membranproteinen kann ebenfalls als Rückführungssignal fungieren, indem es direkt an den COPI-Komplex retrograder

Transportvesikel bindet (Jackson et al., 1993; Letourneur et al., 1994). Zusätzlich wurde in Hefen noch ein Rer1p-abhängiger retrograder Transportweg vorgeschlagen (Nishikawa und Nakano, 1993; Sato et al., 1995). Rer1p ist ein im Golgi-Apparat lokalisiertes Protein, das polare Aminosäurereste in den Transmembrandomänen erkennt und diese über COPI-Vesikel zum ER zurücktransportiert (Sato et al., 1997, 1996, 2001). In Säugerzellen bestimmen die Transmembrandomänen von nicht zusammengefügt Proteineinheiten in vielen Fällen die Retention in post-ER Kompartimenten (Bonifacino et al., 1990 und 1991; Letourneur et al., 1994). So konnten Sato et al. (2004) zeigen, dass nicht assemblierte Untereinheiten von Membranproteinen in Hefen den frühen Golgi-Apparat erreichen und dann über den Rer1p-Reaktionsweg rücktransportiert werden.

Eine andere Hypothese für den V₂R und andere Membranproteine besagt, dass die durch Mutation induzierte Konformationsänderung zur Exposition von hydrophoben Gruppen führen kann, die von luminalen ER Chaperonen (Calnexin/Calretikulin, BiP, GRP94) erkannt und gebunden werden (Morello et al., 2001; Christianson et al., 2008). Was auch mit den Ergebnissen dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Mutationen in den α -helikalen Domänen konnten zum Aufbrechen der Struktur und damit zu exponierten hydrophoben Bereichen führen, die dann von den Chaperonen erkannt wurden. Analog konnten die Mutanten in den extrazellulären Bereichen, die ebenfalls zu einer starken Retention führten (G107R und P108E), das Abknicken der 1. extrazellulären Schleife in die 3. α -Helix verhindern und so die 3. α -Helix aus der Membran drängen.

Frühere Arbeiten zeigten, dass GPCR mit einer Vielzahl von Chaperonen interagieren können. Es war aber bislang nicht bekannt, ob alle Mutanten eines Membranproteins immer mit den gleichen Chaperonen interagieren oder ob es hier Unterschiede gibt. Ferner war unbekannt worauf mögliche Unterschiede beruhen könnten. Für den V₂R sind in der Literatur Co-Immunpräzipitationen von V₂R-Mutanten und Calnexin beschrieben (Morello et al., 2001). Gleiches wurde für den Gonadotropinrezeptor gezeigt (Rozell et al., 1998).

Der TSH-Rezeptor interagiert mit Calnexin, Calretikulin und BiP während der Proteinfaltung im ER (Siffoi-Fernandez et al., 2002). Der TSH-Rezeptor ist ein GPCR mit einem N-Glykan an Asn 77. Molinari und Helenius (2000) postulierten, dass Glykoproteine mit einer N-Glykosylierung bis zur Position 50 vom N-Terminus entfernt mit Cnx/Crt interagieren. Proteine mit einer Glykosylierung mehr in Richtung C-Terminus sollten hingegen mit BiP

interagieren (Zhang et al., 1997; 2004). Nach diesem Modell bestimmt also nur die Position der Glykosylierung mit welchem Chaperon das Protein in Wechselwirkung tritt.

Mittels Überexpressionsexperimenten konnten die Autoren zeigen, dass die Interaktion des TSH-Rezeptors mit Cnx/Crt zur Stabilisierung der Rezeptorstruktur führt. Eine Überexpression von BiP führt zum gesteigerten Abbau von TSH-Rezeptors. Die Wahl zwischen diesen beiden Chaperonsystemen ist entscheidend, weil jeweils andere Effekte auf Faltung und Stabilität des Rezeptors im ER erzielt werden. In dieser Arbeit konnte dagegen gezeigt werden, dass der V₂R und die Rezeptormutanten in unterschiedlichem Maß mit den Chaperonen Calnexin und Hsp70, sowie mit Derlin1 assoziieren, nicht mit BiP. Das ER-Membran gebundene Chaperon Calnexin interagiert stärker mit den Mutanten in den α -helikalen Domänen 1 bis 4, die auch im ER retiniert wurden. Mutanten, die post-ER Kompartimente erreichten, zeigten keine verstärkte Interaktion. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass Calnexin nicht nur in der Proteinfaltung während der Neusynthese involviert ist, sondern auch in der Retention und widerlegt damit die Ergebnisse von Siffroi-Fernandez et al. (2002). Die Theorie von Molinari und Helenius (2000) konnte hier ebenfalls widerlegt werden. Der V₂R trägt ein N-Glykan an Position 22. Somit müssten alle Mutationen, die zu einem faltungsdefekten Rezeptor führen mit Calnexin und Calretikulin interagieren. Es konnte aber nur eine Interaktion von Calnexin mit Mutanten, die eine Mutation bis zur 4. α -helikalen Domäne trugen, nachgewiesen werden. Eine Interaktion mit Calretikulin konnte nicht detektiert werden.

Das Chaperon Hsp70 wurde v. a. an Rezeptormutanten mit Mutationen in den α -helikalen Domänen und im intrazellulären Bereich gefunden. Es zeigte keine Interaktionen mit Rezeptoren, die Mutationen in den extrazellulären Schleifen trugen (diese befinden sich im luminalen Bereich und scheinen keinen Einfluss auf den zytosolischen Bereich des Rezeptors zu haben). Ferner fiel auf, dass Hsp70 nicht mehr an Mutanten, die eine Mutation ab der 4. α -helikalen Domäne tragen, bindet. Eine Ausnahme stellte hier die Mutante S318I dar. Diese Mutante trägt die Mutation in der 7. α -Helix, die sich in der räumlichen Struktur des Rezeptors mit der 1. α -Helix verbindet und so zu einem stabilen Rezeptor führt. Durch das Einfügen des Isoleucins an Position 318 könnte die Faltung der 1. α -Helix beeinflusst, und dadurch die verstärkte Interaktion mit Hsp70 erklärt werden.

Derlin1, ein Markerprotein für den ER-assoziierten Abbau zeigte nur mit Mutanten in den α -helikalen Bereichen, die im ER retiniert wurden eine stärkere Interaktion. Derlin1 interagierte ebenfalls stärker mit Mutanten im Bereich bis zur 4. α -Helix. Laut Carvalho et al., sollten nur Mutanten mit luminalen Defekten mit Derlin1 interagieren, was aber in dieser Arbeit nicht nachvollzogen werden konnte. Schwieger et al. (2008) zeigten ebenfalls, dass mehrere Mutationen, unabhängig von ihrer Position im Rezeptor und ihrem Retentionsmechanismus mit Derlin1 interagieren können.

Die stark retinierten Mutanten L44R, L62P und W156D (α -helikal) zeigten, wie die Mutanten ab der 4. α -helikalen Domäne keine signifikante Bindung mit den hier untersuchten Chaperonen und Derlin1. Diese Mutanten müssen mit anderen, hier nicht untersuchten, Chaperonen assoziieren, die die Faltung überprüfen und fehlgefaltete Rezeptoren retinieren.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen der Interaktion von Rezeptoren und Chaperonen und dem Retentionsmechanismus ausgearbeitet werden. Dabei zeigte sich, dass sich die Interaktion der Chaperone mit den untersuchten Mutanten in transversaler Richtung entlang des Rezeptors ändern kann (s. Abb. 4.3). Unterschiedliche Mutanten des Proteins können mit unterschiedlichen Chaperonen interagieren. Die Neigung, verstärkt mit den Chaperonen Calnexin und Hsp70 zu interagieren, nimmt dabei von N- nach C-terminal ab. Gleiches trifft auf Derlin1 zu. Gleichzeitig kann aber auch die Neigung, mit anderen Chaperonen zu interagieren, von N- nach C-terminal zunehmen, was aber hier für kein Chaperon gezeigt werden konnte. Diese Transversaltheorie ähnelt damit dem Modell nach Oueslati (s. Abb. 4.1)

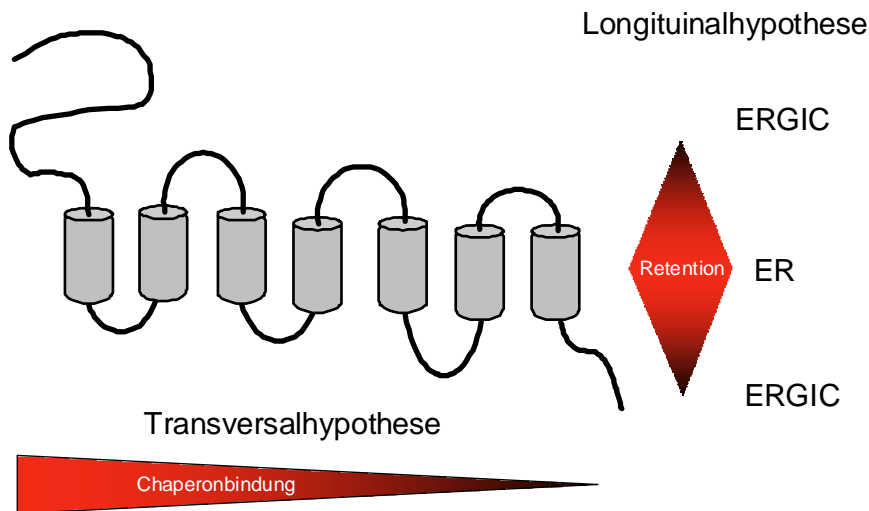


Abb. 4.3: Theorien über den Retentionsmechanismus von V₂R-Mutanten im Säugerzellsystem. Die Longitudinalhypothese besagt, dass der Retentionsmechanismus abhängig von der Rezeptordomäne ist. Eine ausschließliche ER-Retention ist demnach umso wahrscheinlicher, je näher sich die Mutation im Bereich der α-Helix befindet. Die Transversalhypothese beschreibt, dass sich die Interaktion von Chaperonen und Rezeptormutanten in transversaler Richtung des Rezeptors ändern kann. Die Neigung, verstärkt mit Derlin1 und den Chaperonen Calnexin und Hsp 70 zu interagieren, nimmt dabei von N- nach C-terminal ab.

4.2 Etablierung eines neuartigen Systems zur Durchmusterung von Substanzbibliotheken im Hochdurchsatzverfahren

GPCR sind wichtige Zielstrukturen für Medikamente. Ziel dieser Arbeit war es auch, ein Testsystem zu etablieren, mit dem schnell und einfach neue Wirkstoffe gefunden werden können, die die Faltung und/oder den intrazellulären Transport sowie die Internalisierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) in lebenden Zellen beeinflussen. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neuartiges System zur Durchmusterung von Substanzbibliotheken im Hochdurchsatzverfahren mit Hilfe eines automatischen Mikroskops entwickelt.

In der Literatur sind für GPCR bereits verschiedene Radioliganden- und Funktionalitätstests beschrieben. Testsysteme, die auf Radioligandenmessungen beruhen, sind sehr teuer und haben den Nachteil, dass man nicht zwischen Agonist und Antagonist unterscheiden kann. Yangthara et al. (2007) entwickelten ein Funktionalitätstestsystem, bei dem die Aktivität des V₂R über die cAMP-abhängige Aktivierung von CFTR-Cl⁻-Kanälen bestimmt wurde. Damit konnten sie einen Antagonisten identifizieren, der 50mal potenter für V₂R als für den

Vasopressin- V_{1a} -Rezeptor ($V_{1a}R$) ist. Die Autoren beschrieben dieses Funktionalitätstest als sehr sensitiv, billig, einfach und adaptierbar für alle fluoreszenz-basierten Hochdurchsatz-Durchmusterungsformate. Hier kann aber nicht untersucht werden, ob die Substanz direkt auf den V_2R wirkt, oder den Reaktionsweg beeinflusst.

Carlile et al. stellten 2007 einen schnellen und einfachen Mikrotiter-basierten Durchmusterungsansatz vor, der direkt den Proteintransport verfolgt. Mit diesem Funktionalitätstest konnten die Autoren Substanzen finden, die Defekte im Proteintransport (Proteinfaltung) korrigieren. Dabei wurde das mutierte Protein nach Behandlung mit kleinen Molekülen an der Zelloberfläche gemessen. Die Messung fand an fixierten Zellen statt. Eine Schwierigkeit dieses Systems war, ein Protokoll zur Zellfixierung zu finden, bei dem die Permeabilisierung der Zellen minimal war, da sonst keine Färbung der Zellmembran mehr möglich gewesen wäre. Ferner berücksichtigte dieses Testsystem nicht die Gesamtzeptorzahl der Zellen, sodass es durch ein unterschiedliches Expressionsverhalten schnell zu falschpositiven Ergebnissen kommt.

Das in dieser Arbeit entwickelte Testsystem ist der erste Ansatz, bei dem der intrazelluläre Rezeptortransport direkt an lebenden Zellen verfolgt werden kann. Dabei kann mit Hilfe der automatischen Mikroskopie der Membrantransport von jedem fluoreszenzmarkierten Membranprotein vor und nach Behandlung mit möglichen Wirkstoffkandidaten untersucht werden. Bei diesem Testsystem wird der Gesamtzeptorgehalt berücksichtigt, was falschpositive Ergebnisse minimiert. Es können mehr als 300 Zellen gleichzeitig gemessen werden, sodass die quantitative Auswertung verlässlicher ist. Ferner ist es möglich, nur intakte Zellen in die Auswertung einzubeziehen. Die Ergebnisse der Etablierung des Testsystems zeigten, dass die Methode gut geeignet ist, neue pharmakologische Chaperone für den V_2R und/oder Inhibitoren der Qualitätskontrolle zu identifizieren. Einziger Nachteil der Methode ist, dass nur eine Wiederherstellung des Rezeptortransports nicht aber die Rezeptorfunktion detektiert wird. Dieser Nachteil wird aber dadurch ausgeglichen, dass die Methode ohne weitere Modifikationen auf andere, auch nicht verwandte Membranproteine übertragen werden kann.