

3 Ergebnisse

Die in dieser Arbeit untersuchten Mutanten des Vasopressin-Rezeptors vom Subtyp 2 (V2R) gehören zur Gruppe der transportdefekten Mutationen (Gruppe 2; siehe Tabelle 3.1). Diese werden X-chromosomal vererbt und führen zum Diabetes insipidus renalis (Oksche und Rosenthal, 2001; siehe auch Abschnitt 1.4). Die Lokalisation der Mutationen im Rezeptor ist im folgenden Bild gezeigt:

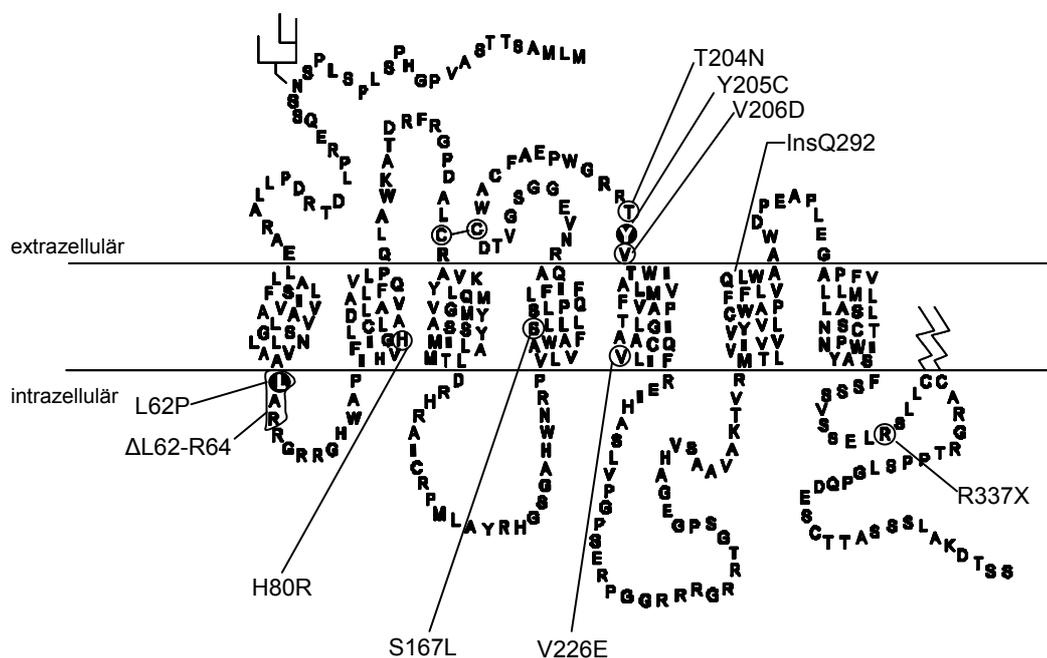


Bild 3.1: Zweidimensionales Modell des Vasopressin-V2-Rezeptors

Die 371 Aminosäuren sind mittels Ein-Buchstaben-Code gekennzeichnet. Die Zahlen geben die Positionen des Aminosäureaustauschs wieder. Bei der Mutante Δ L62-R64 fehlen 3 Aminosäuren an den Positionen 62, 63 und 64; bei InsQ292 wurde nach der Aminosäure an Position 291 ein Glutamin eingeführt; bei R337X fehlen ab dem Arginin an Position 337 alle folgenden C-terminalen Aminosäuren.

Tabelle 3.1: Funktionelle Eigenschaften und Klassifizierung der untersuchten V2-Rezeptor-Mutanten. Die Angaben zur Einteilung der Mutanten in Gruppen I, II oder I/II richten sich nach Störungen der Funktion (Gruppe I), des Transports (Gruppe II) oder einer kombinierten Störung von Transport und Funktion (Gruppe I/II) (aus: Oksche und Rosenthal, 2001)

Aminosäureveränderung	Gruppe	Funktioneller Defekt	Referenz
L62P	II	Keine [³ H]AVP-Bindung, keine Stimulation der AC	Krause <i>et al.</i> , 2000
ΔL62-R64	II	Keine [³ H]AVP-Bindung, keine Stimulation der AC	Krause <i>et al.</i> , 2000
H80R	II	Keine [³ H]AVP-Bindung	Yuasa <i>et al.</i> , 1994
S167L	II	Keine [³ H]AVP-Bindung	Oksche <i>et al.</i> , 1996
T204N	II>I	K _D für [³ H]AVP 10fach vermindert, B _{max} 24fach vermindert, cAMP-Akkumulation 45% vom Wildtyp	Postina <i>et al.</i> , 2000
Y205C	II	Keine [³ H]AVP-Bindung, cAMP-Akkumulation 10% vom Wildtyp	Postina <i>et al.</i> , 2000
V206D	II>I	Keine [³ H]AVP-Bindung, cAMP-Akkumulation 20% vom Wildtyp	Postina <i>et al.</i> , 2000
V226E	II	Keine [³ H]AVP-Bindung	Oksche <i>et al.</i> , in Vorbereitung
InsQ292	II	Keine [³ H]AVP-Bindung	Oksche <i>et al.</i> , in Vorbereitung
R337X	II	Keine [³ H]AVP-Bindung, keine Stimulation der AC	Oksche <i>et al.</i> , 1998

3.1 Analyse der intrazellulären Lokalisation und der Faltungszustände transportdefekter V2R-Mutanten

3.1.1 Mikroskopische Untersuchungen

Bislang wurde der Transportdefekt der in dieser Arbeit untersuchten Mutationen des Vasopressin-V2-Rezeptors in einigen Arbeiten beschrieben (Krause *et al.*, 2000; Postina *et al.*, 2000; Oksche und Rosenthal, 2001). Im Folgenden wurde genauer untersucht, ob diese Mutanten ausschließlich im ER retiniert werden, oder ob auch Kompartimente außerhalb des ERs zur Qualitätskontrolle beitragen. Frühere Arbeiten lieferten Hinweise für eine Qualitätskontrollfunktion von dem ER nachgeschalteten Kompartimenten wie dem ERGIC (Lotti *et al.*, 1996; Ouwendijk *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 2001). Exemplarisch wurden zunächst die L62P- und die Y205C-Mutante untersucht. In Bild 3.2 ist die intrazelluläre Lokalisation des in HEK 293-Zellen transient exprimierten V2R-Wildtyps und der beiden Mutationen L62P und Y205C als GFP-Fusionsproteine mittels Laser Scanning Mikroskopie (LSM) unter unbehandelten („steady state“-)Bedingungen abgebildet. Es konnte früher gezeigt werden, dass die GFP-Markierung keinen Einfluß auf den Transport und die pharmakologischen Eigenschaften des V2R hat (Oksche *et al.*, 1998). Die Plasmamembran der gleichen Zellen wurde mit Trypanblau gefärbt und ist in der mittleren Spalte in rot dargestellt. Eine Überlagerung von GFP- und Trypanblaufluoreszenzen ist in der rechten Spalte gezeigt. Die Lokalisation des wildtypischen Rezeptors war teilweise an der Plasmamembran detektierbar, was an der Gelbfärbung in der Überlagerung von GFP- und Trypanblaufluoreszenz zu erkennen ist. Intrazelluläre GFP-Signale deuteten auf neu synthetisierte bzw. von der Plasmamembran aus internalisierte Rezeptoren hin, wobei auch die Überexpression beim Wildtyp zu teilweiser Retention führen kann (Schüle *et al.*, 1998; Schüle *et al.*, 2000). Das Ergebnis zeigte für den V2R-Wildtyp, dass das in HEK 293-Zellen exprimierte GFP-Fusionsprotein konstitutiv an die Zelloberfläche transportiert wird, wie es in anderen Studien bereits beschrieben wurde (Krause *et al.*, 2000). Im Falle der beiden hier abgebildeten Rezeptormutanten L62P und Y205C war die GFP-Fluoreszenz ausschließlich im Inneren der Zelle detektierbar, wobei keine Überlagerung mit der roten Farbe des Trypanblau zu erkennen war. Die diffuse Verteilung der GFP-Fluoreszenz über das Zytoplasma deutete eine Retention der V2R-Mutanten im ER der Zellen an.

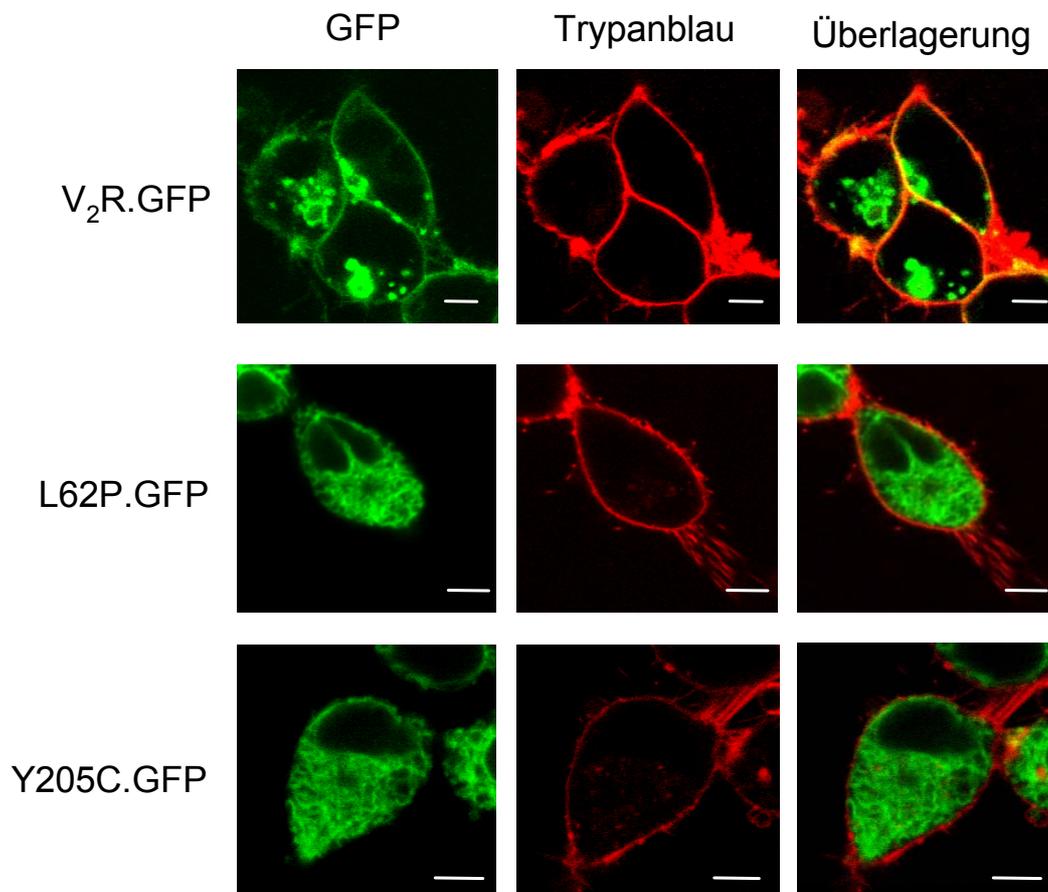


Bild 3.2: Lokalisation des wildtypischen V₂-Rezeptors und seiner Mutanten L62P und Y205C mittels Laser Scanning Mikroskopie

HEK 293-Zellen wurden mit für die Fusionsproteine V₂R.GFP, L62P.GFP und Y205C.GFP kodierenden Expressionsplasmide transient transfiziert und lebend untersucht. Die grüne Farbe gibt die die GFP-Fluoreszenz, und damit die Lokalisation der Rezeptoren wieder (links). Zum Nachweis der Rezeptoren an der Plasmamembran wurde diese mit Trypanblau angefärbt, welches in Rot wiedergegeben ist (Mitte). Der rechte Teil der Abbildung zeigt die Überlagerung: Im Falle des wildtypischen Proteins ist bei Gelbfärbung eine Kolokalisation, d.h. seine Anwesenheit an der Zelloberfläche zu sehen (gelb). Maßstab 5 μ M.

3.1.1.1 Die Y205C-Mutante des V2R erreicht das ERGIC

Da das ERGIC im Vergleich zum ER deutlich kleiner ist und zwischen diesen Kompartimenten ein rascher vesikulärer Austausch stattfindet, kann unter dem in Bild 3.2 dargestellten „steady state“ das ERGIC vom ER nicht unterschieden werden. Dies gilt auch für das ERGIC-Markerprotein ERGIC 53 (Hauri *et al.*, 2000). Um zu untersuchen, ob die beiden V2R-Mutanten L62P und Y205C fähig sind, das ERGIC zu erreichen, wurde der Rücktransport vom ERGIC ins ER durch eine dreistündige Behandlung der Zellen mit Bafilomyzin A1 blockiert (Bild 3.3). Das Makrolidantibiotikum Bafilomyzin A1 ist bei Säugerzellen ein spezifischer Hemmstoff der vesikulären ATP-getriebenen Protonenpumpe, die im retrograden bzw. endosomalen Transport für eine luminalen Ansäuerung von Vesikeln und damit für die Voraussetzung für deren Abschnüren sorgt (Palokangas *et al.*, 1998). Unter den hier gewählten Bedingungen akkumulieren Proteine, die zwischen ER und ERGIC pendeln im ERGIC, wo sie einfach zu detektieren sind (Hauri *et al.*, 2000). Um zu untersuchen, ob eine V2R-Mutante das ERGIC erreicht, wurden HEK 293-Zellen transient mit den beiden GFP-markierten Rezeptormutanten L62P und Y205C transfiziert. Die GFP-Fluoreszenz wurde nach Behandlung mit Bafilomyzin A1 detektiert (links, grün). Das ERGIC wurde mittels eines gegen ERGIC 53 gerichteten Antikörpers detektiert (Mitte, rot). Im oberen Teil von Bild 3.3 sind die unbehandelten Zellen abgebildet, die zeigen, dass sich die intrazelluläre Lokalisation der beiden Mutanten im „steady state“ nicht unterschied. ERGIC 53 schien unter diesen Bedingungen ebenfalls diffus über das Zytoplasma verteilt zu sein. Nach Behandlung der Zellen mit Bafilomyzin A1 in einer Konzentration von 1 μ M reichte sich die Y205C-Mutante in einem perinukleären Bereich an, und kolokalisierte mit dem Markerprotein ERGIC 53, während die L62P-Mutante auch hier diffus über das Zytoplasma verteilt blieb. Y205C ist also offensichtlich in der Lage, die Qualitätskontrollkomponenten des ER zu passieren. Diese V2R-Mutante scheint im ERGIC erkannt und von dort aus ins ER zurücktransportiert zu werden.

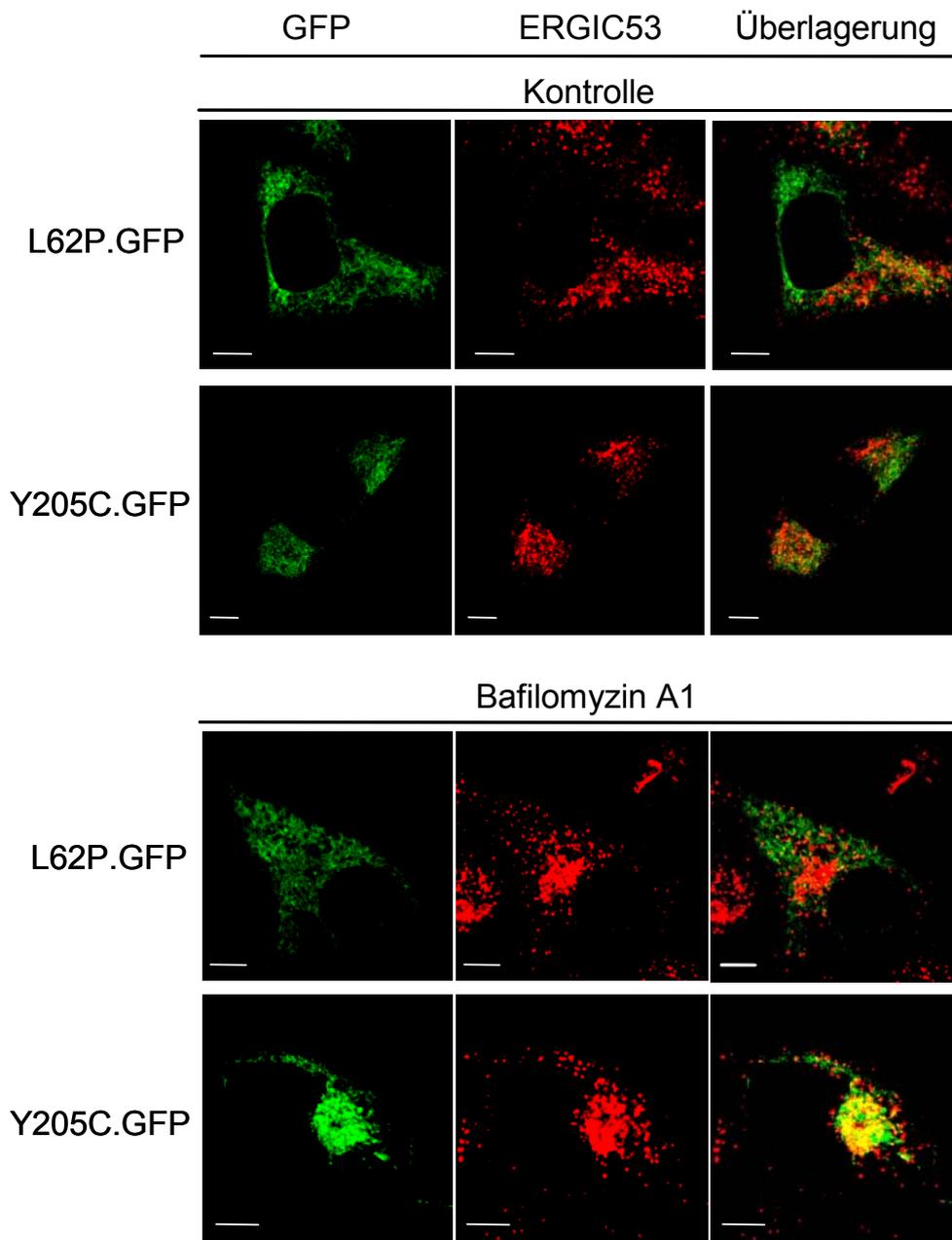


Bild 3.3: Kolokalisation von ERGIC 53 und der GFP-markierten V2R-Mutanten L62P und Y205C vor und nach Bafilomyzin A1-Behandlung

Transient transfizierte HEK 293-Zellen wurden 3 Stunden vor der Fixierung mit Bafilomyzin A1 behandelt und danach mittels Immunfluoreszenz untersucht. Links ist die GFP-Fluoreszenz der Fusionsproteine in grün dargestellt. Das ERGIC wurde mittels eines gegen das ERGIC 53-Markerprotein gerichteten Antikörpers dargestellt (Mitte, rot). Die Aufnahmen wurden danach computergestützt überlagert (rechts). Eine Kolokalisation ist durch eine Gelbfärbung gekennzeichnet. Maßstab 5 μ M.

3.1.1.2 Fehlender Einfluß unterschiedlicher Expressionsniveaus auf die intrazelluläre Lokalisation der V2R-Mutanten

Das unterschiedliche Retentionsverhalten der V2-Rezeptormutanten L62P und Y205C könnte durch ungleiche Expressionsstärken verursacht werden. Im Falle der Y205C-Mutante könnte eine stärkere Expression die Qualitätskontrolle im ER überschwemmen und zu einem Transport zum ERGIC führen. Um diese Möglichkeit auszuschließen oder zu bestätigen, wurden Zellklone hergestellt, die diese Proteine unterschiedlich stark stabil exprimierten. Dadurch konnten im Folgenden transfektionsratenunabhängige Untersuchungen vorgenommen werden. Mittels GFP-Fluorimetrie konnten die Fluoreszenzintensitäten der Zellklone bestimmt werden. Es wurde ein L62P exprimierender Zellklon mit starker Fluoreszenz und ein schwach exprimierender Y205C-Zellklon gewählt, wobei die Fluoreszenzintensität des Y205C-Klons 30% von der des L62P-Klons betrug. Die Zellen wurden dann mit Hilfe der Immunfluoreszenz untersucht. Hier zeigte sich das gleiche Bild wie bei den transienten Transfektionen: Die Y205C-Mutante war auch bei schwacher Expression nach Bafilomyzin A1-Behandlung im ERGIC anzutreffen, während die L62P trotz einer signifikant stärkeren Expressionsrate vollständig im ER retiniert wurde (Bild 3.4). Dieser Befund zeigt, dass das Erreichen unterschiedlicher Retentionsorte von den jeweiligen Expressionsniveaus offenbar unabhängig ist.

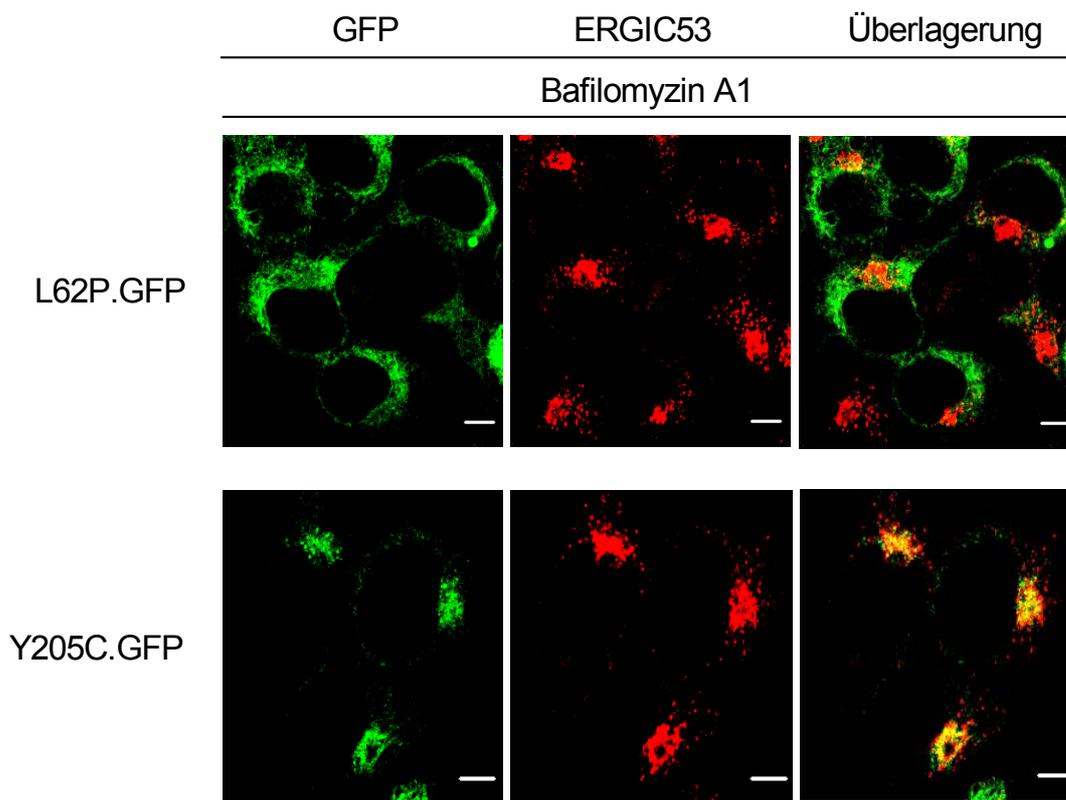


Bild 3.4: Kolokalisation von ERGIC 53 und der unterschiedlich stark exprimierten V2R-Mutanten L62P und Y205C in HEK 293-Zellklonen nach Bafilomyzin A1-Behandlung

Die Bilder zeigen LSM-Aufnahmen stabil transfizierter Zellklone mit einer hohen Expressionsrate von L62P.GFP (100%) und einer niedrigeren von Y205C.GFP (30%). Nach dreistündiger Bafilomyzin A1-Behandlung und Fixierung der Zellen wurde die GFP-Fluoreszenz aufgenommen (links, grün). Das ERGIC wurde mittels eines gegen ERGIC 53 gerichteten Antikörpers dargestellt (Mitte, rot). Die Aufnahmen wurden danach computergestützt überlagert (rechts). Eine Kolokalisation ist durch eine Gelbfärbung gekennzeichnet. Maßstab 5 μ M.

3.1.1.3 Andere NDI-verursachende V2R-Mutanten erreichen ebenfalls das ERGIC

Die Fähigkeit fehlgefalteter Membranproteine, das ERGIC zu erreichen, scheint von Expressionsniveaus unabhängig zu sein. Um den Einfluß verschiedener Faltungszustände auf das Retentionsverhalten zu untersuchen, wurde die Lokalisation fünf weiterer V2R-Mutanten im ER bzw. ERGIC mittels Immunfluoreszenz überprüft: Δ L62-R64, S167L, V226E, InsQ292 und R337X (siehe Bild 3.1 zur Orientierung). Diese Mutanten sind ebenfalls als transportdefekt beschrieben worden (Krause *et al.*, 2000; Oksche *et al.*, 1996; Oksche *et al.*, 1998). In Bild 3.5 sind die Ergebnisse der Immunfluoreszenz entsprechend Bild 3.3 für diese Mutanten zusammengefasst, wobei hier die mit Bafilomyzin A1 behandelten Zellen

abgebildet sind. Im Falle der unbehandelten Zellen waren im „steady state“ alle Mutanten diffus über das Zytoplasma verteilt und entsprechend der Kontrolle in Bild 3.3 nicht voneinander zu unterscheiden, weshalb diese Abbildung nicht gezeigt wird. Nach Behandlung mit Bafilomyzin A1 akkumulierten die V2R-Mutanten V226E, InsQ292 und R337X im ERGIC (Kokalisation mit ERGIC53 im perinukleären Bereich). Die Mutanten Δ L62-R64 und S167L blieben dagegen diffus verteilt und zeigten keine Akkumulation mit ERGIC 53, was eine ausschließliche Retention dieser Mutanten im ER andeutet (Bild 3.5). Als Ergebnis bleibt festzuhalten, dass neben der Y205C auch V226E, InsQ292 und R337X fähig sind, das ER zu verlassen, das ERGIC zu erreichen, um von dort wieder zum ER zurücktransportiert zu werden, wohingegen Δ L62-R64 und S167L wie L62P ausschließlich im ER retiniert werden.

Im Folgenden wurden daher die im ER retinierten Mutanten L62P, Δ L62-R64 und S167L als **Klasse A-Mutanten**, die das ERGIC erreichenden Mutanten Y205C, V226E, InsQ292 und R337X als **Klasse B-Mutanten** bezeichnet.

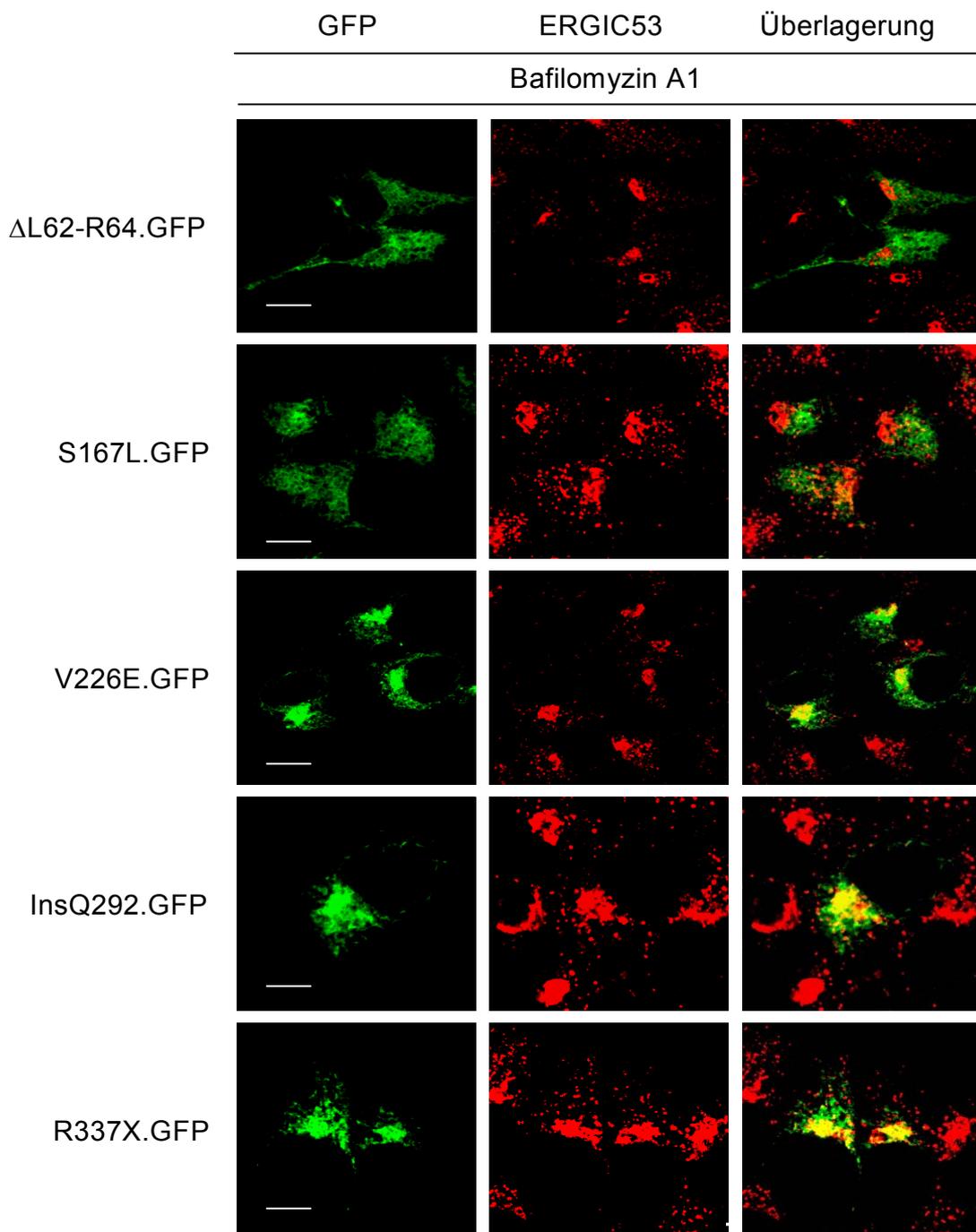


Bild 3.5: Kolokalisation von ERGIC 53 und der GFP-markierten V2R-Mutanten Δ L62-R64, S167L, V226E, InsQ292 und R337X nach Bafilomyzin A1-Behandlung

Transient transfizierte HEK 293-Zellen wurden 3 Stunden vor der Fixierung mit Bafilomyzin A1 behandelt und danach mittels Immunfluoreszenz untersucht. Links ist die GFP-Fluoreszenz der Fusionsproteine in grün dargestellt. Das ERGIC wurde mittels eines gegen das ERGIC 53-Markerprotein gerichteten Antikörpers dargestellt (Mitte, rot). Die Signale wurden danach computergestützt überlagert (rechts). Eine Kolokalisation ist durch eine Gelbfärbung gekennzeichnet. Maßstab 5 μ M.

3.1.2 Biochemische Analyse der Faltungszustände der Rezeptormutanten

Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten, dass es zwei verschiedene Klassen von intrazellulär retinierten V2R-Mutanten gibt, nämlich Klasse A-Mutanten, die ausschließlich im ER retiniert werden, und Klasse B-Mutanten, die das ERGIC erreichen.

Es konnte ausgeschlossen werden, dass das Expressionsniveau der Mutanten einen Einfluß auf den Ort der Retention hat. Es musste nun untersucht werden, ob bestimmte Faltungszustände der Rezeptormutanten das Verlassen des ERs bzw. Erreichen des ERGIC ermöglichen. So könnten einige Mutationen zu einem milden Faltungsdefekt führen, der der wildtypischen Konformation ähnlich ist und möglicherweise erst im ERGIC erkannt wird. Zur Darstellung des Faltungszustandes wurden isolierte Membranen von HEK 293-Zellen, die die GFP-markierten V2R-Mutanten der Klasse A- und B transient exprimierten, 30 Minuten lang mit aufsteigenden Konzentrationen der Serinprotease Trypsin behandelt. Die bei dieser limitierten Proteolyse entstandenen Spaltprodukte wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, und mit Hilfe eines Western Blots nachgewiesen (Bild 3.6). Zum immunologischen Nachweis der Proteine wurde ein polyklonales α -GFP-Antiserum eingesetzt, so dass als Proteolyseprodukte die C-terminalen Fragmente detektiert werden konnten. In diesem Experiment wurden neben dem wildtypischen Rezeptor alle Klasse A-Mutanten (L62P, Δ L62-R64, S167L) und Klasse B-Mutanten (Y205C, V226E, InsQ292, R337X) untersucht. Bei den mit Protease unbehandelten Proben wurden für die Rezeptormutanten nur die kernglykosylierten Formen (*, 60-65 kDa), die den Golgi-Apparat nicht erreicht hatten, nachgewiesen (Krause *et al.*, 2000). Im Falle des wildtypischen Rezeptors waren sowohl die im Golgi-Apparat gebildete, komplex glykosylierte und damit vollständig prozessierte Form des Proteins (#, 75-80 kDa) als auch die im ER entstehende kernglykosylierte („mannosereiche“) Form (*) detektierbar. Bei einigen Mutanten (V226E, Y205C, Δ L62-R64) war auch das unmittelbar nach der Biosynthese entstehende unglykosylierte Protein (+, 56-58 kDa) nachweisbar. In den Spuren der mit der Protease Trypsin in steigenden Konzentrationen (0-150 μ g/ml) behandelten Präparationen der Rezeptormutanten konnten insgesamt 3 verschiedene Abbauprodukte als immunreaktive Proteinbanden von 47, 41 und 32 kDa erhalten werden. Es fällt bei genauerer Betrachtung auf, dass alle V2R-Mutanten der Klasse A ein gemeinsames Spaltpattern aufweisen, wobei die drei genannten Abbauprodukte zu etwa gleichen Anteilen schon bei mäßigen

Trypsinkonzentrationen, also ab 37,5 µg/ml auftraten. Bei den V2R-Mutanten der Klasse B waren prinzipiell die gleichen Degradationsprodukte detektierbar, jedoch trat hauptsächlich das 32 kDa-Produkt auf, wobei die größeren Produkte (47 und 41 kDa) nur zum geringen Anteil sowie nur bei höheren Trypsinkonzentrationen nachweisbar waren. Im Falle der Mutante R337X.GFP waren alle Banden aufgrund der Deletion der letzten 30 Aminosäuren um ca. 4 kDa kleiner. Insgesamt ähnelte das Bild der Klasse B-Mutanten aufgrund der hier lediglich sehr schwach detektierbaren 47 kDa-Bande mehr dem Wildtyp, bei dem nur die beiden prominenten Degradationsprodukte von 41 und 32 kDa detektiert werden konnten. Dieses Experiment deutet an, dass die Rezeptormutanten einer Gruppe einen gemeinsamen bzw. ähnlichen Faltungszustand aufweisen. Die Ähnlichkeit des Spaltmusters von Klasse B-Mutanten mit dem des Wildtyps weist darauf hin, dass diese Proteine einen milderen Faltungsdefekt als Klasse A-Mutanten besitzen. Die Fähigkeit, das ERGIC zu erreichen, könnte somit auf das Vorhandensein bestimmter Faltungszustände zurückzuführen sein, die von der Qualitätskontrolle des ER nicht erkannt werden.

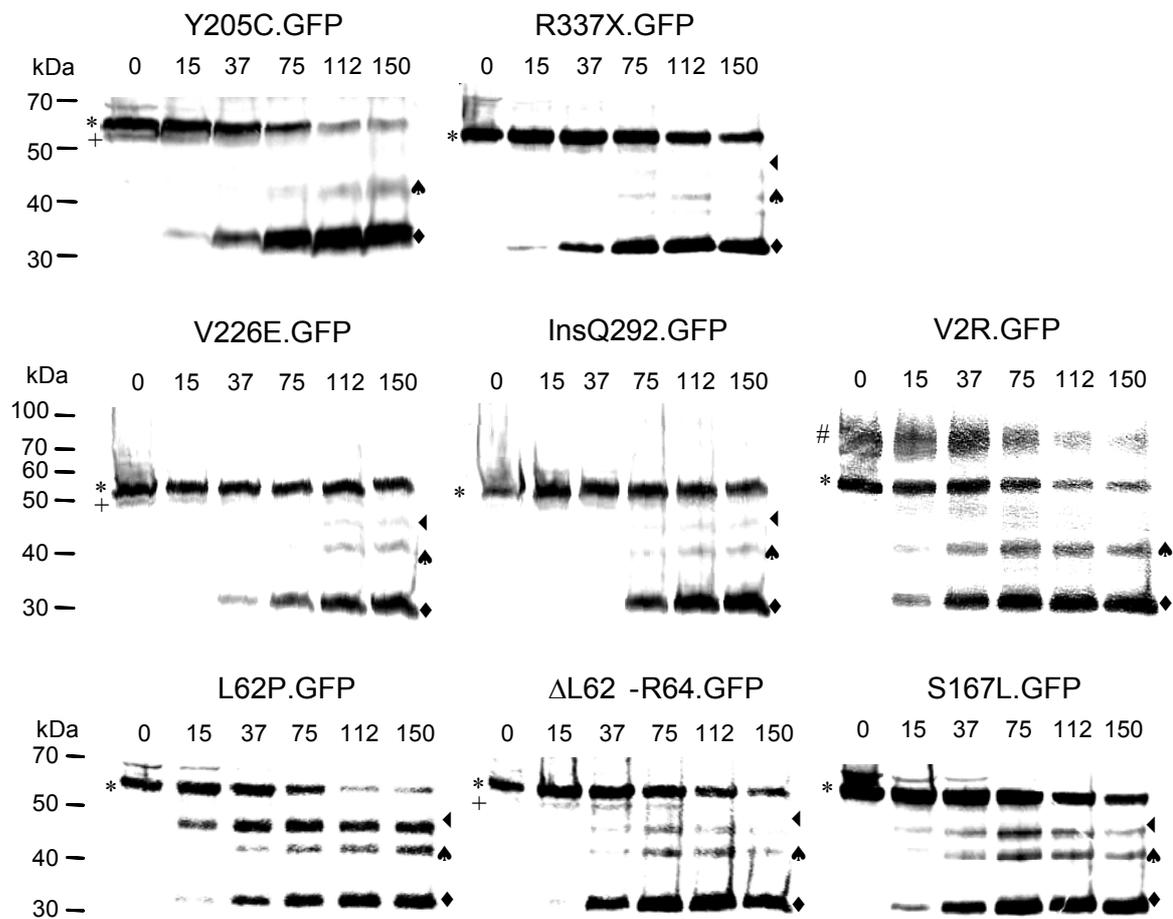


Bild 3.6: Limitierte Proteolyse des V2R und seiner Mutanten in Membranpräparationen

Gesamtzellmembranen aus transient transfizierten HEK 293-Zellen (jeweils 50 μg Gesamtprotein) wurden mit aufsteigenden Trypsinkonzentrationen (0 - 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 30 Minuten bei 4 $^{\circ}\text{C}$ behandelt. Die entstandenen immunreaktiven Proteinfragmente wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit Hilfe von polyklonalen anti-GFP-Antiseren und alkalische Phosphatase-konjugierten anti-Kaninchen-IgG detektiert. Proteinbanden: # komplexe Glykosylierung, * mannosereiche, d.h. kernglykosylierte Form, + unglykosylierte Form, ◀, ▲, ◆ stellen durch Proteolyse entstehende Abbauprodukte dar. Die Abbildung ist repräsentativ für 6 voneinander unabhängige Experimente.

3.2 Wiederherstellung des Transports der V2R-Mutante Y205C zur Plasmamembran („Rescue“)

Klasse A- und Klasse B-Mutanten werden in unterschiedlichen Kompartimenten des frühen sekretorischen Transportweges retiniert. Als nächstes wurde überprüft, ob die zellpenetrierenden, amphipathischen Peptide Penetratin und das synthetische Modellpeptid KLAL den Transport der V2R-Mutanten an die Plasmamembran wiederherstellen können („Rescue“). Wie in der Einleitung erwähnt, wurde zufällig festgestellt, dass diese Peptide den Transport von V2R-Mutanten beeinflussen können. Hierzu könnten mehrere Eigenschaften der Peptide beitragen: Zunächst könnte ihre Amphipathizität (siehe Bild 1.6) vielerlei hydrophobe und/oder nichthydrophobe Wechselwirkungen mit Proteinen der Qualitätskontrolle im Sinne einer kompetitiven Verdrängung erlauben. Darüberhinaus war in früheren Untersuchungen neben der Penetrationsfähigkeit ein endozytotischer Aufnahmeweg der Peptide in Zellen berichtet worden (Drin *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004). Nach jenen Erkenntnissen werden die Peptide über Endosomen retrograd bis zum Golgi-Apparat transportiert, ohne das ER zu erreichen, bevor sie ins Zytoplasma transloziert werden. Diese Beobachtungen machten die Peptide vor allem für einen kompartimentspezifischen bzw. Post-ER-spezifischen „Rescue“ bei den im ERGIC retinierten V2R-Mutanten der Klasse B interessant.

3.2.1 Kontrolle der Plasmamembranintegrität unter Peptidbehandlung

Zellpenetrierende Peptide sind prinzipiell in der Lage, die Plasmamembranintegrität einiger Zellen zu beeinträchtigen. Die bereits bekannte Fähigkeit zur Porenbildung können bei Konzentrationen ab 10 μM bei einigen Bakterienstämmen eine antibiotische Wirkung zur Folge haben (Gazit *et al.*, 1994; Dathe und Wieprecht, 1999; Park *et al.*, 2000). Somit könnten eventuelle „Rescue“-Effekte der Peptide bei Säugerzellen auch Artefakte darstellen. Um dies auszuschließen, wurde zunächst überprüft, ob die Integrität der Plasmamembran nach der Zugabe der Peptide erhalten bleibt. Untransfizierte HEK 293-Zellen wurden dazu über 12 Stunden mit den Peptiden Penetratin bzw. KLAL in den Konzentrationen 1, 5, 10, 50 und 100 μM inkubiert, bevor sie mittels Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht wurden. 15 Minuten vor den Aufnahmen wurden die Zellen mit dem Plasmamembranmarker Trypanblau behandelt, dessen Fluoreszenzsignale bei Zellen mit geschädigter Membran auch intrazellulär detektierbar sind, während intakte Membranen für diesen Farbstoff undurchlässig sind. Bild 3.7 zeigt, dass Trypanblau bis zu einer Penetratinkonzentration von 100 μM bzw. einer KLAL-Konzentration von 50 μM nur an der Zelloberfläche detektierbar war. Intrazelluläre Signale, die auf eine Membranschädigung hindeuten, waren nur im Falle der höchsten KLAL-Konzentration (100 μM) zu erkennen. Als Kontrolle wurde das nichtionische Detergenz Triton-X100 eingesetzt, welches bei einer Konzentration von 0,1% (m/V) Zellmembranen perforiert. In den folgenden Experimenten wurden die Peptide in einer Konzentration von 1 bzw. 5 μM eingesetzt. Bei diesen Konzentrationen konnte daher davon ausgegangen werden, dass die Integrität der Plasmamembran erhalten bleibt.

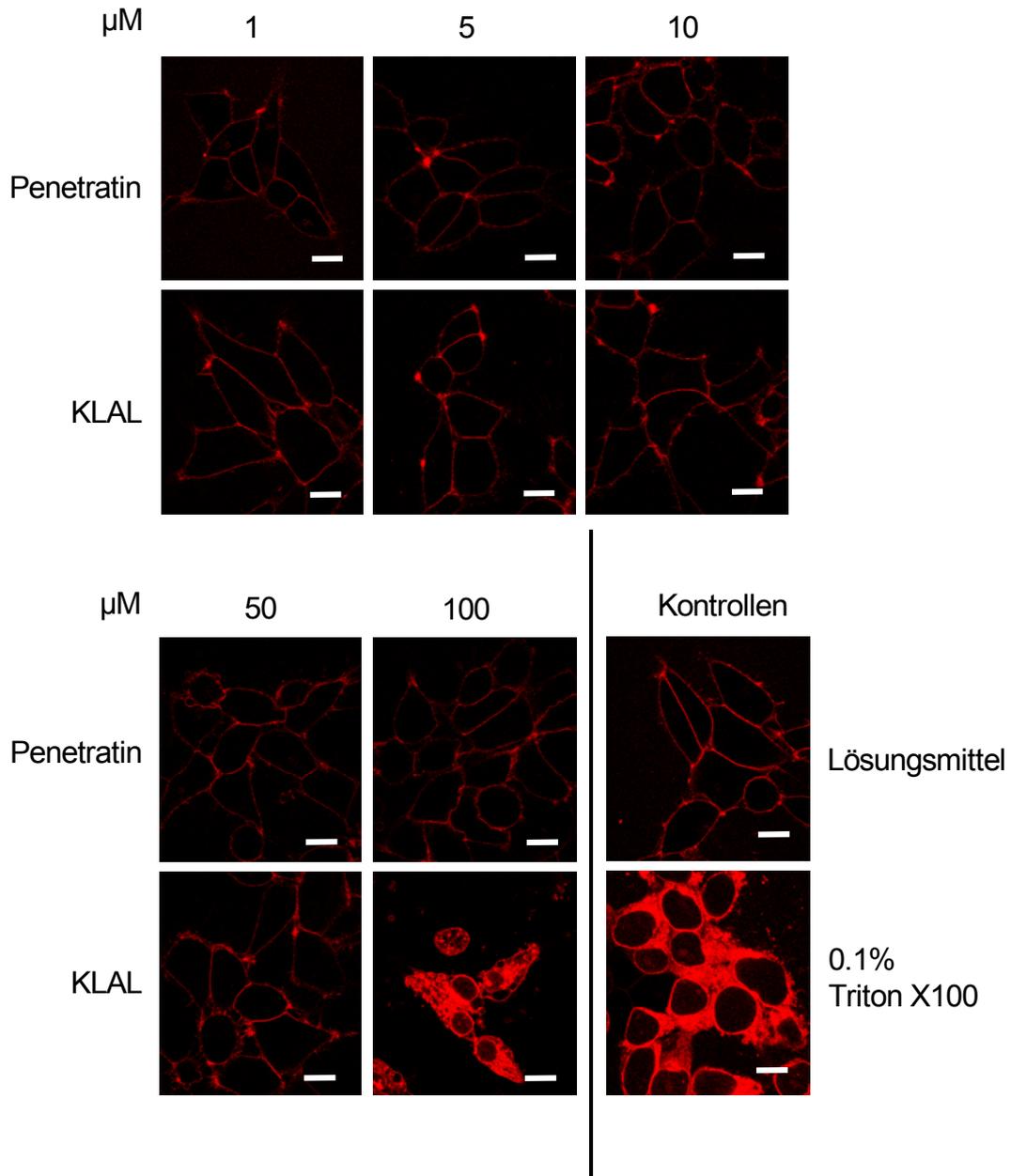


Bild 3.7: Kontrolle der Plasmamembranintegrität peptidbehandelter HEK 293-Zellen mittels LSM

Abgebildet sind untransfizierte Zellen, deren Plasmamembran nach 12 Stunden Peptidbehandlung in den angezeigten Konzentrationen mit Trypanblau angefärbt wurden. Die mikroskopische Aufnahme erfolgte 15 Minuten nach der Zugabe von Trypanblau. In unbeschädigten Zellen blieb die Trypanblaufluoreszenz membrangebunden. Bei geschädigten Zellen war der Farbstoff intrazellulär zu detektieren (siehe Positivkontrolle und KLAL 100 μM). Maßstab 10 μm.

3.2.2 Rescue der Y205C-Mutante durch Peptidbehandlung: Mikroskopische Untersuchungen

Um zu überprüfen, ob die Peptide Penetratin und KLAL die zur Retention der V2R-Mutanten führenden Qualitätskontrollmechanismen beeinflussen können, wurden mikroskopische Untersuchungen nach Peptidbehandlung durchgeführt. Eine Lockerung der Qualitätskontrolle würde sich dabei durch die Wiederherstellung des Transports an die Plasmamembran zeigen. Mit den V2R-Mutanten L62P und Y205C transient transfizierte HEK 293-Zellen wurden 12 Stunden lang mit den Peptiden in einer Konzentration von 1 μ M behandelt und die GFP-Fluoreszenz mikroskopisch analysiert (Bild 3.8). Die Plasmamembran der gleichen Zellen wurde zur Orientierung mit Trypanblau gefärbt. In unbehandelten Zellen konnte eine Überlagerung von GFP- und Trypanblausignalen nur im Falle des wildtypischen Rezeptors detektiert werden. Die hier vorhandenen intrazellulären Fluoreszenzsignale stellten Transportintermediate neu synthetisierter Proteine und/oder aufgrund der Überexpression retinierte Rezeptoren dar (Schülein *et al.*, 1998; Schülein *et al.*, 2000). Die Peptidbehandlung hatte keinen Einfluß auf den Transport des wildtypischen Rezeptors an die Plasmamembran. Bei den beiden V2R-Mutanten war die GFP-Fluoreszenz in unbehandelten Zellen (entsprechend Bild 3.2) nur intrazellulär zu detektieren. Nach Penetratin- und KLAL-Behandlung konnte der Transport der Y205C-Mutante an die Plasmamembran wiederhergestellt werden, die intrazelluläre Retention der L62P-Mutante wurde dagegen nicht überwunden. Zieht man die Zugehörigkeit der Rezeptormutanten zu den zwei unterschiedlichen Klassen in Betracht, erscheint es möglich, dass die Peptide kompartimentspezifisch oder zumindest post-ER-spezifisch die Qualitätskontrolle inhibieren.

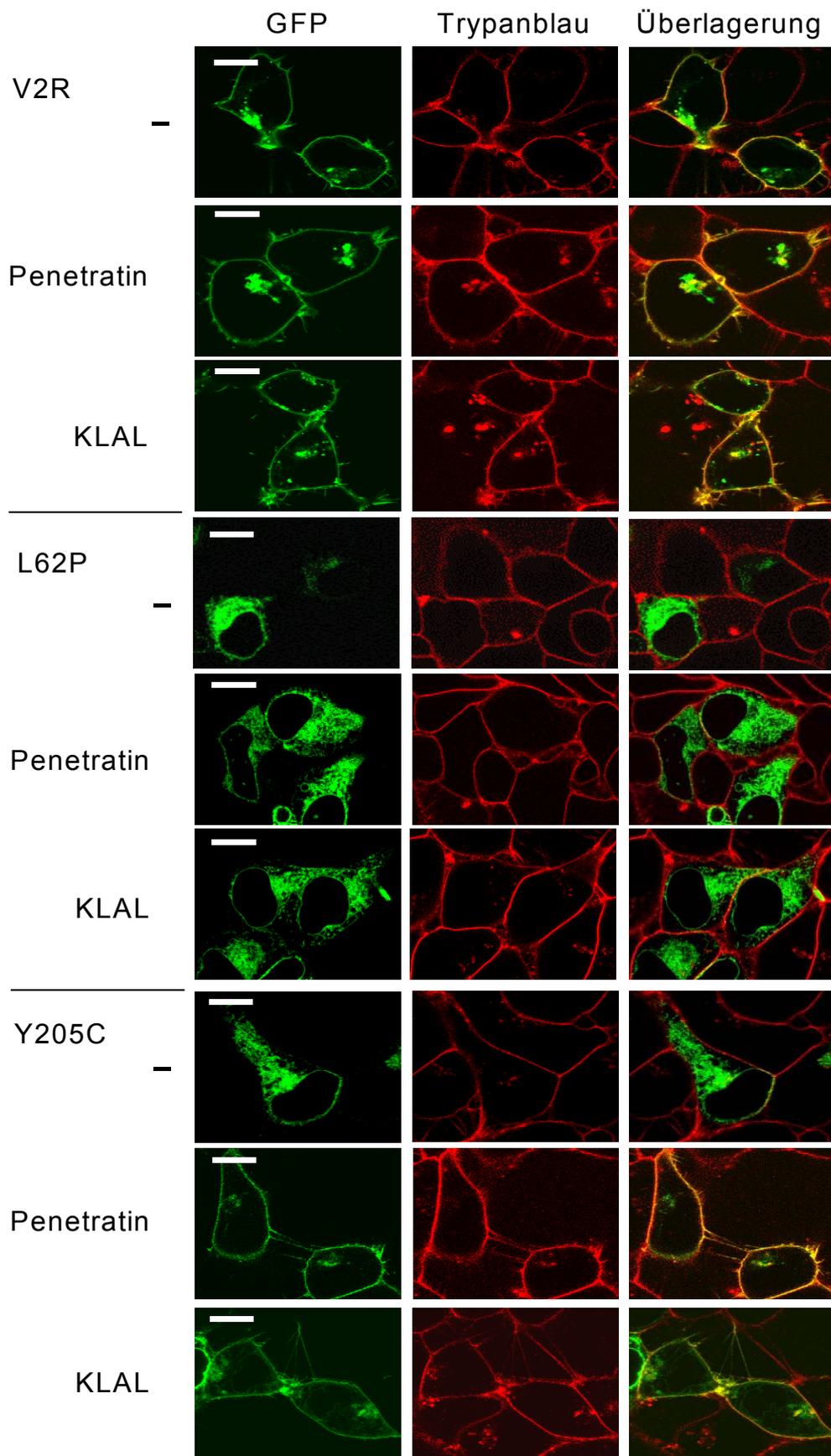


Bild 3.8: Lokalisation des wildtypischen V2R und seiner Mutanten L62P und Y205C nach Peptidbehandlung mittels LSM

Mit V2R.GFP, L62P.GFP und Y205C.GFP transient transfizierte HEK 293-Zellen wurden lebend untersucht. Die Zellen wurden mit Penetratin bzw. KLAL in einer Konzentration von 1 μ M behandelt oder blieben unbehandelt (-). Die GFP-Fluoreszenz gab die Lokalisation der Rezeptoren wieder (links, grün). Zum Nachweis der Rezeptoren an der Plasmamembran wurde diese mit Trypanblau angefärbt (Mitte, rot). Im Falle des wildtypischen Proteins und der peptidbehandelten Y205C-Mutante war in der Überlagerung eine Lokalisation an der Zelloberfläche zu sehen (rechts, gelb). Maßstab 10 μ M.

3.2.3 Quantifizierung des „Rescue“-Effekts

Um die Effekte der beiden Peptide auf den Transport der V2R-Mutanten zu quantifizieren, wurde der Quotient aus den Fluoreszenzintensitäten an der Plasmamembran und intrazellulären Arealen errechnet. Dabei wurden wiederum transient transfizierte HEK293-Zellen mit einem Stichprobenumfang von $n=30$ analog Bild 3.8 per LSM mikroskopisch analysiert (Bild 3.9). Zur Quantifizierung wurde auf der Ordinate der Verteilungsquotient der Fluoreszenzintensitäten aus plasmamembranständigen und intrazellulären Rezeptoren (PM/IZ) aufgetragen. Im Fall der unbehandelten Y205C-Mutante erhielt man einen kleineren Wert als 1, der eine vorwiegend intrazelluläre Lokalisation anzeigt. Die Peptidbehandlung ergab bei dieser Mutante sowohl für Penetratin als auch für KLAL einen höheren Wert als 1, der einen „Rescue“ zur Plasmamembran wiedergibt. Im Gegensatz zur Y205C-Mutante wurden die Werte bei der L62P-Mutante (0,3) und dem wildtypischen Rezeptor (1,7) durch die Peptidbehandlung nicht signifikant verändert.

Quotient PM/IZ \pm SD	WT	L62P	Y205C
unbehandelt	1,74 \pm 0,42	0,30 \pm 0,11	0,39 \pm 0,06
Penetratin	1,74 \pm 0,38	0,30 \pm 0,11	1,54 \pm 0,18 (*)
KLAL	1,68 \pm 0,34	0,31 \pm 0,11	1,86 \pm 0,18 (*)

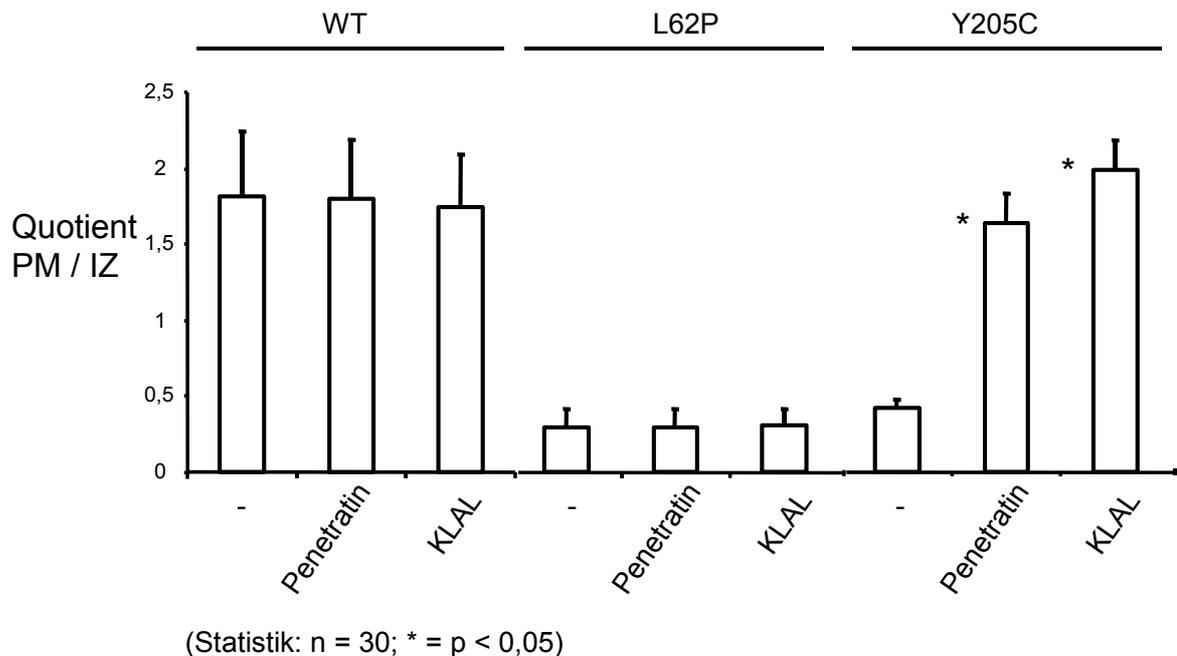


Bild 3.9: Quantifizierung der membranständigen Fluoreszenzsignale aus Bild 3.8

Aufgetragen ist der Quotient aus der Fluoreszenzintensitäten an der Plasmamembran (PM) und intrazellulären Signalen (IZ). Die Werte aus der Tabelle geben in Form der Balken den arithmetischen Mittelwert von jeweils 30 untersuchten Zellen wieder; die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen (SD) an; die Normalverteilung der Werte wurde vorher überprüft und bestätigt. * zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrolle bei einem Konfidenzintervall von $\alpha=0,05$ an. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 voneinander unabhängige Experimente.

3.2.4 Biochemischer Nachweis des „Rescue“-Effekts

Um den am Laser-Scanning-Mikroskop beobachteten „Rescue“ biochemisch -und damit von einer visuellen Vorselektion der Zellen unabhängig- zu bestätigen, wurden Biotinylierungsexperimente mit stabil transfizierten HEK 293-Zellklonen durchgeführt. Die Zellklone der drei Konstrukte V2R.GFP, L62P.GFP und Y205C.GFP wurden vor dem Versuch für 12 Stunden mit Penetratin (1 und 5 μ M) bzw. KLAL (1 μ M) behandelt. Die Oberflächenproteine von intakten Zellen wurden dann mit Sulfo-NHS-Biotin markiert, die biotinylierten Proteine nach Zellyse mit Neutravidin präzipitiert und die an der Zelloberfläche befindlichen Rezeptoren auf einem Western-Blot mit einem anti-GFP-Antikörper detektiert (Bild 3.10). Im Falle des wildtypischen Rezeptors war eine immunreaktive Proteinbande von 75-80 kDa detektierbar (#), die die komplex glykosylierte Form des Rezeptors darstellte (Schüle *et al.*, 2001). Die Peptide Penetratin und KLAL hatten in diesem Experiment keinen Einfluß auf den Transport des V2R an die Plasmamembran. Bei der L62P-Mutante waren sowohl unbehandelt als auch peptidbehandelt keine Banden nachweisbar, d.h. bei dieser Mutante wurde der Transport durch die Peptide nicht wiederhergestellt. Im Falle der Y205C-Mutante war bei den peptidbehandelten Proben eine deutliche Bande des reifen, komplex glykosylierten Proteins bei 75-80 kDa detektierbar (#), was darauf hinwies, dass der Transport zur Plasmamembran auch in diesem Fall mit einer korrekten Prozessierung im Golgi-Apparat einherging. Dieses Ergebnis bestätigt mit einer biochemischen Methode den selektiven „Rescue“-Effekt der Peptide auf den Transport der V2R-Mutante Y205C. Die vor allem beim Wildtyp vorhandene 60-65 kDa-Bande der mannosereichen, kernglykosylierten Rezeptoren (*) deutet darauf hin, dass einige Zellen beschädigt und intrazelluläre Rezeptoren biotinyliert wurden. Dass die Proteinbanden beim V2R ungleich stärker waren, wurde durch eine höhere metabolische Stabilität bzw. längere Halbwertszeit der wildtypischen Form hervorgerufen.

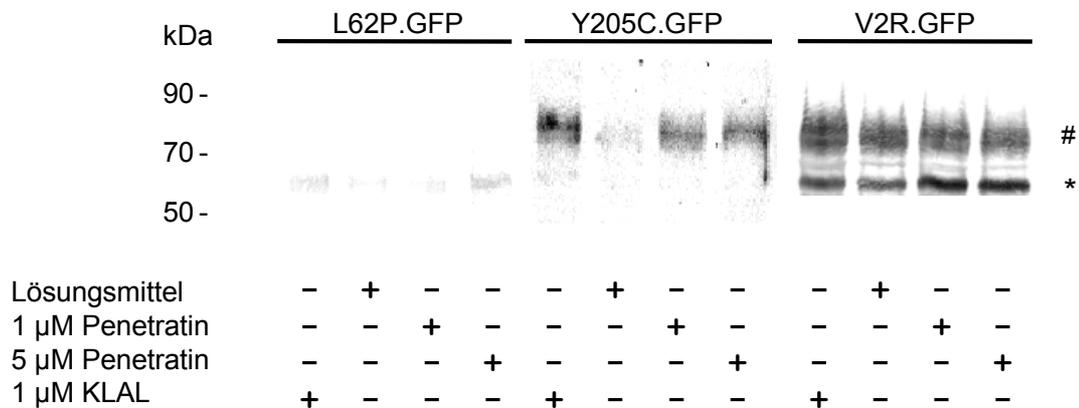


Bild 3.10: Nachweis der zur Zelloberfläche transportierten Rezeptoren durch Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen

Die Oberflächenproteine von peptidbehandelten oder unbehandelten stabil exprimierenden HEK 293-Zellklonen wurden mit Biotin markiert, mit Neutraavidin isoliert und in einem Western-Blot mit einem polyklonalen anti-GFP-Antiserum detektiert. Die immunreaktive Bande bei 75-80 Kilodalton zeigt die komplex glykosylierten Rezeptoren (#), die Bande bei 60-65 Kilodalton zeigt die mannosereichen, kernglykosylierten Rezeptoren (*) an. Die Abbildung ist repräsentativ für 4 voneinander unabhängige Experimente.

Bis zu diesem Punkt konnte ein „Rescue“ für Penetratin und KLAL gezeigt werden. Um zu untersuchen, ob noch weitere zellpenetrierende Peptide die Retention der V2R-Mutante Y205C beeinflussen können, wurden weiterhin das Peptid Tat (Aminosäuren 49-57 des Tat-Proteins, Sequenz: RKKRRQRRR (Vives *et al.*, 1997)) sowie K-FGF (hydrophobes Signalpeptid aus einem Wachstumsfaktor der Kaposi-Sarkomfibroblasten, Sequenz: AAVALLPAVLLALLAP (Lin *et al.*, 1995)) auf diese Aktivität hin untersucht. Als geeignete Negativkontrolle für die „Rescue“-Experimente wurde im weiteren ein KLAL-Peptid mit ungeordneter Aminosäuresequenz („KALK“) und fehlender Amphipathizität in der α -Helix eingesetzt (Sequenz: KALKLKLALALLAKLKLA (Rothemund *et al.*, 1995)). Die zelluläre Aufnahme dieses Peptids ist nicht vollständig aufgehoben, wodurch es eine geeignete Kontrolle ist, um zu überprüfen, ob der „Rescue“-Effekt von der Amphipathizität abhängig ist. Für diese Kontrollexperimente wurden HEK 293-Zellen wieder mit den V2R-Mutanten Y205C bzw. L62P transient transfiziert und für 12 Stunden mit den Peptiden Tat, K-FGF und KALK in einer Konzentration von 1 bzw. 5 μ M inkubiert. Keines dieser Peptide war in der Lage, den Transport der Y205C-Mutante sowie der L62P-Mutante zur Plasmamembran

wiederherzustellen; die erhaltenen mikroskopischen Aufnahmen zeigten (analog L62P in Bild 3.8) lediglich Zellen, in denen die GFP-Fluoreszenz der V2-Rezeptormutanten nur intrazellulär detektierbar war. Somit ließ sich die V2R-Mutante Y205C nur durch Penetratin und KLAL, nicht aber durch andere zellpenetrierende Peptide wieder zur Plasmamembran transportieren. Welche Eigenschaften der Peptide hierfür verantwortlich sind, ist bisher unklar und bleibt in zukünftigen Experimenten zu untersuchen.

3.3 Analyse der Assoziation von V2R-Mutanten mit Qualitätskontrollkomponenten

Das zelluläre Qualitätskontrollsystem ist im wesentlichen durch Protein-Protein-Interaktionen zwischen naszierenden, d.h. neu synthetisierten Proteinen und molekularen Chaperonen gekennzeichnet. Es konnte schon in früheren Untersuchungen herausgestellt werden, dass fehlgefaltete Proteine eine verlängerte Assoziation mit Qualitätskontrollkomponenten ausbilden (Morello *et al.*, 2001; Frenkel *et al.*, 2004). Wie jedoch das ERGIC zur Qualitätskontrolle von Membranproteinen beiträgt, konnte bislang noch nicht aufgeklärt werden. Hinweise aus neueren Berichten zeigen aber, dass das Chaperon BiP (GRP78), welches zwischen ER und ERGIC pendelt, im Falle der α -Untereinheit des T-Zellrezeptors eine wichtige Rolle spielen könnte (Yamamoto *et al.*, 2001). Das globuläre Protein BiP (GRP78) ist ein molekulares Chaperon, welches im ER-Lumen exprimiert wird (Kassenbrock und Kelly, 1989; Sitia und Braakman, 2003). Es ist an der co- und posttranslationalen Faltung fast aller Membranproteine beteiligt, darüber hinaus an der Verhinderung der Aggregation fehlgefalteter Proteine. Eine verlängerte Bindung von BiP an diese transportdefekten Proteine ist mitverantwortlich für ihre Retrotranslokation durch die ER-Membran ins Zytoplasma und die Zuführung dieser Proteine zum ERAD (Kabani *et al.*, 2003). Eine Assoziation des V2R und seiner Mutationen mit diesem Chaperon ist bisher nicht berichtet worden. Bekannt ist lediglich die Interaktion des Rezeptors mit dem Calnexin/Calreticulin-Chaperonsystem (Morello *et al.*, 2001).

3.3.1 Koimmunpräzitationsuntersuchungen

Um zu überprüfen, welche molekularen Chaperone mit V2R-Mutanten assoziiert sind, wurden Koimmunpräzitationen mit den stabil exprimierenden Zellklonen durchgeführt (Bild 3.12). Dazu wurde zunächst untersucht, ob im Präzipitat die zu erwartenden Membranproteine vorlagen (Bild 3.11). Für den Wildtypen wurde komplex glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 75-80 kDa und kernglykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 60–65 kDa nachgewiesen. Die starke Bande des komplex glykosylierten Proteins zeigte, dass der wildtypische Rezeptor effizient prozessiert und zur Plasmamembran transportiert wurde. Beide Mutanten hingegen wurden schwächer exprimiert. Bei der L62P-Mutante konnte nur die kernglykosylierte Form nachgewiesen werden. Für die Y205C-Mutante hingegen war auch eine schwache Bande der komplex glykosylierten Form nachweisbar, die zeigte, dass dieses Protein nicht nur das ERGIC erreichte, sondern geringe Mengen auch bis zum Golgi-Apparat kamen. Man konnte also bis hierhin beim peptidvermittelten „Rescue“ der Y205-Mutante nur von einer post-ER-Spezifität sprechen, da es prinzipiell möglich war, dass die Peptide diese V2R-Mutante neben dem ERGIC auch im Golgi-Apparat zu erreichen vermochten.

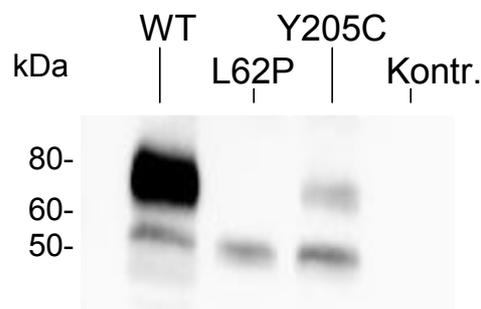


Bild 3.11: Nachweis der immunpräzipitierten Rezeptoren im Western-Blot

Die in HEK 293-Zellen stabil exprimierten Fusionsproteine V2R.GFP (WT), L62P.GFP und Y205C.GFP wurden mit dem polyklonalen anti-GFP-Antiserum präzipitiert, mittels SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt, und im Western-Blot mit einem monoklonalen, gegen GFP gerichteten Antikörper aus der Maus detektiert. Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen eingesetzt. Die Proteinbande bei 75-80 kDa stellt die komplex glykosylierten Rezeptoren, die 60-65 kDa-Bande die kernglykosylierte Form dar. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

3.3.2 Penetratin und KLAL führen zur Dissoziation von BiP und der Y205C-Mutante

Um die mit den V2R-Mutanten kopräzipitierten und mit geringer Affinität assoziierten molekularen Chaperone nachzuweisen, deren Funktion kalziumabhängig ist (Booth und Koch, 1989; Brostrom und Brostrom, 2003; Hendershot, 2004), musste ein mildes Detergenz (Laurylmaltosid) und ein kalziumhaltiger Immunpräzipitationspuffer eingesetzt werden. Es konnte dabei sowohl für den Wildtyp als auch für die V2R-Mutanten L62P und Y205C kopräzipitiertes BiP mit einem polyklonalen Antikörper nachgewiesen werden (Bild 3.12). Für die Rezeptormutanten L62P und Y205C wurde ein deutliches, für den Wildtypen hingegen ein schwächeres Signal erhalten (Bild 3.12 A). Die stärkere Bindung von BiP an die beiden V2-Rezeptormutanten deutete an, dass BiP bei der Retention dieser im ER eine Rolle spielte. Die Bindung von BiP an den wildtypischen Rezeptor zeigte, dass BiP offensichtlich auch im Faltungsprozess dieses Proteins involviert war.

Wie bereits in den obigen Abschnitten beschrieben wurde, führte die Peptidbehandlung bei der Y205C-Mutante zu einer Wiederherstellung des Transports an die Plasmamembran. Um zu überprüfen, ob dies durch die Verdrängung von BiP geschieht, wurden entsprechende Koimmunpräzipitationsexperimente nach zwölfstündiger Vorbehandlung der Zellklone mit Penetratin und KLAL, die einen „Rescue“ der Y205C-Mutante bewirkt, durchgeführt (Bild 3.12 B). Der Western-Blot zeigte deutlich, dass nach Peptidbehandlung der V2R-Mutante Y205C kein kopräzipitiertes BiP mehr detektierbar war. Somit ging die peptidvermittelte Wiederherstellung des Transports der Y205C-Mutante mit einer Dissoziation von BiP einher. Unter gleichen Bedingungen wurde die Bindung von BiP an den wildtypischen Rezeptor und an die ausschließlich im ER retinierte Mutante L62P nicht signifikant verändert. Warum BiP nur bei V2R-Mutanten verdrängbar war, die das ERGIC erreichen, sollte im Folgenden geklärt werden.

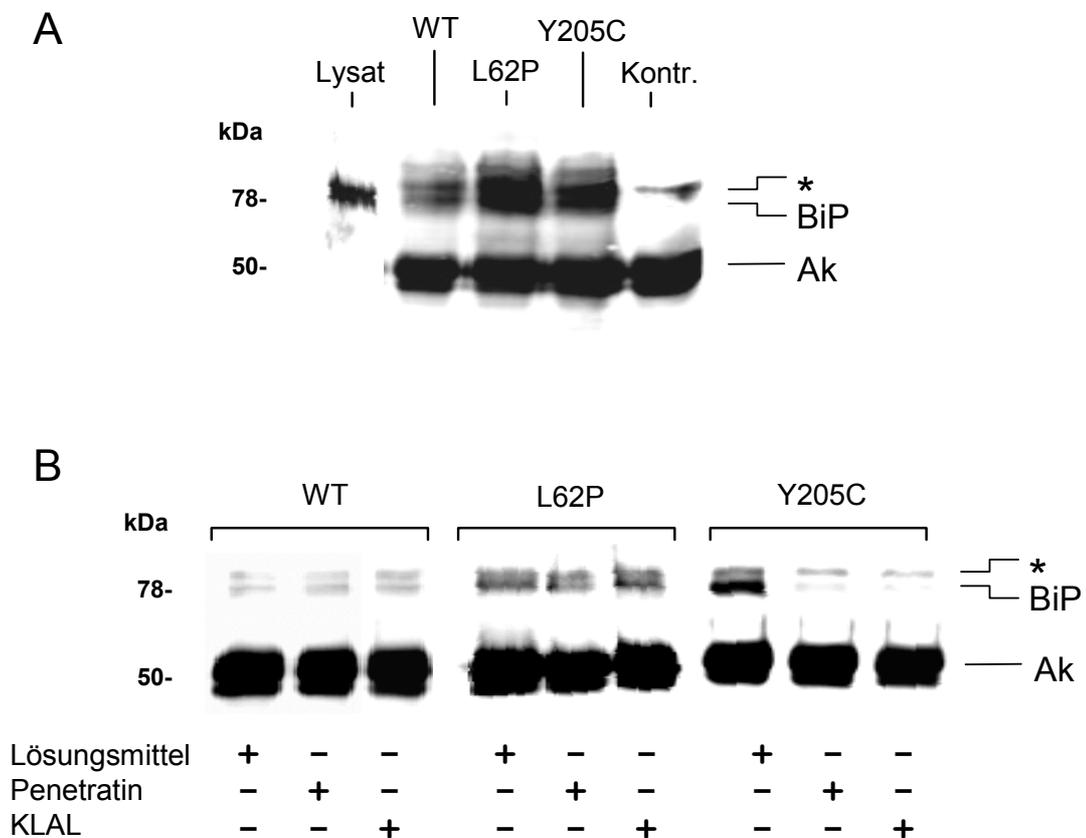


Bild 3.12: Immunologischer Nachweis von mit Rezeptoren kopräzipitiertem, endogen exprimiertem BiP (GRP78)

Die in HEK293-Zellen stabil exprimierten Fusionsproteine V2R.GFP (WT), L62P.GFP und Y205C.GFP wurden mit dem polyklonalen anti-GFP-Antiserum präzipitiert, mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, und der Western-Blot mit einem polyklonalen, ebenfalls aus dem Hasen stammenden, gegen BiP gerichteten Antiserum entwickelt. Die Abbildungen repräsentieren jeweils 3 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

A: In der linken Spur wurde zum Nachweis der Expression von BiP HEK 293-Gesamtlysat aufgetragen. Der Antikörper erkennt ein Protein mit einem Molekulargewicht von 78 kDa (BiP/GRP78). In den anderen Spuren wurden die Koimmunpräzipitate des Wildtyps und der V2-Rezeptormutanten aufgetragen. Als Kontrolle wurden die Immunpräzipitate untransfizierter Zellen verwendet. Die untere breite Proteinbande bei ca. 50 kDa stellt den präzipitierenden Antikörper dar (Ak). Oberhalb des BiP-Proteins ist noch eine unspezifische Bande (*) nachweisbar.

B: Wie Abbildung A, jedoch nach zwölfstündiger Behandlung mit Penetratin bzw. KLAL.

In weiteren Untersuchungen wurde mit dem gleichen experimentellen Ansatz überprüft, ob dieser Mechanismus der Peptide für BiP spezifisch ist, oder ob sich auch andere molekulare Chaperone von der Y205C-Mutante verdrängen lassen. Hierbei konnten für die ebenfalls hoch exprimierten molekularen Chaperone Calnexin und GRP94 schwache bis mäßige Assoziationen nachgewiesen werden, die jedoch durch die Peptidbehandlung nicht beeinflusst wurden. Dies lässt darauf schließen, dass die Peptide einen spezifischen Effekt auf die Bindung von BiP ausüben, und offenbar auf Interaktionen mit anderen Qualitätskontrollkomponenten keinen Einfluss haben.

3.4 Intrazelluläre Lokalisation der eingesetzten Zellpenetrierenden Peptide

Die beiden Oligopeptide Penetratin und KLAL gehören zur Gruppe der zellpenetrierenden Peptide („CPPs“). Sie nehmen eine amphipatisch-helikale Konformation ein (Lundberg und Langel, 2003; Trehin und Merkle, 2004). Penetratin liegt in hydrophober Umgebung in einer annähernd idealen Helix vor (Derossi *et al.*, 1994). In früheren Publikationen wurde berichtet, dass zellpenetrierende Peptide neben der endozytoseunabhängigen Penetration in die Zellen auch endozytotisch ins Zellinnere aufgenommen werden können, da sie eine hohe Affinität zu Biomembranen (Drin *et al.*, 2003) sowie zu endozytosevermittelnden Membranproteinen aufweisen (Richard *et al.*, 2005). Dabei wurde nachgewiesen, dass nach dem Aufenthalt in frühen und späten Endosomen der Golgi-Apparat, nicht jedoch das ER erreicht wird. Bis zum Golgi-Apparat bleiben danach die Peptide membrangebunden, um von dort aus ins Zytoplasma transloziert zu werden. Der genaue Austrittsort sowie Austrittsmechanismus sind jedoch noch nicht bekannt. Im Zytosol werden die Peptide dann durch Peptidasen in Bruchstücke gespalten, welche teils aus der Zelle ausgeschleust werden, teils in den Zellkern wandern (Fischer *et al.*, 2004).

Die bereits beschriebenen Mechanismen könnten den durch die Peptide vermittelten post-ER-spezifischen „Rescue“ der Y205C-Mutante gut erklären, sofern die Peptide über den Golgi-Apparat bis zum ERGIC transportiert werden und dabei das ER nicht erreichen. Um dies zu überprüfen, wurden N-terminal mit Carboxyfluoreszin markierte Peptide eingesetzt. Dabei wurden die Zellen mit den Peptiden vorbehandelt und diese dann mittels LSM intrazellulär lokalisiert. Zum Nachweis der Peptide im ERGIC wurden die Zellen mit Bafilomycin A1 behandelt, da hier aufgrund der geringen Kapazität des ERGICs ebenfalls das Problem der

mangelnden Detektierbarkeit herrschte. Bei nur mit Peptid (ohne Bafilomycin A1) behandelten HEK293-Zellen war die Fluoreszenz intrazellulär in kleinen punktförmigen Kompartimenten zu erkennen (Bild 3.13 A), was auf eine endozytische Aufnahme hindeutet (Richard *et al.*, 2003). Wurden die Zellen 2 Stunden nach der Peptidzugabe für 4 Stunden mit Bafilomycin A1 behandelt (Blockade des vesikulären retrograden Transports vom ERGIC ins ER; siehe Abschnitt 3.1), akkumulierten die Peptide in einem perinukleären Bereich, der dem ERGIC entsprach (Bild 3.13 B; siehe auch Abschnitt 3.1). Die Kolo-kalisation der Peptide mit dem Markerprotein ERGIC 53 konnte in zusätzlichen, entsprechend der Bilder 3.3 – 3.5 durchgeführten Immunfluoreszenzexperimenten bestätigt werden. Die Tatsache, dass die Peptide nach Bafilomycin A1-Behandlung im ERGIC akkumulierten, weist auch darauf hin, dass die Peptide das ERGIC über COP I-positive Vesikel verlassen. Allerdings ist ein retrograder Transport zum ER in COP I-Vesikeln eher unwahrscheinlich, da die Peptide nicht im ER lokalisiert werden konnten. Jedoch startet im ERGIC möglicherweise ein neuartiger COP I-abhängiger Degradationsweg, in den die Peptide normalerweise eingeschleust werden.

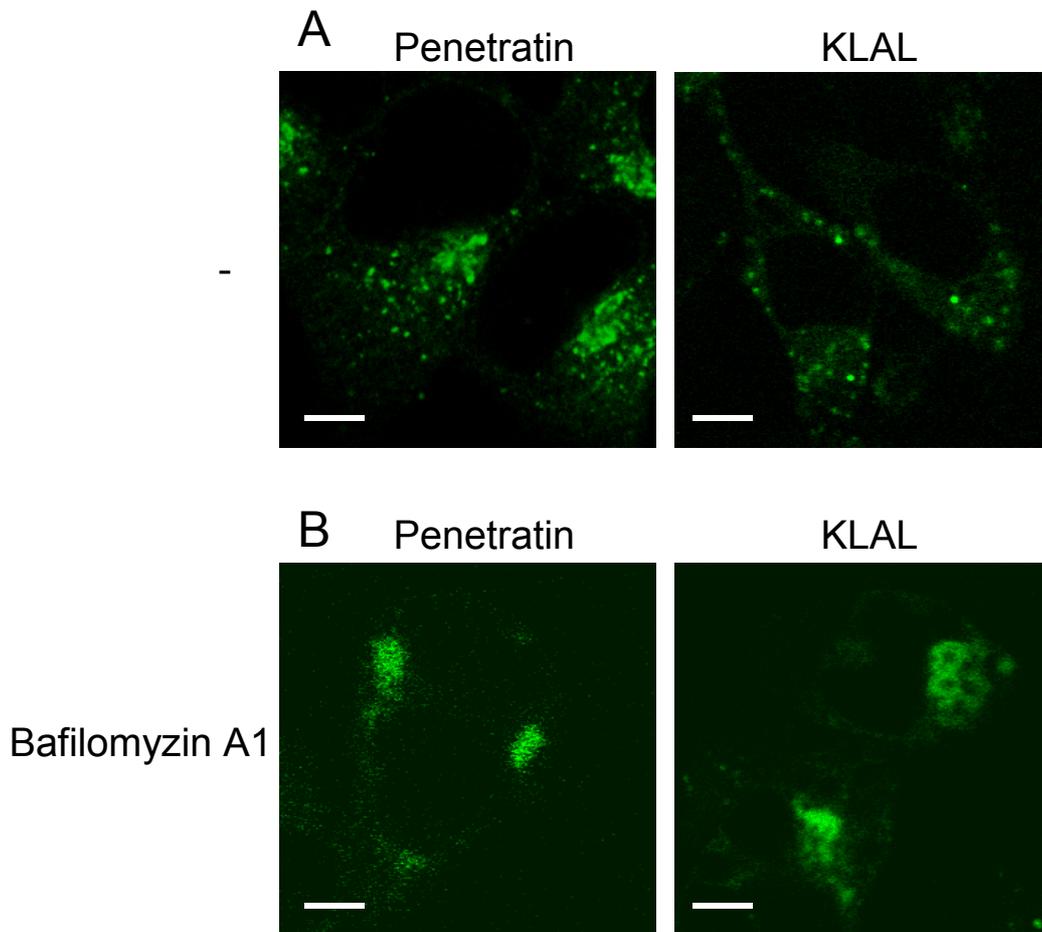


Bild 3.13: Lokalisation der fluoreszenzmarkierten Peptide Penetratin und KLAL in HEK 293-Zellen vor und nach Bafilomycin A1-Behandlung mittels LSM

Die Aufnahmen stammen von untransfizierten, peptidbehandelten Zellen ($1 \mu\text{M}$). Die grüne Farbe stellt die 6-Carboxyfluoreszin-Fluoreszenz der Peptide dar. A: Zellen, die nur mit Peptiden ($1 \mu\text{M}$) behandelt wurden (6 Stunden). B: Zellen, die 2 Stunden nach Peptidbehandlung zusätzlich für 4 Stunden mit Bafilomycin A1 ($1 \mu\text{M}$) behandelt wurden. Maßstab $5 \mu\text{m}$.

3.4.1 Penetratin / KLAL und Y205C kolokalisieren nach BafilomyzinA1-Behandlung

Aus früheren Studien war bekannt, dass einige zellpenetrierende Peptide über einen endosomalen, retrograden Transportweg den Golgi-Apparat, nicht aber das ER erreichen (Drin *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004). Dies konnte den Umstand erklären, dass die Peptide den Transport der ausschließlich im ER retinierten V2R-Mutante L62P nicht beeinflussten. Um zu überprüfen, ob Penetratin und KLAL in den hier untersuchten HEK 293-Zellen Y205C im ERGIC, nicht jedoch L62P im ER erreichen, wurden die fluoreszenzmarkierten Peptide in HEK 293-Zellen diesmal mit V2R-Mutanten kolokalisiert, die als CFP-Fusionsproteine transient transfiziert wurden, da die Emissionswellenlängen von GFP und Carboxyfluoreszin sich fast vollständig überlagern. Die Zellen wurden auch hier 2 Stunden nach der Peptidzugabe zusätzlich über 4 Stunden mit Bafilomyzin A1 behandelt, um die Peptide und die entsprechenden Membranproteine im ERGIC zu akkumulieren. Die LSM-Aufnahmen der lebenden Zellen zeigten bei beiden Peptide eine perinukleäre Akkumulation und eine Kolokalisation mit der Y205C-Mutante, nicht aber mit der L62P-Mutante (Bild 3.14). Dieses Experiment zeigt in Übereinstimmung mit Fischer *et al.* (2004), dass die Peptide das ER nicht erreichen. Diese Daten können somit plausibel den post-ER-spezifischen Effekt der Peptide erklären.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus Abschnitt 3.2 führte die Behandlung der Zellen mit fluoreszenzmarkierten Peptiden zu keinem „Rescue“ der V2R-Mutante Y205C (Bild 3.14), wobei der Grund hierfür in der kürzeren Behandlungszeit von 6 Stunden lag. Wurden die Zellen mit diesen fluoreszenzmarkierten Peptiden über 12 Stunden behandelt, war der „Rescue“ bei der Y205C-Mutante entsprechend Bild 3.8 wieder nachweisbar. Die kürzere Behandlungszeit war bei den fluoreszenzmarkierten Peptiden jedoch erforderlich, weil bei länger dauernder Exposition des Fluorophors in endosomalen Kompartimenten mit deutlich geringeren pH-Werten als im Zytoplasma ein erheblicher Fluoreszenzverlust auftrat.

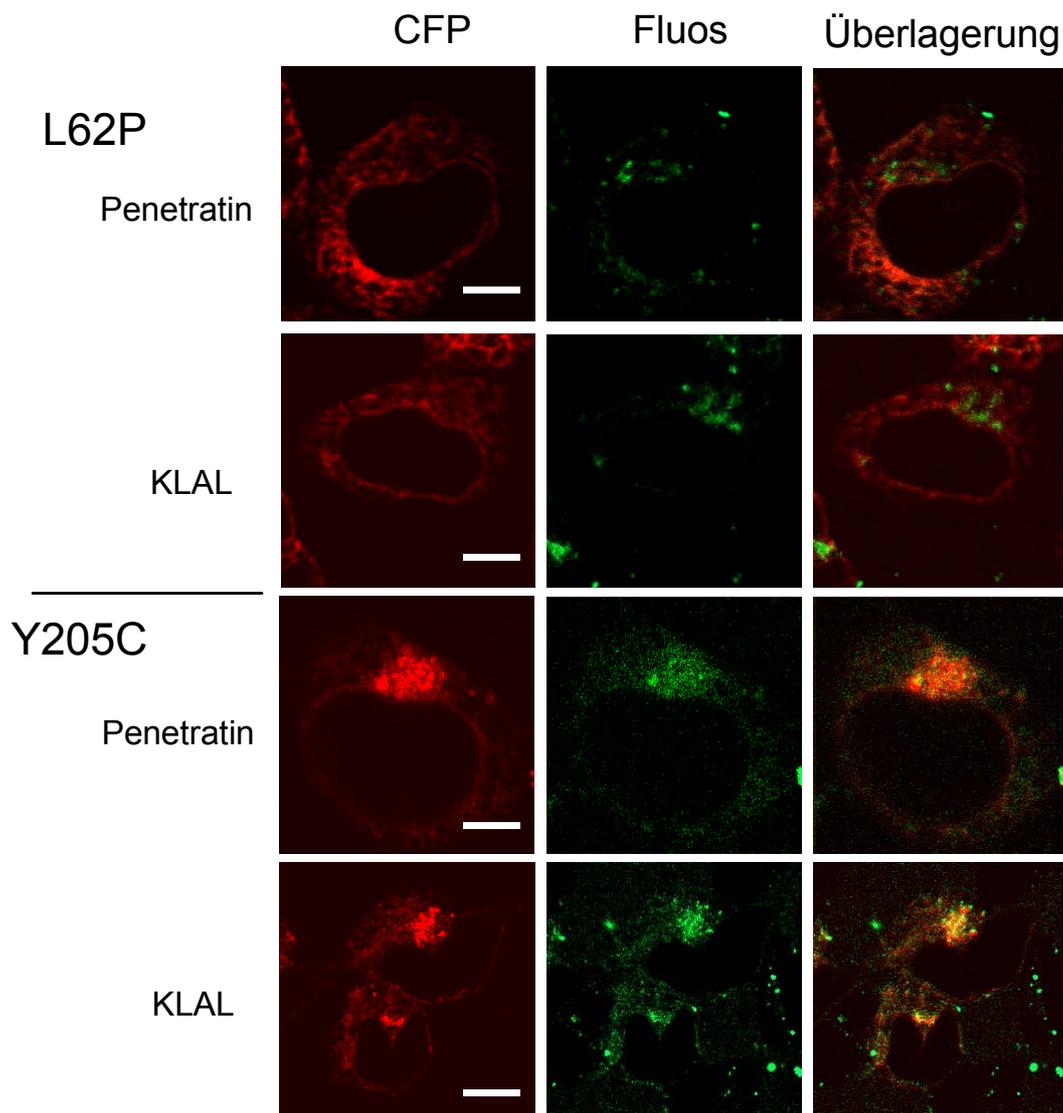


Bild 3.14: Lokalisation der CFP-Fusionsproteine der V2R-Mutanten L62P und Y205C und der fluoreszenzmarkierten Peptide Penetratin und KLAL nach Bafilomyzin A1-Behandlung mittels LSM

Mit L62P.CFP und Y205C.CFP transient transfizierte HEK 293-Zellen wurden lebend untersucht. Die Bilder geben die Fluoreszenz der Rezeptoren wieder (links, rot). Die Fluoreszenz der carboxyfluoreszinmarkierten Peptide ist daneben gezeigt (Mitte, grün). Die Überlagerung ist rechts zu sehen (gelb). Die Aufnahmen erfolgten 6 Stunden nach Peptid- bzw. 4 Stunden nach Bafilomyzin A1-Zugabe. Maßstab 10 μ M.

3.5 Ein „Rescue“ der V2R-Mutanten führt nicht zu funktionellen Rezeptoren

Die wesentliche Aufgabe des Qualitätskontrollsystems besteht darin, fehlgefaltete Proteine schon vor ihrem Zielort zu erkennen und zu degradieren. Daher ist davon auszugehen, dass der überwiegende Anteil dieser Proteine auch dann funktionslos ist, wenn ein Transport an die Plasmamembran erreicht würde. Im untersuchten Fall schien dies auch plausibel, da die Peptide Penetratin und KLAL nur mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit die Faltung der V2R-Mutante Y205C zu korrigieren in der Lage waren. Da in einigen seltenen Fällen jedoch beobachtet werden konnte, dass bei einer überprotektiven Qualitätskontrolle auch funktionelle Proteine im ER retiniert werden (Pasyk und Foskett, 1995; Tan *et al.*, 2003), hätten in diesem Fall durch einen „Rescue“ des Transports der V2R-Mutante Y205C an die Plasmamembran die Zellen zur Signalerkennung (Ligandenbindung) und -Weiterleitung (Signaltransduktion) fähig sein können.

Es wurde daher der Frage nachgegangen, ob bei der Y205C-Mutante die Wiederherstellung des Transports auch zu einem funktionellen „Rescue“ führt. Dies war bei der Hemmung von Qualitätskontrollkomponenten und fehlender Faltungskorrektur nur dann zu erwarten, wenn das Qualitätskontrollsystem hier überprotektiv ist, d.h. wenn dieses auch Proteine mit Restfunktion zurückhält. In diesem Fall wären die verwendeten Peptide theoretisch für einen klinischen Einsatz geeignet gewesen.

3.5.1 Bindungsexperiment mit radioaktiv markiertem Agonisten an intakten Zellen

Um die Funktion der Y205C-Mutante an der Zelloberfläche zu überprüfen, wurden [³H]AVP-Bindungsexperimente mit intakten HEK 293-Zellklonen unternommen. Diese Versuche wurden mit und ohne vorheriger zwölfstündiger Peptidbehandlung durchgeführt. Die eingesetzte [³H]AVP-Konzentration betrug 50nM ($25 \times K_D$ = Sättigungsbereich der Bindungskurve). Bild 3.15 zeigt, dass nur beim wildtypischen Rezeptor eine Bindung des Agonisten detektierbar war. Bei beiden V2R-Mutanten hingegen, d.h. auch bei der durch die Peptidbehandlung an der Zelloberfläche anwesenden Y205C-Mutante konnte die Bindungsfähigkeit des Liganden nicht wiederhergestellt werden. Ebenso war an untransfizierten Zellen keine Bindung zu detektieren (Negativkontrolle). Das hier nicht abgebildete entsprechende Ergebnis der Behandlung mit dem Peptid KLAL lieferte ebenfalls

keine Bindung im Falle der V2R-Mutanten. Die peptidvermittelte Wiederherstellung des Transports der Y205C-Mutante ging also nicht mit einem funktionellen „Rescue“ einher.

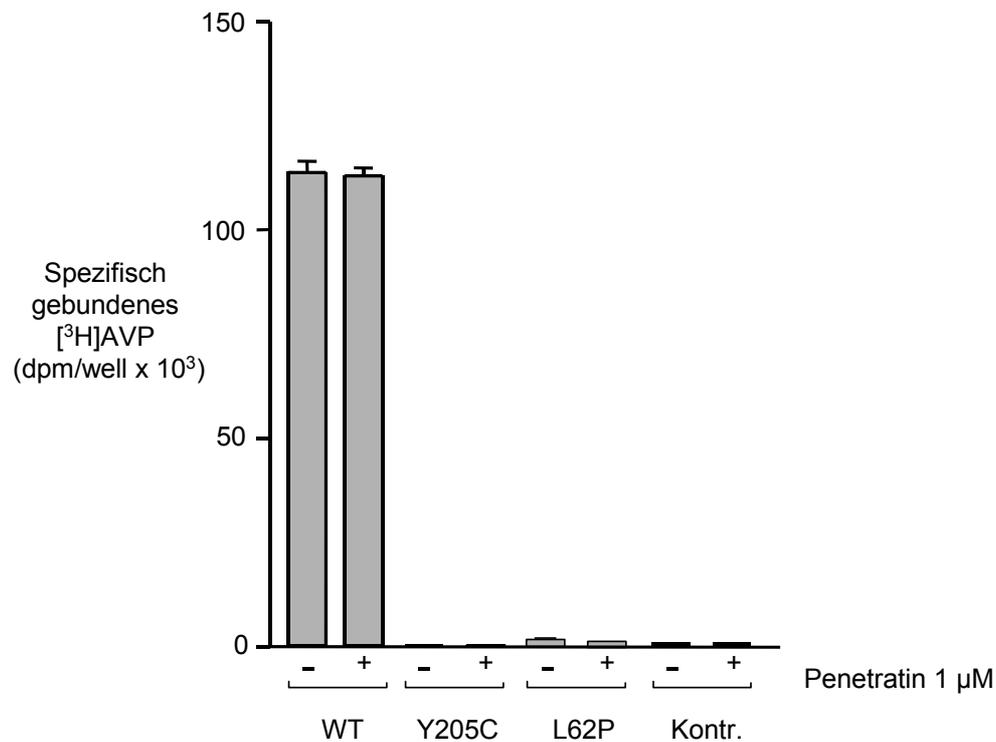


Bild 3.15: Spezifische [³H]AVP-Bindung an intakte, stabil transfizierte HEK 293-Zellklone nach 12 Stunden Penetratinbehandlung

Der Ligand wurde in einer Konzentration von 50 nM, d.h. im Sättigungsbereich zugegeben. Die Höhe der Balken gibt die arithmetischen Mittelwerte der spezifischen Bindung wieder, der Fehlerbalken die Standardabweichung. Eine Normalverteilung der Werte wurde dabei vorher bestätigt. Die Werte wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism™ der Version 3.00 ermittelt. Das Ergebnis ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

3.5.2 Konzentrationsmessung des „second messengers“ cAMP mittels Radioimmunoassay

Da jeder Rezeptor nur höchstens ein Molekül [³H]AVP binden kann, und dadurch schwache Bindungen mit einem Bindungsexperiment nicht immer nachweisbar sind, wurde noch versucht, eine Restfunktion der peptidvermittelt zur Zelloberfläche transportierten Y205C-Mutante durch eine wesentlich empfindlichere „second messenger“-Analyse (cAMP-RIA) nachzuweisen. Bei dieser Methode kann nach Stimulation der Zellen mit dem V2R-Agonisten AVP (Arginin-Vasopressin) der Abbau des in der Signalkaskade nachgeschalteten Botenstoffmoleküls cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) über längere Zeiträume gehemmt und dieses Molekül in einem Radioimmunoassay (RIA) detektiert werden. Auch in diesem Experiment konnte bei der peptidbehandelten Y205C-Mutante entsprechend Bild 3.15 keine Restfunktion nachgewiesen werden.

3.6 Peptidvermittelter „Rescue“ zusätzlicher Klasse B-Mutanten

Um zu untersuchen, ob Penetratin bzw. KLAL den Transport anderer V2R-Mutanten, die das ERGIC erreichen, beeinflussen können, wurden die Mutanten V226E, InsQ292, T204N und V206D mikroskopisch untersucht. Die Transportdefekte dieser Mutanten wurden bereits beschrieben (T204N, V206D: Postina *et al.*, 2000 bzw. V226E, InsQ292: Oksche *et al.*, in Vorbereitung). Eigene, unpublizierte Arbeiten zeigten darüber hinaus, dass T204N und V206D der Klasse B zuzuordnen sind. Um zu überprüfen, ob der Transport dieser Membranproteine durch die Peptide wiederherstellbar ist, wurden mit den entsprechenden GFP-markierten Konstrukten transient transfizierte HEK 293-Zellen mit Penetratin behandelt (1 µM, 12 Stunden), und die Lokalisation der Rezeptoren anschließend mittels Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Zur Markierung der Plasmamembran wurde dabei wiederum Trypanblau eingesetzt. Bei diesem Experiment diente die V2R-Mutante Y205C als Positivkontrolle für den „Rescue“, da mit ihr als Prototyp der Klasse B-Mutanten alle vorigen Untersuchungen durchgeführt wurden. In Bild 3.16 ist bei allen Mutanten in unbehandeltem Zustand die konstitutive intrazelluläre Retention zu erkennen. Diese Retention konnte bei den Rezeptormutanten T204N, Y205C und V206D durch die Peptidbehandlung größtenteils aufgehoben werden. Bei den Mutanten V226E und InsQ292 war dagegen kein „Rescue“ zu

beobachten. Ebenfalls wurden hiermit konsistente Ergebnisse auch für alle Mutanten unter KLAL-Behandlung erhalten.

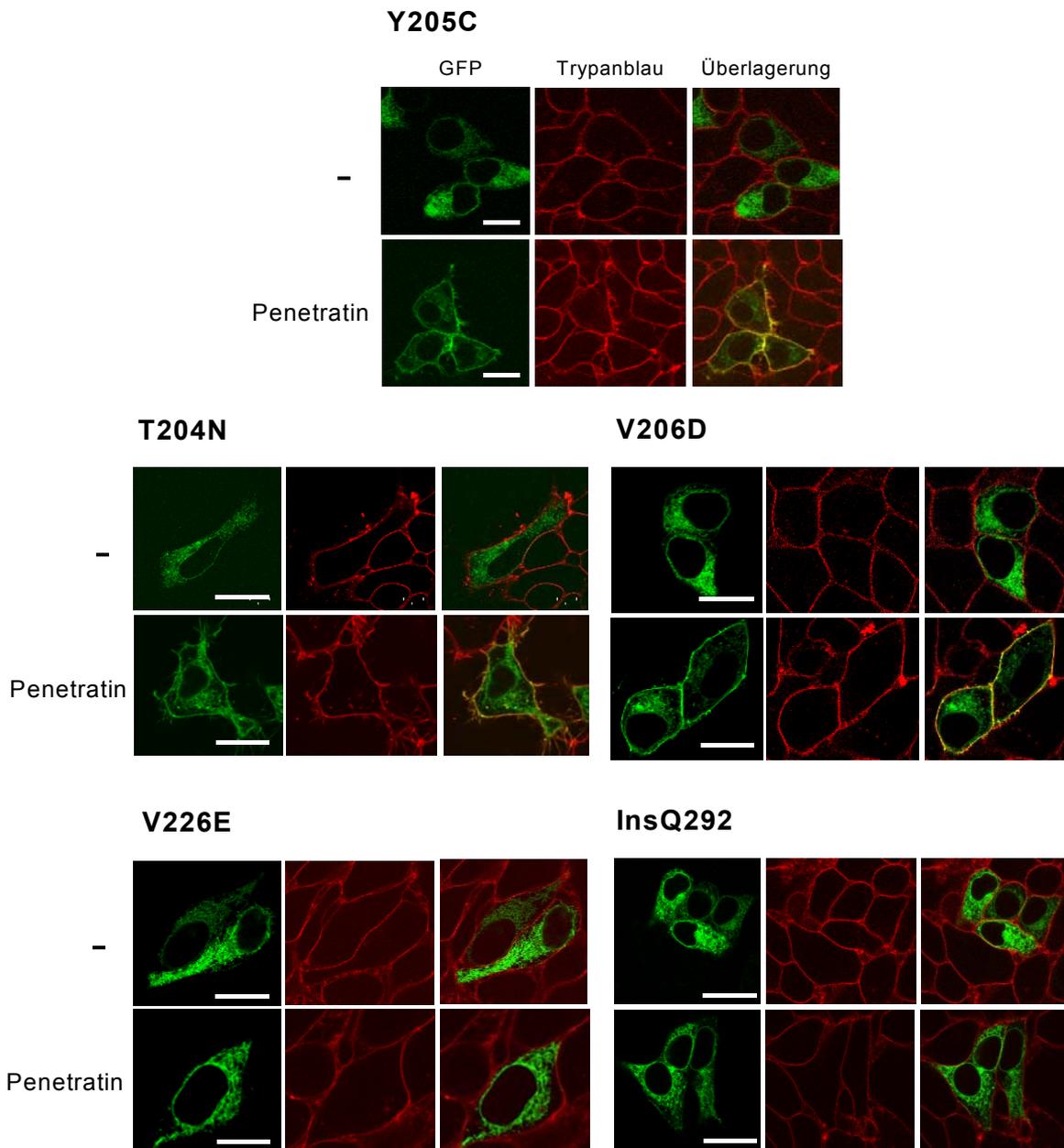


Bild 3.16: Lokalisation der V2R-Mutanten Y205C, T204N, V206D, V226E und InsQ292 nach Penetratinbehandlung mittels LSM

Die mit den GFP-Fusionsproteinen der V2R-Mutanten Y205C, T204N, V206D, V226E und InsQ292 transient transfizierten HEK 293-Zellen wurden lebend untersucht. Die GFP-Fluoreszenz zeigt die Lokalisation der Rezeptoren an (jeweils links, grün). Die Plasmamembran wurde mit Trypanblau angefärbt (jeweils Mitte, rot). Rechts ist die Überlagerung beider Signale in gelb abgebildet. Die Zellen wurden entweder mit Peptid behandelt (1 μ M, jeweils unten), oder blieben unbehandelt (-, jeweils oben). Maßstab 10 μ M.

Zusätzlich wurden auch Lokalisationen der Klasse A-V2R-Mutanten L62P, Δ L62-R64, S167L und H80R (für H80R siehe auch: Yuasa *et al.*, 1994) nach Peptidbehandlung überprüft. Die Peptidbehandlung bewirkte bei dieser Klasse in keinem Fall einen Transport an die Plasmamembran, was zusätzlich für die Post-ER-Spezifität der Peptide spricht, da diese V2R-Mutanten ausschließlich im ER retiniert werden.

Dieses Ergebnis demonstriert, dass nur der Transport eines Teils von V2R-Mutanten der Klasse B von den Peptiden wiederhergestellt werden kann. Daher erschien es interessant zu untersuchen, ob dieser Befund auf eine unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation der V2R-Mutanten innerhalb der Klasse B zurückzuführen ist. Aufnahmen von hier nicht abgebildeten Immunfluoreszenzuntersuchungen mit verschiedenen Antikörpern zeigten für diese Mutanten bislang eine ERGIC-Lokalisation (siehe z.T. Bild 3.5), wobei Signale von T204N, Y205C und V206D zum Teil aber auch mit Proteinen des Golgi-Apparats überlappten.

Da die Y205C-Mutante zum geringen Teil auch eine komplexe Glykosylierung aufwies (siehe Bild 3.11), wurden für die anderen V2R-Mutanten T204N, V206D, V226E und InsQ292 ebenfalls stabil exprimierende HEK293-Zellklone hergestellt und mittels Immunpräzipitation und anschließendem Western-Blot untersucht (Bild 3.17). Dabei ließen sich die für die Golgi-Lokalisation typischen komplexen Glykosylierungen in schwachem Maße bei V226E und InsQ292 und mäßig bei Y205C detektieren; dagegen waren sie bei T204N und V206D deutlicher nachzuweisen. Da es jedoch beim Glykosylierungsstatus der V2R-Mutanten bestimmte Zwischenformen zu geben scheint, die nicht immer klar zuzuordnen sind, ist es interessant, zukünftig zu untersuchen, ob es eine ERGIC-typische Glykosylierung gibt, die zur genaueren Charakterisierung von Klasse B-Mutanten beitragen könnte. Ausführlich wurde diesbezüglich bislang nur die Enzymausstattung des Golgi-Apparates untersucht (Young, Jr., 2004). Für den peptidvermittelten Rescue der V2R-Mutanten T204N, Y205C und V206D lässt sich somit eine post-ER-Spezifität postulieren, da bei den Mutanten ein positiver Effekt erreicht wurde, die neben dem ERGIC auch den Golgi-Apparat erreichen.

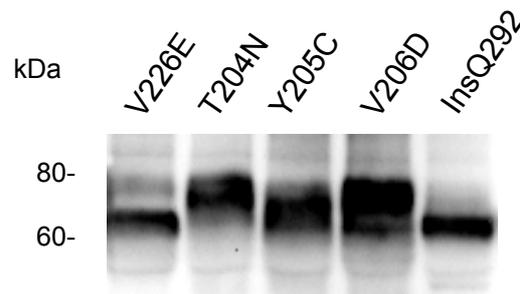


Bild 3.17: Nachweis der immunpräzipitierten V2R-Mutanten der Klasse B im Western-Blot

Die in HEK 293-Zellen stabil exprimierte GFP-Fusionsproteine der V2R-Mutanten V226E, T204N, Y205C, V206D und InsQ292 wurden mit dem polyklonalen anti-GFP-Antiserum präzipitiert, mittels SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt, und im Western-Blot mit einem monoklonalen, gegen GFP gerichteten Antikörper aus der Maus detektiert. Die Proteinbande bei 75-80 kDa stellt die komplex glykosylierten Rezeptoren; Banden bei 60-65-kDa kernglykosylierte Formen dar. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Im weiteren wurde durch Koimmunpräzipitationen untersucht, ob bei den anderen V2R-Mutanten, bei denen die Peptide einen „Rescue“ bewirkten, das molekulare Chaperon BiP ebenfalls aus seiner Bindung verdrängt wird. Dabei wurden wiederum analog Abschnitt 3.3.2 die V2-Rezeptormutanten aus den Lysaten der Zellklone mit einem polyklonalen anti-GFP-Antiserum präzipitiert. Die Detektion im Western-Blot erfolgte diesmal aber aus Spezifitätsgründen mit einem neuen Maus-monoklonalen Antikörper, bei dem nur eine immunreaktive Bande entsteht, und somit die evtl. störenden unspezifischen Banden des Präzipitationsantikörpers (siehe Bild 3.12) vermieden werden (Bild 3.18). Dabei wurde bei den V2R-Mutanten, bei denen kein „Rescue“ beobachtet werden konnte (V226E und InsQ292), keine Änderungen in der Intensität der Bande des kopräzipitierten BiP-Proteins detektiert. Eine fast vollständige Verdrängung von BiP war dagegen bei den V2R-Mutanten T204N, Y205C und V206D zu beobachten (BiP-Verdrängung durch Penetratin bei V206D nur teilweise). Somit ging die Wiederherstellung des Transports fehlgefalteter V2R-Mutanten zur Plasmamembran mit einer BiP-Verdrängung einher. Der postulierte post-ER-spezifische Effekt für die Verdrängung von BiP ist also bei allen untersuchten V2R-Mutanten konsistent, bei denen die Peptidbehandlung einen „Rescue“ bewirkte.

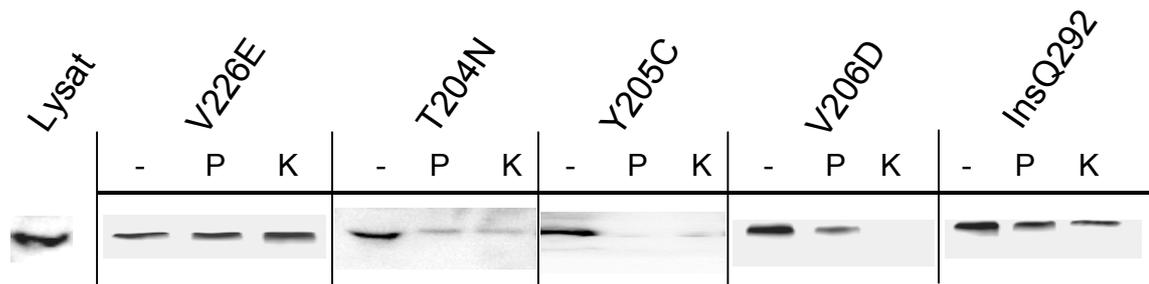


Bild 3.18: Immunologischer Nachweis von mit Rezeptoren kopräzipitiertem, endogenem BiP (GRP78)

Die in HEK 293-Zellen stabil exprimierte GFP-Fusionsproteine der V2R-Mutanten V226E, T204N, Y205C, V206D und InsQ292 wurden 12 Stunden mit Penetratin (P, 1 μ M) bzw. KLAL (K, 1 μ M) behandelt und mit polyklonalem anti-GFP-Antiserum präzipitiert. Nach elektrophoretischer Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurde im Western-Blot mit den Rezeptoren assoziiertes BiP mit einem monoklonalen, Maus-spezifischen Antikörper detektiert. Die spezifischen immunreaktiven Banden besitzen eine Masse von 78 kDa. In der linken Spur wurde zum Nachweis der Expression von BiP HEK 293-Gesamtlysate aufgetragen. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.