

Aus dem Institut für Pharmakologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Funktionelle Charakterisierung von
krankheitsauslösenden Vasopressin V2-Rezeptor Mutanten

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Berit Bohnkamp

aus Berlin

Datum der Promotion: 05.12.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	III
1 Abstrakt	1
1.1 Abstract	3
2 Einleitung	5
2.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	5
2.2 Die Vasopressin-Rezeptoren	5
2.2.1 Das Hormon Vasopressin (AVP)	6
2.2.2 AVP-vermittelte Wasserrückresorption	7
2.2.3 Die Rolle des β -Arrestin 2	9
2.2.4 Unterscheidung von Klasse-A- und Klasse-B-Rezeptoren	10
2.3 Nephrogener Diabetes Insipidus (NDI)	12
2.4 Krankheitsauslösende Mutationen im <i>AVPR2</i> Gen	13
2.4.1 Fragestellung	14
2.4.2 Die V2R Mutanten L44F, G185C und R202C	16
2.4.3 Die V2R Mutanten V277A und F287L	16
3 Material und Methoden	18
3.1 Material	18
3.1.1 Reagenzien, Chemikalien und Substanzen	18
3.1.2 Primäre Antikörper	20
3.1.3 Sekundäre Antikörper	20
3.2 Technische Geräte und Software	20
3.2.1 Technische Geräte	20
3.2.2 Software	21
3.3 Kits	21
3.4 Vektoren	21
3.5 Oligonukleotide	22
3.6 Methoden	22
3.6.1 DNA-Techniken	22
3.6.2 Zellkulturtechniken	29

3.6.3	Mikroskopie	30
3.6.4	Protein-Techniken	31
4	<u>Ergebnisse</u>	37
4.1	Die Gesamtexpression des V2R und der Mutanten L44F, G185C, R202C, V277A und F287L	37
4.2	Analyse des Glykosylierungsstatus des V2R und der Mutanten L44F, G185C und R202C	39
4.4	Internalisierungs-Assay des V2R und der Mutanten V277A und F287L	41
4.5	Analyse des V2R und der Mutanten L44F, G185C und R202C mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop	43
4.6	Subzelluläre Verteilung des V2R	44
4.7	Subzelluläre Verteilung der V2R Mutanten L44F, G185C und R202C	46
4.8	Stimulation mit peptidischen V2R Analoga	49
4.9	Subzelluläre Verteilung der V2R Mutanten V277A und F287L	52
5	<u>Diskussion</u>	58
5.1	X-chromosomaler NDI	58
5.2	Die zelluläre Lokalisation und Expression des V2R und seiner Mutanten	58
5.3	Bindungsmodell der V2R Mutanten	61
5.4	Peptidische Analoga am V2R und seinen Mutanten	63
5.5	Die Funktion von β -Arrestin als Gerüstprotein	65
5.6	NDI: Therapeutische Optionen	67
5.6.1	Anwendung von V2R-Antagonisten und -Agonisten bei intrazellulär retinierten Mutanten	68
5.6.2	Neue Anwendung von V2R-Antagonisten bei SIADH	69
5.7	Ausblick: NDI - therapeutische Visionen	70
6	<u>Literaturverzeichnis</u>	72
	<u>Eidesstattliche Versicherung</u>	78
	<u>Curriculum Vitae</u>	80
	<u>Publikationsliste</u>	82
	<u>Danksagung</u>	83

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AC	Adenylylcyclase
ADH	Anti-diuretisches Hormon = AVP
AK	Antikörper
AVP	8-Arginin-Vasopressin = ADH
AQP	Aquaporin
ATP	Adenosintriphosphat
AT1aR	Angiotensin II type 1a receptor
β -Arr2	β -Arrestin 2
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNS
CLSM	konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
DDAVP	1-Desamino-8-D-Arginin-Vasopressin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	ER/GOLGI-intermediate compartement
ERK	Extracellular-signal-regulated kinase
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HEK	human embryonic kidney cells
hV2R	humaner Vasopressin V2-Rezeptor (= Wildtyp)
IGFR	Insulin-like growth factor receptor
kB	kilobyte
kDa	Kilodalton
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
MAPK	Mitogen-activated protein kinase

Abkürzungen

min	Minute
μM	Mikromol
mV2R	muriner V2R
NDI	Nephrogener Diabetes insipidus
nM	Nanomol
PCR	Polymerase Chain Reaction
PKA	Protein-kinase A
pM	Pikomol
QCS	Qualitätskontrollsystem
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SIADH	Syndrom der inadäquaten ADH-Sekretion
V1aR	Vasopressin 1a-Rezeptor
V1bR	Vasopressin 1b-Rezeptor
V2R	Vasopressin V2-Rezeptor
X-NDI	X-chromosomaler nephrogener Diabetes insipidus
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Abstrakt

Der X-chromosomal vererbte nephrogene Diabetes insipidus (X-NDI) ist eine seltene Erkrankung und führt zu Symptomen bezüglich Elektrolythaushalt und Diurese sowie urologische Komplikationen.

Die Mehrzahl der mutierten V2R weisen einzelne Aminosäureaustausche auf, die zu Fehlfaltung, Retention und schließlich zum Abbau führen. Einige V2R Mutanten werden jedoch wie der Wildtyp an der Plasmamembran exprimiert. Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung plasmamembranständiger, X-NDI-auslösender V2R Mutanten bezüglich Reifungsprozess, Stimulierbarkeit mit Arginin-Vasopressin (AVP) und synthetischer peptidischer Analoga; sowie die Charakterisierung des Internalisierungsverhaltens und der β -Arrestin-Rekrutierung.

Durch Expression der Rezeptoren in humane embryonale Nierenzellen (HEK) und Analyse des Glykosylierungsstatus konnte eine Rezeptorprozessierung und -reifung im sekretorischen Transportweg mit Insertion in die Plasmamembran für die fünf Mutanten L44F, G185C, R202C, V277A, F287L nachgewiesen werden. In Analysen der quantitativen Membranexpression des Wildtyps und der Mutanten V277A und F287L ergab sich eine vergleichbare Oberflächenexpression; bezüglich der weiteren Mutanten L44F, G185C und R202C war sie vermindert. Mittels Oberflächenbiotinylierung konnte eine deutlich ausgeprägte AVP-vermittelte Internalisierung des V2R sowie der Mutanten V277A und F287L gezeigt werden und das fluoreszenzmikroskopisch beobachtete AVP-induzierte Internalisierungsverhalten bestätigen. Die Mutanten L44F, G185C und R202C zeigten fluoreszenzmikroskopisch allenfalls eine schwache Internalisierung. Auch mittels verschiedener synthetischer AVP-Analoga konnte keine Internalisierung ausgelöst werden.

Bezüglich der F287L-Mutante konnte ein verändertes Internalisierungsverhalten gezeigt werden: Nach Einsatz von hohen AVP-Konzentrationen ergab sich eine deutliche Rezeptorinternalisierung. Es zeigte sich jedoch, dass β -Arrestin 2 zwar an die Plasmamembran rekrutiert wurde, aber nicht gemeinsam mit dem F287L Rezeptor internalisierte sondern an der Plasmamembran verblieb. Damit stellt die V2R Mutante

Abstrakt

F287L einen neuen Phänotyp dar, welcher offenbar AVP-induziert β -Arrestin 2 rekrutieren kann, aber β -Arrestin 2 unabhängig internalisiert.

Die veränderte Interaktion der Mutante F287L mit β -Arrestin 2 weist Analogien zu dem Konzept von *biased ligands* auf: *Biased ligands* sind dadurch charakterisiert, dass die Liganden bevorzugt β -Arrestin 2 oder G-Proteine rekrutieren bzw. aktivieren. Die F287L Mutante könnte ein Prototyp des „Biased Receptors“ sein, der β -Arrestin 2 rekrutiert, aber nur schwach das G-Protein G_s und in der Folge die Adenylylcyclase aktiviert.

1.1 Abstract

The X-chromosomal nephrogenic diabetes insipidus (X-NDI) is a rare disease leading to symptoms concerning the electrolyte metabolism, diureses and urological complications.

Most mutations lead to the misfolding of the V2R, turning it transport-defect and therefore intracellularly retained. The aim of this thesis was to characterize the disease-causing mutants L44F, G185C, R202C, V277A and F287L that are transport competent and therefore expressed at the plasma membrane.

The hypothesis of this thesis was whether these mutant receptors could be stimulated by AVP or other synthetic analogues. Stimulation was observed through their internalization pattern and their ability to recruit β -Arrestin 2.

Whole membrane isolates of cells expressing the V2R and the three mutant receptors L44F, G185C and R202C were digested with PNGaseF and EndoH. As expected, all the receptors were processed in the cellular secretory pathway leading to their insertion to the plasma membrane. A whole cell surface biotinylation assay of the V2R and mutants V277A and F287L demonstrated a profound internalization upon AVP stimulation. This result was consistent with the internalization after AVP stimulation observed within life cell imaging experiments with laser scanning microscopy. As expected, the other mutants L44F, G185C and R202C showed in similar experiments only a weak internalization after AVP treatment, as these mutants have been already described as AVP binding-deficient. In further life imaging experiments these mutants were stimulated with synthetic AVP-analogues. Neither of the used synthetic analogues were able to stimulate the mutant receptors L44F, G185C or R202C, but all of them stimulated as expected the V2R.

With regards to the F287L mutant a different internalization pattern was observed in life cell imaging studies: Only after treatment with high concentrations of AVP, the mutant receptor showed internalization. β -Arrestin 2 was also recruited to the plasma membrane, but showed less co-localization with the receptor inside the cell and it remained longer at the plasma membrane.

These experiments prove that there is further need for research in terms of receptor conformation that results in effector protein activation. It could be that certain receptor

Abstrakt

mutations lead to a different folding state, which results in different effector protein activation and consequent intracellular signaling.

2 Einleitung

2.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Der Vasopressin-V2-Rezeptor (V2R) gehört zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Allen GPCR gemeinsam ist der Aufbau aus sieben Transmembranhelices, welche durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen verbunden sind. Sie werden an der Plasmamembran exprimiert und besitzen ein breites Spektrum an Liganden, z.B. neben Peptiden auch Lipide oder organische Geruchs- und Geschmacksstoffe. Durch Bindung des jeweiligen Liganden wird eine Konformationsänderung ausgelöst, welche für die Aktivierung von verschiedenen zellulären Signalkaskaden verantwortlich ist (Pin et al. 2007).

2.2 Die Vasopressin-Rezeptoren

Die Gruppe der Vasopressin-Rezeptoren besteht aus drei unterschiedlichen Subtypen: V_{1A}-Rezeptor (V_{1A}R), V_{1B}-Rezeptor (V_{1B}R, Synonym: V₃-Rezeptoren) und V₂-Rezeptor (V2R; hier auch hV2R = humaner V2R). V_{1A}R und V_{1B}R aktivieren über G-Proteine der Gq/11 Familie die Phospholipase C (PLC) mit konsekutiver Bildung der second messenger Inositol-1,4,5,-trisphosphat (IP3) und 1,2-Diacylglycerin (DAG), welche sowohl zur einer Erhöhung des intrazellulären Calciums wie auch zur Aktivierung des ERK-pathways führen.

Der V_{1A}R befindet sich vor allem auf glatter Muskulatur der Gefäße und des Magen-Darm-Trakts, wo er Vasokonstriktion und Plättchenaggregation vermittelt. Weitere Lokalisationen sind die Leber sowie das zentrale Nervensystem (ZNS). Stimulation des V_{1A}R führt zu Zellproliferation und zellulärer Hypertrophie.

Der V_{1B}R wird hauptsächlich im Hypophysenvorderlappen, Nebennierenmark und in der Niere exprimiert. In der Hypophyse reguliert und potenziert er die Sekretion von Adrenocorticotropin (ACTH) und man findet den V_{1B}R überexprimiert in ACTH-produzierenden Tumoren (Oksche et al. 1998, Thibonnier et al. 2001).

Der V2R ist in der basolateralen und teilweise auch in der apikalen Plasmamembran der Hauptzellen in der Niere lokalisiert, sowohl im Sammelrohr als auch im dicken aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife. Die Bindung des physiologischen Hormons

AVP führt zum Einbau von Wasserkanälen, sogenannten Aquaporinen des Typ 2 (AQP2) in die apikale Plasmamembran, und ermöglicht eine Wasserrückresorption vom tubulären Lumen in die Hauptzellen. Über AQP3 und 4 erfolgt der Transport ins Interstitium (Oksche et al. 1998, Los et al. 2010). Es gibt außerdem Hinweise, dass der V2R sowohl auf humanen Endothelzellen wie auch in humanem Lungengewebe exprimiert wird (Kaufmann et al. 2000). Des Weiteren wurde gezeigt, dass der V2R im gesamten Magen-Darm-Trakt exprimiert wird (Monstein et al. 2008) sowie im Innenohr (Maekawa et al. 2010).

2.2.1 Das Hormon Vasopressin (AVP)

Vasopressin (Synonym: 8-Arginin-Vasopressin = AVP) ist ein cyclisches Nonapeptid, welches in den magnozellulären Neuronen des supraoptischen und paraventriculären Kerngebiets des Hypothalamus gebildet wird. Durch axonalen Transport gelangt es in den Hypophysenhinterlappen (Neurohypophyse), welcher als Speicher dient. Die Freisetzung von AVP wird stimuliert durch Hypovolämie (Barorezeptoren, z.B. Sinus caroticus), Hypotension oder Plasma-Hyperosmolalität (Osmorezeptoren im Hypothalamus). Seine Hauptwirkung erzielt AVP am V2R in der Niere wo es Antidiurese vermittelt, ist jedoch auch an den Gefäßen (Vasokonstriktion) und dem zentralen Nervensystem (ZNS) wirksam (Oksche et al. 1998). Unter normalen Bedingungen liegt die Plasmakonzentration von AVP um 2 pg/ml. Die Halbwertszeit von AVP liegt bei 10-35 Minuten und der Abbau erfolgt über Vasopressinasen sowohl in der Leber als auch in der Niere (Barret et al. 2007). Außerdem ist bekannt, dass sowohl AVP wie auch das synthetische Analogon DDAVP (1-deamino-8-D-Arginin Vasopressin) durch Stimulation des V2R die Plasmakonzentration des von-Willebrand-Faktors erhöhen, welcher von den Endothelzellen gebildet wird und eine Schlüsselrolle in der primären Hämostase spielt. Diesen Effekt nutzt man therapeutisch: DDAVP ist ein häufig eingesetztes Medikament bei dem von-Willebrand-Jürgens-Syndrom, der häufigsten vererbten Blutungskrankheit überhaupt, wobei die Ausprägung der Symptome unterschiedlich ist (Kaufmann et al. 2000).

Des Weiteren wurde gezeigt, dass AVP in Ratten den Einbau von Na-K-2CL-Cotransportern im dicken aufsteigenden Ast der Henle Schleife fördert. Dieser Effekt führt zu einer deutlichen Erhöhung der NaCl-Aufnahmekapazität, was wiederum die Fähigkeit zur Konzentration des Urins verbessert (Kim et al. 1999).

Bei Aktivierung des V2R durch Vasopressin kommt es neben den oben genannten Effekten auch zu einer Zunahme der Permeabilität für Harnstoff (Urea). Hierbei werden im Sammelrohr im inneren Mark Urea-Transporter eingebaut und erhöhen dessen Permeabilität bis zu 400% (Sands et al. 2003). Diese Effekte führen zu einer Erhöhung der osmotisch aktiven Moleküle (NaCl und Urea) im Nierenmark und unterstützen zusätzlich die hormonregulierte Wasserrückresorption in der Niere.

2.2.2 AVP-vermittelte Wasserrückresorption

Die Reabsorption von Wasser in der Niere erfolgt durch verschiedene membranständige Wasserkanäle, den sogenannten Aquaporinen (AQP). Man unterscheidet eine konstitutive Wasserrückresorption, welche vor allem im proximalen Tubulus mit Hilfe von AQP1 stattfindet, von einer kurzfristig hormonell regulierbaren Reabsorption von zum Teil großen Mengen von Wasser im Sammelrohr, die vor allem durch AQP2, AQP3 und AQP4 vermittelt wird (Marples et al. 1999).

Bei Bindung von AVP an den V2R in der basolateralen Membran der Hauptzellen im Sammelrohr kommt es zu einer Stimulierung des G-Proteins G_s , welches die Adenylyl cyclase (AC) aktiviert (**Abb. 1**). Diese generiert eine Zunahme des intrazellulären cAMP-levels, was zu einer Aktivierung der Protein-Kinase-A (PKA) führt. Die PKA phosphoryliert Effektorproteine, unter ihnen AQP2 tragenden-Vesikel, was zu einer Translokation und Insertion von AQP2 in die apikale Zellmembran führt. Weiterhin ist bekannt, dass durch Phosphorylierung der kleinen GTPase RhoA durch die PKA das Zytoskelett partiell depolymerisiert wird und somit der Transport von AQP2 ermöglicht wird (Valenti et al. 2005). Durch den Einbau von AQP2 in die apikale Zellmembran kommt es zum effektiven Transfer von Wasser durch die Membran in die Zelle hinein. Basolateral lokalisierte AQP3 und AQP4 ermöglichen einen Austritt des Wassers aus der Zelle hinaus ins Interstitium. Bei Abfall des Vasopressinspiegels werden die apikal lokalisierten AQP2 endozytotisch zurückgeholt (Marples et al. 1999).

Einleitung

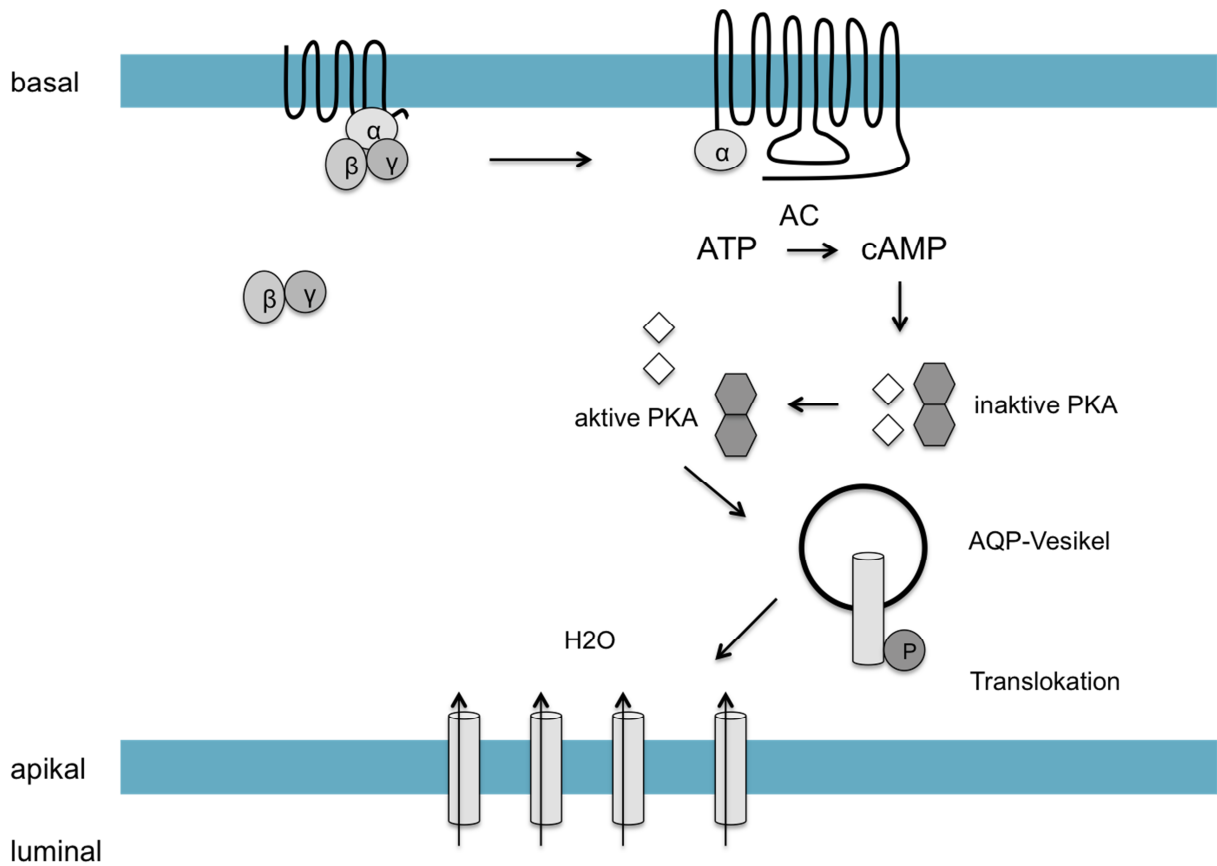


Abbildung 1: Schematische Darstellung der AVP-vermittelten Wasserrückresorption im Sammelrohr der Niere: Nach Bindung von AVP an dem basolateral lokalisierten V2R kommt es zur Stimulierung von G_s und Aktivierung der AC, welche die Umwandlung von ATP zu cAMP generiert. Die durch cAMP aktivierte PKA phosphoryliert AQP2-Vesikel, welche in die apikale Zellemembran eingebaut werden, um Wasser aus dem Lumen in die Zelle zurück zu transportieren.

Abkürzungen: V2R: Vasopressin V2-Rezeptor; AVP: Arginin-Vasopressin; AC: Adenylylcyclase; ATP: Adenosintriphosphat; cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat; AQP 2: Aquaporin Typ 2

2.2.3 Die Rolle des β -Arrestin 2

Die Stimulation des V2R mit AVP führt zu einer Translokation von AQP2 in die apikale Zellmembran und zum Wasserrücktransport ins Interstitium. Nach Bindung von AVP an den V2R kommt es durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen 2 und 3 (GRK) zur Phosphorylierung dreier Serinreste (Position 362-365; Innamorati et al. 1996) und einem Threoninrest am zytoplasmatischen C-Terminus des Rezeptors. Der phosphorylierte Rezeptor rekrutiert anschließend β -Arrestin 2 (**Abb. 2**). Sowohl die Rezeptorphosphorylierung wie auch die anschließende β -Arrestin-Bindung führen zu einer Unterbrechung der G-Protein Bindung und beenden die G-Protein-vermittelte Signalgebung. Des Weiteren werden dadurch sowohl die Rezeptor-Desensibilisierung als auch Internalisierung des V2R initiiert. Die Internalisierung des Rezeptors wiederum spielt eine wichtige Rolle in Hinblick auf Rezeptor-Resensibilisierung, -Recycling, -Herunterregulierung und Signalgebung (Shenoy et al. 2003). Eine gestörte V2R-Phosphorylierung zum Beispiel durch Mutation der Phosphorylierungs-Stelle führt zu verminderter β -Arrestin-Bindung und Rezeptorinternalisierung (Shenoy et al. 2003).

Es werden zwei unterschiedliche Isoformen von β -Arrestin unterschieden, welche jedoch zu 78% identisch sind: β -Arrestin 1 und β -Arrestin 2. β -Arrestin 2 ist zytoplasmatisch lokalisiert, wobei β -Arrestin 1 sowohl zytoplasmatisch wie auch nukleär exprimiert wird (DeWire et al. 2007). β -Arrestine gelten mittlerweile neben ihrer bereits oben genannten Bedeutung bezüglich Terminierung der Signalgebung und Rezeptorrecycling als multifunktionelle Adapter- und Gerüstproteine und spielen eine wachsende Rolle im Bereich der Signaltransduktion als Initiatoren für verschiedene Signalwege. In ihrer Form als Gerüstproteine vereinen sie Komponenten unterschiedlicher Signalwege und leisten einen entscheidenden Beitrag zum geordneten und spezifischen Ablauf der Signalkaskaden.

Es ist bekannt, dass β -Arrestin 2 als Adapter-Protein für Clathrin und Adapter-Protein 2 (AP2) dient, welches für die Endozytose des V2R in Clathrin-Vesikeln benötigt wird (Luttrell et al. 2002). Ferner wird der sowohl der V2R β -Arrestin-abhängig, wie auch das β -Arrestin 2 selber ubiquitinyliert. Polyubiquitinylierung galt ursprünglich als ein Signal für den proteasomalen Abbau; mittlerweile weiß man, dass es ebenfalls Signaltransduktion und Protein-Transport vermittelt (DeWire et al. 2007). Shenoy et al. konnten zeigen, dass eine

AVP-abhängige Ubiquitylierung des V2R zur einem schnelleren Abbau des Rezeptors führen kann. Des Weiteren gilt β -Arrestin als Gerüstprotein für die mitogen-activated protein kinases (MAPK), welche ihrerseits zelluläre Funktionen wie Transkription oder Apoptose regulieren. Die Aktivierung der MAPK kann sowohl nach Agonisten-Stimulation durch Kopplung an das heterotrimere G-Protein wie auch unabhängig davon β -Arrestin-vermittelt geschehen (Charest et al. 2006, DeWire et al. 2007). Dabei scheint die frühe (< 5 min) ERK1/2 Aktivierung vor allem durch G_s vermittelt zu sein, während die späte Aktivierung (> 10 min) β -Arrestin 2-abhängig ist (Ren et al. 2005).

Bezüglich der MAPK-Aktivierung beschreiben Oligny-Longpre et al. eine G-Protein-unabhängige-Aktivierung über Rezeptor-Tyrosinkinasen: Dabei konnte nachgewiesen werden, dass nach AVP-Stimulation des V2R der Insulin-like growth factor receptor (IGFR) über einen Liganden transaktiviert wird, welcher durch Metalloproteinasen freigesetzt wird. Dies führte zu einer Rekrutierung von β -Arrestin durch den IGFR mit anschließender ERK1/2-Aktivierung (Oligny-Longpre et al. 2012).

2.2.4 Unterscheidung von Klasse-A- und Klasse-B-Rezeptoren

Die Unterscheidung einiger GPCRs in Klasse A- und Klasse B-Rezeptoren ergibt sich aus der Dauer der Bindung zwischen Rezeptor und β -Arrestin 2 nach Stimulation. Ein Beispiel für einen Klasse-A-Rezeptor ist der β_2 -Adrenerge Rezeptor (β_2 AR), hier ist die Bindung zwischen Rezeptor und β -Arrestin relativ flüchtig und der Rezeptor-Arrestin-Komplex dissoziiert, sobald der Rezeptor internalisiert. Der V2R (wie auch der Angiotensin II Typ 1a Rezeptor (AT1aR)) ist ein Klasse-B-Rezeptor. Hier ist die Bindung zwischen Rezeptor und β -Arrestin 2 stärker und überdauert die Internalisierung des V2R in die Zelle, wo der Komplex über längere Zeit bestehen bleibt, um anschließend wieder zur Plasmamembran zu recyceln oder lysosomal abgebaut zu werden (Luttrell et al. 2002, Lefkowitz et al. 2005; **Abb. 2**).

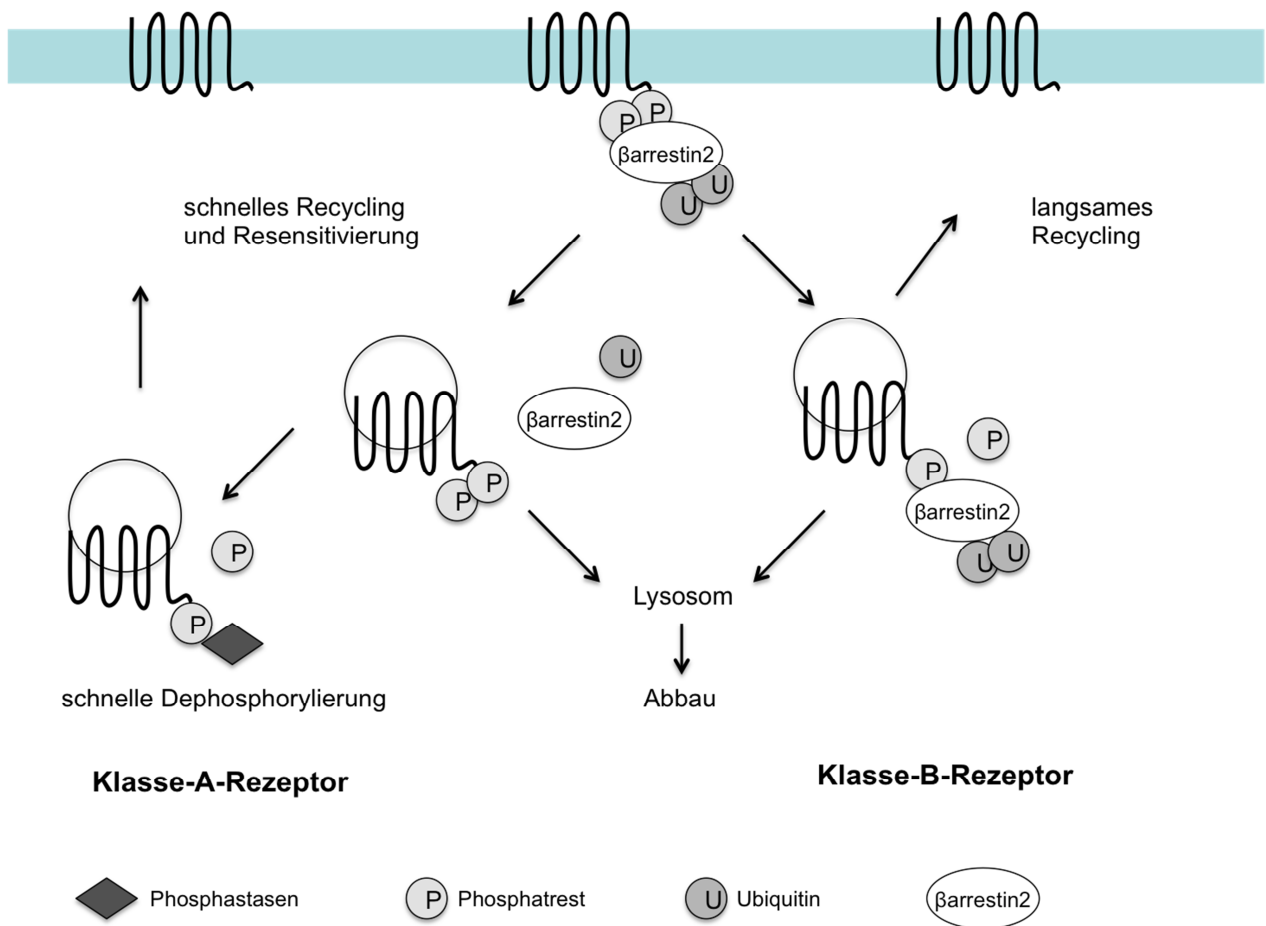


Abbildung 2: Unterscheidung von Klasse-A und Klasse-B-Rezeptoren: Nach Stimulation des V2R mit AVP kommt es durch GRK (G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen) 2 und 3 zu Phosphorylierung des V2R und anschließend zur Bindung von β -Arrestin 2. Sowohl Klasse-A-Rezeptoren wie auch Klasse-B-Rezeptoren internalisieren Clathrin-abhängig. Charakteristisch für Klasse-A-Rezeptoren ist die flüchtige Bindung von β -Arrestin 2 mit schneller Dissoziation des Rezeptor-Arrestin-Komplexes, was zu einer schnellen Resensitivierung und Recycling an die Plasmamembran führt. Klasse-B-Rezeptoren und β -Arrestin 2 bilden einen festen Komplex, welcher noch nach Internalisierung bestehen bleibt. Dies führt zu einer langsamen Dephosphorylierung und verhindert ein schnelles Recycling an die Plasmamembran.

2.3 Nephrogener Diabetes Insipidus (NDI)

Diabetes insipidus beschreibt grundsätzlich einen Zustand charakterisiert durch Ausscheidung abnormal grosser Mengen ($> 30 \text{ ml/kg KG/d}$) verdünnten Urins ($< 250 \text{ mmol/kg}$). Die Ursache dieser Störung ist in vielen Fällen als erworben anzusehen, da als unerwünschte Arzneimittelwirkung von Medikamenten zu beobachten. Ein oft genanntes Beispiel ist Lithium, welches ein häufig verwendetes Arzneimittel im Rahmen einer bipolaren Störung ist (Oksche et al 1997). Ein weiteres Beispiel wäre Cisplatin als bekanntes Chemotherapeutikum im Rahmen einer malignen Erkrankung (Balanescu et al. 2010). In den meisten Fällen kommt es nach Absetzen der krankheitsauslösenden Medikamente zu einem Rückgang der Symptomatik (Oksche et al. 1997).

Weitere Auslöser für einen Diabetes insipidus sind Hypokaliämie, was die Konzentrationsfähigkeit der Nieren herabsetzt, sowie chronische Niereninsuffizienz (Oksche et al. 1997) oder auch eine Schwangerschafts-bedingt erhöhter Abbau von AVP (Fujiwara et al. 2005). Eine Klassifizierung gelingt einerseits durch eine Unterscheidung zwischen zentralem Diabetes insipidus und nephrogenem Diabetes insipidus (NDI); wobei beide Formen auch genetisch bedingt sein können.

Der erworbene, zentrale Diabetes insipidus tritt zum Beispiel im Rahmen einer Hypophyseninsuffizienz auf: Bei Schädelhirntraumata kommt es selten zu einem Hypophysenabriss; auch Tumore der Hypophyse können zu einer unzureichenden Produktion von AVP führen und zentralen Diabetes insipidus auslösen.

Der seltene, sowohl autosomal dominant oder autosomal rezessiv vererbte zentrale Diabetes insipidus wird charakterisiert durch eine Mutation in dem Gen, welches für AVP (*AVP*) kodiert. Dadurch wird die Bindungseigenschaft von AVP an den V2R herabgesetzt. Die Niere selbst ist jedoch nicht pathologisch verändert, sodass durch eine Substitutionstherapie mit Desmopressin (DDAVP) nasal appliziert eine verhältnismäßig nebenwirkungsarme und einfache Behandlung der Symptomatik gelingt (Oksche et al. 1997). Zur Diagnosestellung eines zentralen Diabetes insipidus wird ein sogenannter Durstversuch unternommen mit Bestimmung der Serum- und Urinosmolalität sowie Natriumkonzentration im Serum (Balanescu et al. 2010).

Der genetisch bedingte NDI ist selten und man unterscheidet 2 Formen: In circa 90% der Fälle wird er X-chromosomal vererbt. Ursächlich beim X-chromosomalen NDI (X-NDI) sind

Mutationen im humanen *AVPR2* Gen. Neben Polyurie und Polydipsie kommt es zu schweren urologischen Komplikationen und rezidivierenden, teils lebensbedrohlichen Episoden von Dehydratation vor allem bei Kindern, welche zu mentaler Retardierung und Wachstumsverzögerung führen können. Die Prävalenz beträgt ca. 8,8 auf 1.000.000 Jungen, wobei der Beginn der Symptomatik ebenfalls stark variieren kann. Die therapeutischen Optionen sind begrenzt und vor allem symptomorientiert; neben einer obligat gesteigerten Wasseraufnahme kommt sowohl das nichtsteroidale Antirheumatikum (NSAR) Indometacin wie auch Thiazid-Diuretika zum Einsatz: Indometacin reduziert die Durchblutung des Nierenparenchyms, woraufhin eine Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR) zur verminderten Wasserexkretion führt. Die Einnahme von Thiazid-Diuretika, ggf. in Kombination mit dem Kalium-sparenden Diuretikum Amilorid, führt zu verminderter Wasserexkretion (Oksche et al 1997).

Der seltene, autosomal rezessiv vererbte NDI bezeichnet eine Mutation im Gen welches für AQP2 codiert. Dadurch kommt es zu einer gestörten oder fehlenden Expression von AQP2 und die Wasserrückresorption wird empfindlich gestört (Oksche et al. 1998).

2.4 Krankheitsauslösende Mutationen im *AVPR2* Gen

In der Literatur sind über 200 verschiedene Mutationen beschrieben, die X-NDI auslösen können. Die Mutationen liegen sowohl im Bereich der extra- und intrazellulären Schleifen wie auch in den transmembranären Regionen des V2R und sind in einem Großteil der Fälle Punktmutationen (Los et al 2007; **Abb. 3**).

Durch Austausch eines Nukleotids kann es zu nonsense- oder missense-Mutationen kommen: Eine nonsense-Mutation führt zum Einbau eines Stopp-Codons und ergibt üblicherweise ein trunkiertes, nicht funktionelles Proteinprodukt. Eine missense-Mutation beschreibt einen Aminosäureaustausch, welcher zu einer Fehlfaltung des Rezeptors führt. Das kann sowohl zu einer intrazellulären Retention des Rezeptors im ER (endoplasmatisches Retikulum), ERGIC (ER/Golgi-intermediate compartment) oder Golgi-Apparat führen oder auch zur Insertion und Expression an der Plasmamembran. An der Plasmamembran kann der fehlerhaft Rezeptor phänotypisch unbemerkt bleiben oder zu Krankheitssymptomen führen (Oksche et al. 1998).

Der Großteil der NDI-auslösenden V2R Mutanten wird intrazellulär retiniert und erreicht die Plasmamembran nicht. Die aufgrund der Mutation fehlgefalteten Rezeptoren werden innerhalb des Qualitätskontrollsystems (QCS) der Zelle in unterschiedlichen Kompartimenten retiniert (ER, ERGIC oder Golgi-Apparat) und dort entweder abgebaut oder sie akkumulieren. In Bezug auf einige retinierte V2R Mutanten konnte gezeigt werden, dass durch das QCS der Zelle der Abbauweg vorgegeben wird. Vermutlich entscheidet der Faltungszustand der mutierten Rezeptoren über den Ort der Retention. Unreife Rezeptoren, die das ERGIC erreichen, werden polyubiquitinyliert und über den ER-associated degradation pathway (ERAD) abgebaut. Mutanten, die bereits den Golgi-Apparat erreicht haben, werden lysosomal abgebaut (Hermosilla et al. 2004, Schwieger et al. 2007). Nur wenige Mutanten können aus bisher unbekannter Ursache das Qualitätskontrollsystem der Zelle passieren und gelangen an die Plasmamembran, wo sie für den natürlichen Liganden AVP potentiell erreichbar sind.

2.4.1 Fragestellung

Von den über 200 verschiedenen X-NDI verursachenden Mutationen des V2R Gens kodiert die Mehrzahl für Einzelaminosäure-Austausche. Funktionelle Analysen einer Vielzahl der V2R Mutanten zeigten, dass diese Einzelaminosäure-Austausche v.a. die Faltung des V2R beeinträchtigen. Nur wenige V2R Mutanten können das Qualitätskontrollsystem der Zelle passieren und gelangen an die Plasmamembran bzw. in die unmittelbare Nähe, was durch mikroskopische Verfahren nicht differenziert werden kann. Bei diesen V2R Mutanten ist der zur Erkrankung führende Defekt somit unbekannt und könnte sowohl die korrekte Insertion in die Plasmamembran, die Ligandenbindung, die Rezeptoraktivierung als auch die intrazelluläre Signalkaskade betreffen.

In dieser Arbeit habe ich mich mit der funktionellen Charakterisierung von X-NDI auslösenden V2R Mutanten befasst, die nicht im ER retiniert werden. Ziel der Arbeit war es, den Reifezustand (Glykosylierungsmuster) sowie die Oberflächenexpression der V2R Mutanten im Vergleich mit dem Wildtyp zu untersuchen. Ausserdem wurde fluoreszenzmikroskopisch die Agonisten-induzierte Internalisierung und die β -Arrestin 2-Rekrutierung der Mutanten visualisiert und Unterschiede dargestellt.

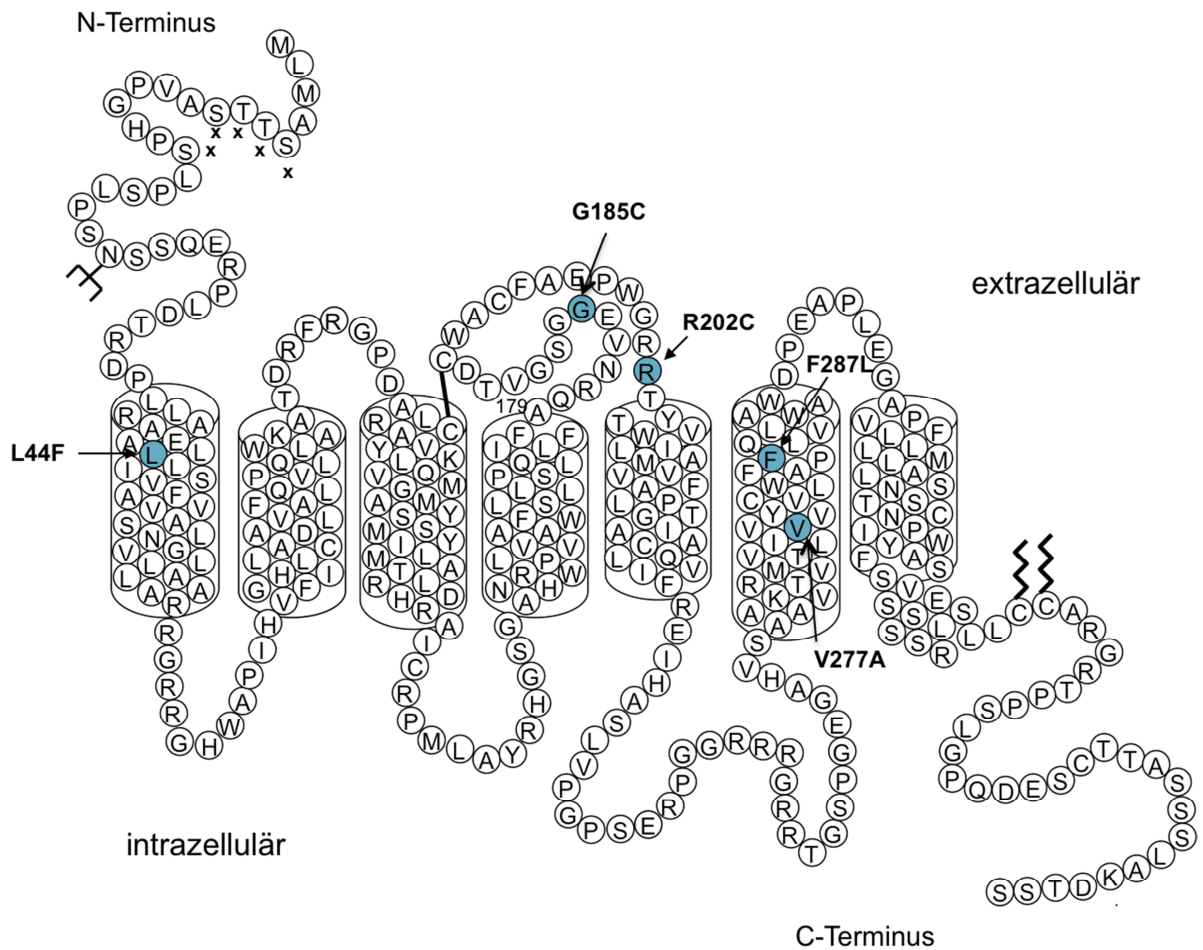


Abbildung 3: X-NDI-auslösende Mutanten des V2R. Dargestellt ist die Aminosäuresequenz des V2R (Einzelcode) und einige der posttranslationalen Modifikationen des Rezeptors. Die V2R Mutanten L44F (in der ersten Transmembrandomäne), G185C und R202C (in der zweiten extrazellulären Schleife) und F287L und V277A (in der sechsten Transmembrandomäne) sind farblich unterlegt. Außerdem markiert ist die Disulfidbrücke zwischen den zwei Cystein-Resten 112 und 192 in der ersten und zweiten extrazellulären Schleife. Dargestellt sind des Weiteren ein N-gebundener Zuckerrest an Position 22 und die Palmitoylierung an C341 und C342 sowie potentielle O-Glykosylierungsstellen „x“ der Serine S5, S8 und S15 und Threonine T6 und T7.

2.4.2 Die V2R Mutanten L44F, G185C und R202C

Die Mutation L44F befindet sich in der ersten Transmembrandomäne, wobei an Position 44 Leucin gegen Prolin ausgetauscht wurde (**Abb. 3**). In der Literatur wurde sie als membranständige, aber AVP-bindungsdefekte Mutante beschrieben, die keinerlei Adenylylcyclase-Aktivität nach Stimulation mit AVP zeigte (Oksche et al. 1996).

Die beiden krankheitsauslösenden Mutanten G185C und R202C in der ersten extrazellulären Schleife bringen beide ein zusätzliches Cystein an Position 185 oder 202 ein und weisen in AVP-Bindungsexperimenten einen deutlichen Bindungsdefekt auf. Die Adenylylcyclase-Aktivität der R202C-Mutante war nachweisbar, jedoch mit einer nach rechts verschobenen Dosis-Wirkungs-Kurve im Vergleich zum V2R, wohingegen die G185C-Mutante keinerlei Aktivität zeigte (Schülein et al. 2000). Der V2R enthält eine Disulfid-Brücke, die von zwei Cystein-Resten an Position 112 in der ersten und Position 192 der zweiten extrazellulären Schleife gebildet wird (**Abb. 3**). Dieser Bereich ist in der Familie der GPCR konserviert. In der Literatur wurde postuliert, dass der durch die Mutation zusätzlich eingefügte Cystein-Rest an Position 185 oder 202 eine zweite Disulfidbrücke mit einem freien, an Position 195 sitzenden Cystein bildet und dadurch die Bindung von AVP an den V2R empfindlich stört (Schülein et al. 2001).

2.4.3 Die V2R Mutanten V277A und F287L

Die an der Plasmamembran exprimierte Mutante V277A enthält einen Austausch von Valin zu Alanin in der sechsten transmembranären Schleife (**Abb. 3**). Sie wurde im Adenylylcyclase-Assay mit bis zu 40% reduzierter cAMP-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp beschrieben, sowohl bei Stimulation mit AVP als auch DDAVP. Im Bindungs-Assay zeigte sich bei hohen Konzentrationen von AVP eine mit dem V2R vergleichbare AVP-Bindungskapazität, jedoch war die Menge der Rezeptoren an der Zelloberfläche im Vergleich mit dem Wildtyp (=V2R) reduziert (Wenkert et al. 1996; Schmidt, A. 2005).

Die Mutante F287L in der sechsten Transmembrandomäne wurde vermutlich erstmals bei einer chinesischen Familie identifiziert, die unter NDI litt. Hier erfolgt ein Austausch von Phenylalanin zu Leucin (**Abb. 3**). Durch Immunfluoreszenz und konfokale Mikroskopie wurde auch diese Mutante als membranständig klassifiziert, in [³H]AVP-Bindungsexperimenten jedoch als bindungsdefekt beschrieben (Schmidt, A. 2005). Im

Einleitung

Adenylylcyclase-Assay (AC-Assay) zeigte sich eine nur 12%-ige cAMP-Formation im Vergleich zum V2R (Chen et al., 2002). Für beide Mutanten (V277A und F287L) sowie für den Wildtyp ist neben einer Agonisten-induzierten Internalisierung ebenfalls eine konstitutive Internalisierung beschrieben, welche wahrscheinlich der Aufrechterhaltung der Homöostase im Sinne eines Gleichgewichts zwischen Neusynthese und Abbau dient (Schmidt, A., 2005).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Reagenzien, Chemikalien und Substanzen

1 kB DNA-Leiter	Invitrogen, USA
β -Mercaptoethanol	Carl Roth, GER
Agar	Life Technologies, GER
Agarose	Sigma, USA
Albumin Standard 2,0 mg/ml	Pierce, USA
Ammoniumpersulfat	Merck, GER
Ampicillin-Natriumsalz	Sigma, USA
Aprotinin	Merck, GER
Arginin-Vasopressin (AVP)	FMP, Berlin
BCA-Protein-Assay	Pierce, USA
Benzamidin	Applichem, USA
Big Dye Terminator Cycle Sequencing mix	Applied Biosystems, USA
Bovines Serumalbumin	Sigma, USA
Bromphenolblau	Carl Roth, GER
Kalziumchlorid	Merck, GER
Chemolumineszenz-Detektions-Kit für horseradish peroxidase (HRP)-	Applichem, USA
Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma, USA
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Carl Roth, GER
Essigsäure	VWR Prolabo, F
Ethanol	J. T. Baker, NL
Ethidiumbromid	Carl Roth, GER
EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotin	Pierce, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, GER

Material und Methoden

FuGENE® HD	Roche, CH
Geneticin (G-418)	Calbiochem, USA
Glucose	Merck, GER
Glycerol	Applichem, USA
Glycin	Applichem, USA
HCl	J. T. Baker, NL
Hefeextrakt	GIBCO, USA
Immobilized NeutrAvidin™	Pierce, USA
Isopropanol	Merck, GER
Kaliumchlorid	Merck, GER
Kanamycin	Sigma, USA
L-Glutamin	Sigma, USA
Magnesiumchlorid	Merck, GER
Magnesiumsulfat	Merck, GER
Methanol	J. T. Baker, NL
N,N,N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, GER
Natriumchlorid	Applichem, USA
Natriumaurylsulfat = sodiumdodecyl sulfate (SDS)	Applichem, USA
Nitrocellulose-Membran (Optitran BA S 85)	Schleicher & Schuell, GER
Penicillin/Streptomycin 100 IU/100 µg/ml	Biochrom, GER
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth, GER
PIPES (Piperazine-1,4-bis(2- ethanesulfonic acid))	Sigma, GER
Poly-L-Lysin	Sigma, USA
Ponceau S	Roche, CH
Protein-A-Sepharose	Sigma, USA
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, UK
Roti®-load 1	Carl Roth, GER

Rotiphorese-Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth, GER
Tris(hydroxymethyl-)aminomethan	Applichem, USA
Triton X-100	Carl Roth, GER
Trockenmilchpulver, fettreduziert	Applichem, USA
Trypsin/EDTA 10x (0,5 %/0,2 % w/v)	Biochrom, GER
Trypsin-Inhibitor aus Sojabohne	Applichem, USA
Trypton	Applichem, USA
Tween® 20	Applichem, USA

3.1.2 Primäre Antikörper

monoklonaler Maus-anti-Actin Antikörper	Sigma, USA
monoklonaler Maus-anti-GFP Antikörper	BD Biosciences, GER
polyklonaler Kaninchen-anti-GFP-AK (= GFP01 AK)	AG Schülein

3.1.3 Sekundäre Antikörper

Peroxidase-konjugierter anti-Maus- Antikörper	Sigma-Aldrich, GER
--	--------------------

3.2 Technische Geräte und Software

3.2.1 Technische Geräte

Acrylamid-Gel Elektrophoresekammer	BioRad, USA
Filme	X-OMAT Röntgenfilme; KODAK, GER
Mikroskop	Laser Scanning Microscope Zeiss 510 META; Carl Zeiss, GER
Netzanschlußgerät	BioRAD, USA
PCR Gerät	PTC-200 Peltier Thermal Cycler; MJ Research, USA
pH-Meter	MP220 Mettler Toledo, CH
Photometer	Gene Quant II; Pharmacia Biotech, GER
Pipetten	Eppendorf, GER

Sterilbank	BIOWIZARD, KOJAIR, Heraeus, GER
Thermomixer	Eppendorf, GER
Ultraschallgerät	Sonopuls UW 2040, Bandelin Electronics, GER
Western Blot Kammer	BioRad, USA
Zellzählgerät	Casy®1, Schärfe Sytem, GER
Zentrifuge	Mikro 20; Hettich, GER
Zentrifuge, gekühlt	Z 233 MK; Hermle, GER

3.2.2 Software

Axio Vision	Zeiss, GER
Excel 2000	Microsoft, USA
Photoshop 7.0	Adobe, USA
PowerPoint 2000	Microsoft, USA
Word 2000	Microsoft, USA

3.3 Kits

Invisorb® Spin Cell Mini Kit	Invitek, GER
QuickChange™ Site-directed Mutagenesis Kit	Stratagene, USA
MycoAlert® Mycoplasma Detektions- Assay	Lonza, CH

3.4 Vektoren

Plasmide mit GFP-Fusionsprotein für das HEK293 Zellexpressionssystem:

pV2R.GFP	R. Hermosilla
pV2R.YFP	A. Oksche
pG185C.GFP	A. Oksche
pR202C.GFP	A. Oksche
pV277A.GFP	R. Hermosilla
pF287L.GFP	R. Hermosilla

pβarr2.GFP	A. Oksche
pβarr2.YFP	A. Oksche

Plasmide mit V2R-cDNA für das HEK293 Zellexpressionssystem:

pcDNA3.WT	A. Oksche
pcDNA.G185C	A. Oksche
pcDNA.R202C	A. Oksche
pcDNA.V277A	R. Hermosilla
pcDNA.F287L	R. Hermosilla

3.5 Oligonukleotide

2.5.1 Mutageneseprimer hV2R:

L44F fw	GAG CTG GCG CTG TTC TCC ATA GTC TTT GTG
L44F bw	CAC AAA GAC TAT GGA GAA CAG CGC CAG CTC
F105V fw	GCC ACC GAC CGC GTC CGT GGG CCA GAT GCC
F105V bw	GGC ATC TGG CCC ACG GAC GCG GTC GGT GGC

2.5.2 Sequenzierungsprimer:

A3	GGG ACC CGC TGC TAG CC
B4	CTG CAG ATA CTT CAC GG
B5	CCG CAA AGC AGG CCC AG
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

3.6 Methoden

Alle Puffer und Lösungen wurden mit entionisiertem Wasser (dH₂O) hergestellt und bei 4 °C gelagert.

3.6.1 DNA-Techniken

Stämme:

Escherichia coli (*E. coli*) DH5-α genotype Life Technologies, USA

Material und Methoden

F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 hsdR17 (rk-,mk+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 phoA

Media und Lösungen:

LB Medium (pH 7,5)	Trypton	1%
	Hefeextrakt	0,5%
	NaCl	1%
	dH ₂ O	ad 1 l
MgCl ₂ / MgSO ₄ 2 M	MgCl ₂	20,33 g
	MgSO ₄	24,65 g
	dH ₂ O	ad 100 ml
Glucose-Lösung 1 M	Glucose	18 g
	dH ₂ O	ad 100 ml
SOC Medium (pH 7,0)	Tryptone	10 g
	Hefeextrakt	2,5 g
	NaCl	300 mg
	KCl	250 mg
	dH ₂ O	485 ml
	Autoklavieren 15 min, 121 °C	
Steriles	MgCl ₂ / MgSO ₄ 2 M	5 ml
	Glucose 1 M	10 ml

Selektion:

Flüssige Kultur:

LB Medium versetzt mit Ampicillin (100 μ g/ml) oder Kanamycin (30 μ g/ml).

Agar Platten:

LB Medium versetzt mit 1,5% Agar und Ampicillin (100 μ g/ml) oder Kanamycin (30 μ g/ml).

3.6.1.1 Präparation von chemisch kompetenten Zellen

Reagenzien und Lösungen:

SOB Medium	Trypton	20 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl 5 M	2 ml
	KCl 2 M	1,25 ml
	dH ₂ O	990 ml
	autoklavieren 15 min, 121 °C	
vor Nutzung hinzufügen	Mg Cl ₂ 2 M	10 ml
TB Puffer	PIPES	10 mM
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	15 mM
	KCl	250 mM
	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	55 mM
	dH ₂ O	990 ml (pH 6,75)

Für die Herstellung von kompetenten Zellen wurde die *E. coli* DH5- α genotype Bakterien gewählt. Am 1. Tag erfolgte die Inkubation der Bakterien auf einer Agar-Platte ohne Antibiotikum bei 37 °C. Am folgenden Tag wurden 5 ml LB-Medium ohne Antibiotika mit einer Bakterienkolonie versetzt und im Schüttler (220 rpm) bei 37 °C für 16 Stunden inkubiert. Am 3. Tag wurden 400 ml SOB Medium mit 20 μ l der Kultur versetzt und zwei Nächte lang im Schüttler bei 18 °C inkubiert. Anschließend (Tag 5) wurde das Wachstumsstadium der Flüssigkultur durch Messung der optische Dichte kontrolliert. Bei einer OD₅₅₀ von 0.4 bis 0.6 wurden die DH5- α Bakterien zentrifugiert (2,500 x g für 15 min bei 4 °C), das Pellet in 140 ml TB-Puffer (4 °C) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (2,500 x g, 15 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und die pelletierten Zellen erneut in TB Puffer (34,6 ml, versetzt mit 7% DMSO) resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension aliquotiert (200 μ l) und in Stickstoff eingefroren, um anschließend bei -80 °C gelagert zu werden.

3.6.1.2 Gerichtete Mutagenese mit dem QuickChange™ Site-directed Mutagenesis Kit

Alle Reagenzien wurden mit dem Kit geliefert.

<i>Pfu Turbo</i> ™ DNA-Polymerase	2,5 U/μl	0,5 μl
10x Reaktionspuffer	KCL (100 mM) (NH ₄) ₂ SO ₄ Tris HCl (200mM) pH 8,8 MgSO ₄ (20 mM) Triton X-100 (1%) BSA (1 mg/ml)	2 μl
<i>DpnI</i> -Restriktionsendonuklease	10 U/μl	1 μl
dNTP Gemisch		1 μl

Die Mutationen wurden mittels PCR eingefügt, wobei der Mutagenese-Primer 27-30 Basenpaare lang sein und jeweils mit der Base G oder C beginnen und enden sollte.

1 μl Plasmid-DNA (50 ng/μl) wurden mit jeweils 1 μl Forward Primer (10 mM) und 1 μl Reverse Primer, 10 x Reaktionspuffer, dNTP-Gemisch, *Pfu Turbo*™ DNA-Polymerase und H₂O (ad 20 μl) in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Temperatur	Zeit	Zyklus
95 °C	30 s	1
95 °C	30 s	
55 °C	1 min	18
68 °C	12 min	

Am 2. Tag wurde durch Zugabe von *DpnI* (Restriktionsenzym) die nicht-mutierte, aus den Bakterien stammende DNA, verdaut (1 h bei 37 °C).

3.6.1.3 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation wurden 50 µl kompetente Zellen (auf Eis) mit 5 µl Mutageneseansatz versetzt, für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 45 s bei 42 °C dem Hitzeschock ausgesetzt, um dann für weitere 2 min auf Eis inkubiert zu werden. 300 µl SOC Medium wurde hinzugegeben und die Suspension auf dem Schüttler (600 rpm) bei 37 °C weitere 30 min inkubiert.

Die Mutageneseansätze wurden vollständig auf Agarplatten ausplattiert, welche für die verwendeten Plasmidvektoren selektiv waren und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.6.1.4 Plasmid-Isolierung aus *E. coli*

Am folgenden Tag wurde ein Klon der Bakterienkolonie gepickt und in 3 ml Flüssigmedium gelöst, welches mit Antibiotika versetzt wurde (abhängig vom Plasmid mit Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (30 µg/ml)). Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 220 rpm für 16 h, anschließend wurden 2 ml der Suspension in ein Röhrchen transferiert und bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert (13.000 x g für 1 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet entweder bei - 20 °C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

Für die Isolation von Plasmid-DNA wurde das Invisorb[®] Spin Cell Mini Kit von Invitex benutzt und nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Pellets wurden in 250 µl Lösung A resuspendiert, durch Zugabe von 250 µl Lösung B lysiert und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 4 min wurde 250 µl Lösung C hinzugefügt und erneut vorsichtig gemischt. Um die Plasmide zu isolieren wurden die Proben bei 13.000 x g für 5 min bei RT zentrifugiert und der Überstand in ein 2 ml Röhrchen mit Filter gegossen, welche nach 1 min Inkubation bei 10.000 g bei RT für 1 min zentrifugiert wurden, um die Plasmid-DNA, welche vom Filter absorbiert wurde, zu isolieren. Das Filtrat wurde erneut verworfen und die gebundene DNA mit Hilfe von 750 µl Waschlösung und anschließender Zentrifugation (10.000 x g, 1 min bei RT) gewaschen. Durch erneute Zentrifugation (Maximum für 3 min bei RT) wurde Reste von Ethanol entfernt, die Filter in neue Röhrchen platziert und 70 µl HPLC dH₂O direkt auf die Filter gegeben. Nach erneuter Inkubation (1 min) erfolgte der letzte Zentrifugationsschritt (10.000 x g, 1 min bei RT), wobei die Plasmid-DNA eluiert wurde.

Um die Menge an erhaltener DNA zu bestimmen, wurde die Absorption der Proben bei 260 nm photometrisch bestimmt. Hierzu wurden 2 µl DNA mit 78 µl dH₂O verdünnt und quantifiziert. Die Reinheit ergab sich aus der Ratio zwischen Absorption bei 260 und 280 nm, wobei der Quotient (A_{260}/A_{280}) ≥ 1.7 betragen sollte.

3.6.1.5 Restriktionsanalyse nach Plasmid-Isolation

Reaktions-Mix:

Plasmid-DNA	500 ng
NEB Puffer 10 x	2 µl
NEB BSA 10 x	2 µl
Restriktions-Endonukleasen	je 0,2 µl
dH ₂ O	ad 10 µl
Loading-Puffer	2 µl

Um die Richtigkeit der erhaltenen Plasmide zu überprüfen, wurde eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Dazu wurden 500 ng DNA mit den passenden Restriktions-Endonukleasen (*BamH1*, *Sac1* oder *Xba1*) versetzt und die Fragmente durch die Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht.

3.6.1.6 Agarose-Gel-Elektrophorese

Reagenzien und Lösungen:

TAE Puffer	Tris	4,84 g
	Essigsäure	1,197 g
	EDTA 0,5 M (pH 8)	2 ml
	dH ₂ O	ad 1 l
Elektrophorese-Puffer	Ethidiumbromid 1%	5 µl
	TAE Puffer	ad 100 ml

Die Größe und Qualität der isolierten DNA wurde durch die Agarose-Gel-Elektrophorese kontrolliert. Hierzu wurde ein 1%-iges Agarose-Gel hergestellt und eine Spannung von 80 mV angelegt. Zur Sichtbarmachung der DNA-Banden wurde das Gel für 20 min mit

Ethidiumbromid behandelt und anschließend unter UV-Licht ausgewertet. Um die Größe der Fragmente zu bestimmen, wurde eine 1 kb DNA-Leiter benutzt.

3.6.1.7 DNA-Sequenzierung nach der Dideoxymethode

DNA	300 ng
Big Dye Terminator	2,5 µl
Half Dye	5 µl
Primer (5 µM)	2 µl
dH ₂ O	ad 20 µl

Um die DNA-Plasmidsequenz zu verifizieren, wurden sie mit Hilfe des Big Dye Terminator Sequenzierungs-Mix überprüft. Dazu wurde o.g. Ansatz erstellt und die Sequenzierung erfolgte am Thermocycler mit folgendem Programm:

Temperatur	Zeit	Zyklus
94 °C	1 min	1
94 °C	16 s	2-30
52 °C	16 s	
60 °C	2 min	

Die Fällung der Proben erfolgte mit 2 µl 1,5 M Natriumacetat / 250 mM EDTA-Puffer und anschließend 80 µl Ethanol (95%). Nach Inkubation (20 min auf Eis) erfolgte die Zentrifugation (13.700 x g, 15 min bei RT) und der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde das DNA-Pellet mit 400 µl Ethanol (70%) versetzt und erneut zentrifugiert (13.700 x g, 5 min bei RT). Nachdem der Überstand verworfen wurde, konnte das Pellet an der Luft trocknen.

Für die kapilläre Elektrophorese mit Hilfe des ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer, USA) wurden die Pellets in Loading Dye (20 µl) resuspendiert, gevortext und 15 min inkubiert. Die Sequenzierung erfolgte durch die DNASTAR SeqMan Pro software (DNASTAR Inc., USA)

3.6.2 Zellkulturtechniken

Umsetzung und Unterbringung

Medium:

Komplett-Medium	DMEM	450 ml
	Hitze-inaktiviertes FCS	10% (v/v)
	Glutamin	20 mM
	Penicillin	100 IU/ml
	Streptomycin	100 µg/ml
Komplett-Medium + G418	Komplett-Medium	500 ml
	G-418	80 mg/ml
Medium für Transfektion	DMEM	450 ml
	Hitze-inaktiviertes FCS	10% (v/v)
	Glutamin	20 mM

Zellen:

HEK 293 (Human embryonic kidney cells), DSMZ, GER
Adenovirus Typ 5 transformiert

HEK 293 stabile Zelllinien V277A.GFP und F287L.GFP AG Hermosilla

Die HEK 293 Zellen wurden in Komplett-Medium (DMEM mit 10%-igen (v/v) hitze-inaktivierten FCS, 20 mM Glutamin, 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) bei 37 °C und befeuchteter Luft (5% CO₂) im Brutschrank gezüchtet. Die stabil exprimierenden HEK 293 Zellklone wurden zusätzlich mit G-418 versetzt (80 mg/ml). Alle 2-3 Tage wurden die Zellen umgesetzt, wobei sie mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0.05% / 0.02%) für 4 min bei 37 °C inkubiert wurden. Durch Zugabe von 5 ml Komplett-Medium wurde Trypsin inaktiviert. Anschließend wurden die Zellen erneut ausgesät: 1 x 10⁶ Zellen / 25 cm²-Flasche oder Ø 60 mm-Schale, 2,5 x 10⁶ Zellen / Ø 100 mm-Schale und 1 x 10⁵ Zellen / Ø 35 mm-Schale. Alle 4 Wochen wurden die Zelllinien mit Hilfe des MycoAlert[®] Mycoplasma detection assay (Lonza, CH) auf Mykoplasmen-Infektion getestet.

3.6.2.1 Transiente Transfektion

Zur transienten Transfektion wurde das FuGENE® HD Transfektions-Reagens nach Angaben des Herstellers benutzt. Die Zellen wurden auf Ø 35 mm-Schalen ausgesät und bei 80%-iger Konfluenz wurde das Wachstums-Medium durch Komplett-Medium ohne Antibiotika ersetzt. 0,4 - 0,6 µg Plasmid-DNA wurden in 100 µl serum-freien Medium gelöst und mit 1-2 µl FuGENE® HD für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Transfektions-Reagens tröpfchenweise in die Zellkultur-Schalen gegeben. Diese wurden für 24 – 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

3.6.3 Mikroskopie

Reagenzien und Lösungen:

Poly-L-Lysin Stock- Lösung	Poly-L-Lysin	5 mg
	dH ₂ O	50 ml
Poly-L-Lysin-Lösung	Poly-L-Lysin Stock- Lösung	10 ml
	dH ₂ O	ad 40 ml

Sowohl stabil exprimierende wie auch durch transiente Transfektion entstandene HEK 293 Zellklone wurden auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Glasplättchen in Ø 35 mm-Schalen ausgesät und für 24 - 48 Stunden im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂ inkubiert. Für die Darstellung am Mikroskop wurden die Zellen in einer Wärmekammer warm gehalten und mit 1 ml PBS bedeckt. Das GFP-Fluoreszenzsignal wurde mit Hilfe des Zeiss 510 invert confocal LSM dargestellt. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von AVP (1-100 µM) stimuliert und anschließend bis zu 30 min unter dem Mikroskop observiert.

3.6.4 Protein-Techniken

3.6.4.1 Zell-Lyse

Puffer und Lösungen:

PBS (pH 7,4)	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	8,1 mM
	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Protease-Inhibitor Mix	STI (Trypsin-Inhibitor)	2 µg/ml
	Aprotinin	1 µg/ml
	Benzamidin	100 mM
PMSF Stock-Lösung	PMSF	100 mM
	Ethanol	ad 10 ml

3.6.4.2 Protein-Quantifizierung nach Pierce (BCA-Protein-Assay)

Membranpuffer (PBSi)	PBS	10 ml
	Proteaseinhibitor-Mix	86 µl
Membranpuffer verdünnt	Membranpuffer	200 µl
	H ₂ O	ad 1800 ml

Eine Eichreihe mit Standard BSA (2 mg/ml) und Membranpuffer (1:10 mit H₂O) wurde erstellt (500 µg/µl – 250 µg/µl – 125 µg/µl – 50 µg/µl) und in eine Mikrotiterplatte (96-well) pipettiert (Leerwert: Membranpuffer). Anschließend wurden 25 µl der zu untersuchenden Proben in die Mikrotiterplatte pipettiert (4-fach-Bestimmung) und alle Proben sowie die Eichreihe wurden mit 200 µl der BCA-Reaktionslösung versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde die Extinktion bei 550 nm im Plattenlesegerät gemessen. Die Extinktionswerte lagen im Bereich der Standardkurve und waren proportional zur Proteinkonzentration. Nach linearer Regressionsanalyse der Standardkurve konnten die Proteinkonzentrationen errechnet werden.

3.6.4.3 Membranpräparationen

PBSi	PBS	10 ml
	Protease-Inhibitor Mix	86 µl

Die Zellen wurden auf Ø 60 mm-Schalen ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am zweiten Tag erfolgte die transiente Transfektion mit 6 µg DNA/Schale. Am dritten Tag wurde das Medium aspiriert und die Zellen mit PBS gewaschen, anschließend mit 1 ml PBSi (10 ml PBS + 86 µl Protease-Inhibitor-Mix) geerntet und in BECKMANN micro centrifuge Röhren pipettiert. Durch Ultraschallbehandlung wurden die Zellen zerstört (3 x 1 s) und anschließend bei 60.000 x g für 45 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100-200 µl PBSi resuspendiert. Für die Proteinquantifizierung wurden hier 25 µl entnommen, der Rest der Probe wurde erneut bei 60 000 x g für 45 min zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei -20 °C eingefroren. Nachdem der Proteingehalt der Probe ermittelt war, wurde das Pellet in PBS resuspendiert. 50 µg Protein wurden auf die SDS PAGE aufgetragen.

3.6.4.4 Biotinylierung vom Oberflächenproteinen

Puffer A (pH 8,0)	Tris HCL	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	1 mM
	Triton X-100	1%
	SDS	0,1%
	H ₂ O	ad 200 ml
	Waschpuffer 1 (pH 8,0)	Tris HCl
NaCl		500 mM
EDTA		1mM
Triton X-100		0,5%
SDS		0,1%
H ₂ O		ad 200 ml
Waschpuffer 2 (pH 7,4)		Tris-HCl

Material und Methoden

	EDTA	1mM
	Triton X-100	0,5%
	SDS	0,1%
	H ₂ O	ad 100 ml
Biotin-Lösung	EZ-Link™ Sulfo-NHS- Biotin	0,5 mg/ml
	PBS	
Stopp-Lösung	DMEM	
Proteaseninhibitor-Mix	Benzamidin	100 mM
	Trypsininhibitor	2 µg/ml
	Aprotinin	1 µg/ml
Lyse-Puffer	Puffer A	10 ml
	PMSF-Lsg.	125 µl
	Proteaseninhibitor-Mix	80 µl
Sepharose-Beads	Protein-A-Sepharose	5 mg/Eppi
	Puffer A	ad 500 µl
	GFP 01-AK	10 µl/Eppi

Tag 1

Ø 60 mm-Schalen wurden mit Poly-L-Lysin beschichtet und HEK293 stabil exprimierende Zellen ausgesät (V2R.GFP, V277A.GFP und F287L.GFP).

Die Protein-A-Sepharose Beads, beladen mit GFP 01-AK wurden hergestellt. Pro Eppendorf-Gefäß wurden 5 mg Protein-A-Sepharose zusammen mit 150 µl Puffer A versetzt und gevortext. Im Kühlschrank mussten sie für 30 min quellen, wurden anschließend zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Nach Zugabe von 500 µl Puffer A und 10 µl GFP 01-AK wurden die Proben bei 4 °C über Nacht im Schüttler aufbewahrt (50 rpm).

Tag 2

Lyse-Puffer und Biotin-Lösung wurden hergestellt und auf Eis gelagert. Einige Schalen wurden zunächst mit AVP (1-100 µM) behandelt und für 20 min im Brutschrank inkubiert, bevor sie biotinyliert wurden. Die Biotinylierung fand im Kühlraum statt (4 °C). Das Medium

wurde abgegossen und die Zellen 3 x mit PBS gewaschen, anschließend wurde pro Schale 1 ml Biotin-Lösung (0,5 mg/ml) hinzugegeben und 30 min auf dem Schüttler inkubiert (50 rpm). Die Biotin-Lösung wurde abgegossen und die Zellen mit 1 ml Stopp-Puffer (DMEM) behandelt, welcher 10 min auf dem Schüttler inkubierte. Anschließend wurden die Zellen erneut 3 x mit PBS gewaschen, danach wurde 1-1,5 ml Lysis-Puffer hinzugegeben (1 h bei 165 rpm). Die Zellen wurden abgekratzt, das Lysat in Röhrchen überführt und bei 20.000 x g, 4 °C für 20 min zentrifugiert. Ca. 950 µl des Überstands wurden zur Präzipitation mit 100 µl Neutravidin versetzt, sorgfältig vermischt und bei 4 °C für 1 h auf dem Rotator inkubiert.

Die folgenden Schritte fanden nicht mehr im Kühlraum, jedoch weiterhin auf Eis statt. Die Neutravidin-Beads wurden abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 5 s bei Vmax), 2 x mit Waschpuffer 1 (1 ml) und 1 x mit Waschpuffer 2 (1 ml) gewaschen und der Überstand jeweils nach dem Abzentrifugieren verworfen. Das Pellet wurde in 40 µl Laemmli-Puffer (1x) aufgenommen und bei 95 °C und 100 rpm für 5 min auf dem Schüttler inkubiert, um die Bindung zwischen Neutravidin und Biotin zu lösen. Nach kurzer Inkubation auf Eis (1 min) wurden die Beads abzentrifugiert und der Überstand auf die SDS-PAGE aufgetragen.

3.6.4.5 SDS-PAGE und Immunblot

4x Laemmli Puffer	Glycerol	20%
	Tris HCl pH 6,8	100 mM
	SDS	4%
	β-Mercaptoethanol	0,1 M
	Bromphenol-Blau	0,2%
Trenngel- Puffer	Tris HCl pH 8,8	0,75 M
Sammelgel- Puffer	Tris HCl pH 6,8	0,625 M
Lauf-Puffer	Tris OH	0,025 M
	Glycin	0,19 M
	SDS	0,1%
Blot-Puffer	Tris OH	0,02 M
	Glycin	0,15 M
	Methanol	20% (v/v)

Material und Methoden

	SDS	0,015% (w/v)
PBS-T 0,1%	Tween 20	0,1%
	PBS	ad 1,0 l
Block-Puffer	fettreduziertes Milchpulver	5% (w/v)
	PBS-T 0,1%	ad 100 ml
Ponceau S Stock-Lösung	Ponceau S	2%
	Sulfosalicylsäure	30%
	Trichloressigsäure	30%
Ponceau S Färbe-Lösung	Ponceau S Stock-Lösung	5%
	dH ₂ O	ad 20 ml
Antikörper- Puffer	fettreduziertes Milchpulver	2 % (w/v)
	PBS-T 0,1 %	ad 100 ml
<u>Für zwei Gele:</u>	<u>Trenngel 10%</u>	<u>Sammelgel 10%</u>
H ₂ O	1,75 ml	3,5 ml
Rotiphorese Gel 30	3,75 ml	835 µl
Trenngelpuffer	5,625 ml	
Sammelgelpuffer		625 µl
SDS 20 %	56,5 µl	25 µl
TEMED	5,65 µl	5 µl
Ammoniumpersulfat 10%	79 µl	25 µl

Die Protein-Samples wurden mit Laemmli-Puffer versetzt, 5 min bei 95 °C inkubiert und anschließend auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Pro Gel wurde eine Stromstärke von 20 mA angelegt, die Laufzeiten hingen von der Größe des gesuchten Proteins ab. Zur Größenbestimmung des Proteins wurde ein Molekulargewicht-Marker eingesetzt.

Nach der Auftrennung wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet (4 °C, 100 mA/Gel), wobei auch hier die Dauer von der Größe des Proteins abhängig war. Der Erfolg des Protein-Transfers wurde durch Ponceau S-Färbung der Membran überprüft (30 s Inkubation, dann 3 x 5 min mit H₂O waschen). Anschließend wurde die Nitrocellulose-Membran mit Block-Puffer geblockt, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden (1 h, RT).

Der 1. Antikörper (GFP 01-AK, 1:1000) wurde in PBS-T (0,1% Tween 20) und fettreduziertem Milchpulver (2%) gelöst und 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit PBS-T gewaschen und mit dem 2. Antikörper, welcher an eine horseradish peroxidase (HRP) gekoppelt war, für 1 h bei RT inkubiert (anti-Maus-HRP-konjugierter AK, 1:2000). Nach erneutem Waschen (3 x 10 min mit PBS-T) wurden die Membranen mit 2 ml ECL Lumineszenz-Lösung für 2 min inkubiert und anschließend mit Hilfe eines Kodak-X-Omat Films entwickelt.

4 Ergebnisse

4.1 Die Gesamtexpression des V2R und der Mutanten L44F, G185C, R202C, V277A und F287L

Durch eine Membranpräparation lassen sich membranständige Rezeptoren darstellen und deren Gesamtexpression quantifizieren. Hierzu wurden HEK 293 Zellen mit Plasmiden, die sowohl für den humanen V2R (als Fusionsprotein mit GFP: V2R.GFP) als auch für die V2R Mutanten (Rezeptor-Fusionsproteine L44F.GFP, G185C.GFP, R202C.GFP, V277A.GFP und F287L.GFP) codieren, transient transfiziert. Ein polyklonaler Anti-GFP-AK ermöglichte die Detektion der Rezeptoren.

Sowohl der V2R wie auch alle Mutanten (L44F, G185C, R202C, V277A und F287L) zeigen unbehandelt zwei immunreaktive Protein-Banden (**Abb. 4**). Vor allem der V2R und die beiden Mutanten V277A und F287L zeigen bei 75-80 kDa eine stark ausgeprägte Bande, welche bei der Mutante L44F und besonders bei den Mutanten G185C und R202C weniger intensiv zu sein scheint. Dieselbe Relation in Bezug auf die Ausprägung ergibt sich bei der unteren und insgesamt schmaleren Proteinbande bei 60-65 kDa. Auch diese scheint vor allem beim V2R und den Mutanten V277A und F287L stärker ausgeprägt zu sein als bei den Mutanten L44F, G185C und R202C. Um die Intensität der Bandenstärke der verschiedenen Rezeptoren vergleichen zu können, wurde ein Anti-Actin-AK eingesetzt, dessen Bande bei 37 kDa als Ladekontrolle dient und hier eine homogene Verteilung der Proteinmenge zeigt.

Ergebnisse

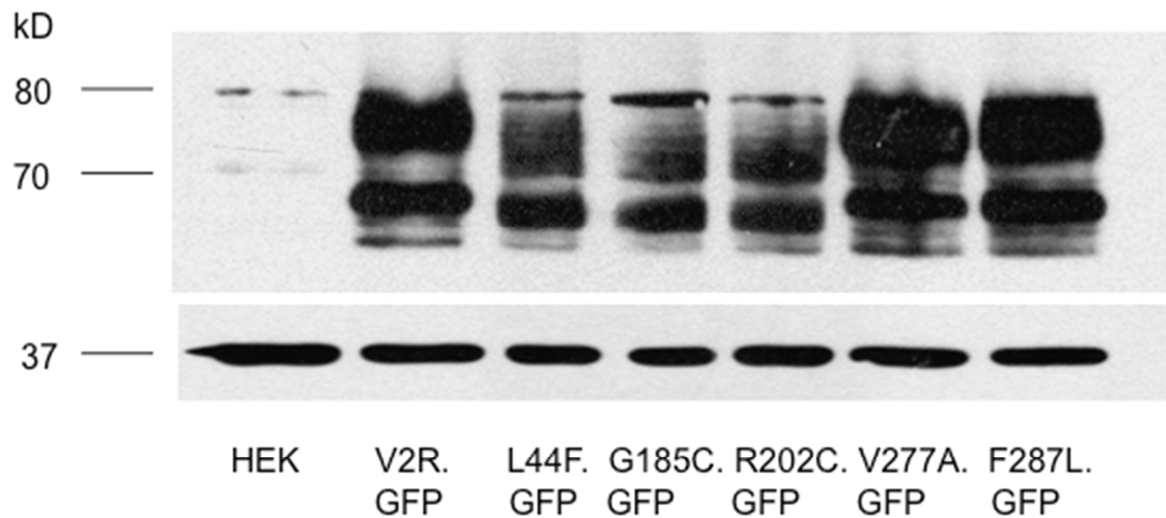


Abbildung 4: Membranexpression des V2R.GFP (Wildtyp) und der V2R Mutanten L44F.GFP, G185C.GFP, R202C.GFP, V277A.GFP und F287L.GFP in transient transfizierten HEK 293 Zellen. Die Zellen wurden geerntet, durch Ultraschallbehandlung zerstört, zentrifugiert und die Pellets resuspendiert. Nach einer quantitativen Proteinbestimmung wurden 50 µg Protein auf die SDS PAGE aufgetragen und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Zur Detektion wurde ein polyklonaler Anti-GFP-AK eingesetzt. Untransfizierte HEK 293 Zellen dienten als Kontrolle (HEK). Die obere Bande bei ca. 75-80 kDa entspricht dem komplex glykosylierten Rezeptor, die Bande bei ca. 60 kDa stellt den kernglykosylierten Rezeptor dar. Die separate untere Bande bei 37 kDa entspricht Actin und wurde mit einem Anti-Actin-AK detektiert. Sie dient als Ladekontrolle

4.2 Analyse des Glykosylierungsstatus des V2R und der Mutanten L44F, G185C und R202C

Während der Rezeptorsynthese erfolgen in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle posttranslationale Glykosylierungen an definierten Rezeptorbereichen. Der unreife V2R wird im endoplasmatischem Retikulum (ER) an der Aminosäure Asparagin (N21) Mannose-reich glykosyliert (N-Glykosylierung, auch Kernglykosylierung genannt). Anschließend erreicht der Rezeptor über das ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC) den Golgi-Apparat, wo die Kern-Glykosylierung durch eine komplexe Glykosylierung ersetzt wird. Diese besteht aus komplexen Zucker-Resten, welche außerdem noch an Serin- und Threonin-Resten angeheftet wird (O-Glykosylierung). Der reife, vollständig glykosylierte Rezeptor wird an die Plasmamembran transportiert und dort inseriert.

Ein enzymatischer Verdau der Rezeptoren wurde angestrebt, um die Lokalisation der Rezeptorproteine im sekretorischen Transportweg zu bestimmen und der Frage nach dem Vorhandensein eines vollständig glykosylierten Rezeptor nachzugehen. Dazu wurden die Membranen mit den Glykosidasen Endo H und PNGase F behandelt (**Abb. 5**). Beide Glykosidasen spalten N-gebundene Zuckerreste von Proteinen. EndoH entfernt ausschließlich N-glykosylierte Mannose-reiche Formen, welche im ER angehängt werden. PNGaseF spaltet alle Formen von N-Glykosylierungen, sowohl die Mannose-reichen (aus dem ER) wie auch die Komplexen, welche im Golgi-Apparat hinzugefügt werden.

Unbehandelt zeigen die Banden des V2R und der Mutanten L44F, G185C und R202C in **Abb. 5** dasselbe Bild wie in **Abb. 4**, jedoch scheint in diesem Blot die Gesamtexpression sowohl des V2R wie auch der Mutanten an der Zellmembran annähernd gleich zu sein. Die Relation der Banden zueinander ist aber unverändert, man sieht weiterhin bei 75-80 kDa eine intensivere, breitere Bande und eine schmale bei 60-65 kDa.

Die untere Bande (60-65 kDa) zeigt nach Behandlung mit EndoH ein niedrigeres Molekulargewicht, während die obere Bande unverändert bleibt. Da EndoH ausschließlich die N-glykosylierte Mannose-reiche Form entfernt, welche im ER angehängt wird, entspricht die untere Bande dem kernglykosylierten Rezeptor. Nach Zugabe von PNGase F kommt es zu einer Abnahme des Molekulargewichts beider Banden, erkennbar an der Verlagerung der Banden nach unten. Aufgrund der O-Glykosylierung, die im Golgi-Apparat erfolgt und die nicht von PNGase F gespalten werden kann, erreichen sie nicht dieselbe

Ergebnisse

Höhe. Es wird deutlich, dass die obere Bande bei 75-80 kDa sowohl in **Abb. 4** wie auch in **Abb. 5** dem komplex-glykosylierten Rezeptor entspricht.

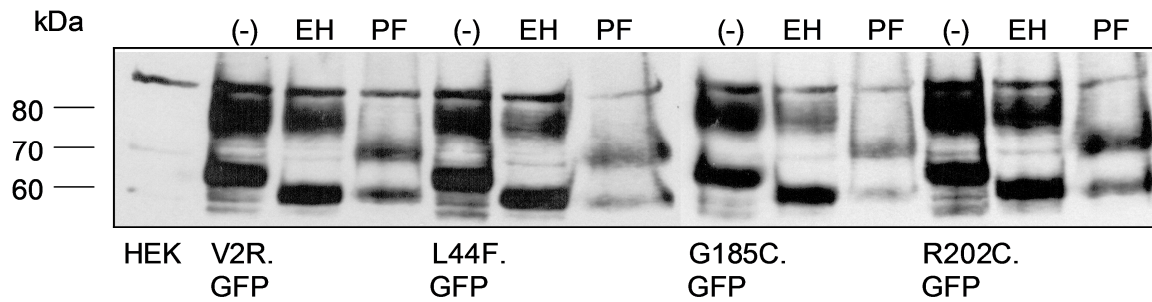


Abbildung 5: Enzymatischer Verdau des V2R.GFP und der V2R Mutanten L44F.GFP, G185C.GFP und R202C.GFP mit Glykosidasen. Durch Membranpräparation erhaltene Proben wurden mit EndoH (EH) oder PNGase F (PF) versetzt oder blieben unbehandelt (-). Die Proteine wurden durch die SDS PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und durch einen Anti-GFP-AK detektiert. Die untere Bande bei 60-65 kDa entspricht dem kernglykosylierten Rezeptor, die obere Bande bei 75-80 kDa dem komplex-glykosylierten Rezeptor. Kontrolle: untransfizierte HEK 293 Zellen (HEK)

4.4 Internalisierungs-Assay des V2R und der Mutanten V277A und F287L

Um den an der Zelloberfläche exprimierten Rezeptor erneut zu quantifizieren und die Internalisierungsrate der Rezeptoren zu bestimmen, wurde eine Biotinylierung der plasmamembranständigen Proteine durchgeführt (**Abb. 6**). Durch Präzipitation mit Neutravidin und anschließend mit GFP wurden ausschließlich Rezeptor.GFP-Fusionsproteine mit Hilfe des Immunoblots detektiert. Um eine annähernd gleiche Menge und Verteilung der Rezeptoren zu gewährleisten, wurden stabil transfizierte Zelllinien des Wildtyps (V2R.GFP) und der beiden Mutanten V277A.GFP und F287L.GFP gewählt. Es wurden sowohl Zellen im Ruhezustand biotinyliert wie auch nach Behandlung mit AVP (1-100 μ M für 20 min). Somit konnte auch eine Aussage über die an der Plasmamembran verbleibende Menge der Rezeptoren nach Stimulation gemacht werden. Der V2R und die V277A-Mutante wurden mit gleichen Konzentrationen von AVP stimuliert (1 μ M), da sie in Experimenten eine vergleichbare AVP-Bindekapazität zeigten (Wenkert et al. 1996). Da die F287L-Mutante einen erheblichen Bindungsdefekt aufwies, wurden hier zur Stimulation eine Konzentrationen von 100 μ M AVP eingesetzt.

Sowohl für den V2R als auch für beide Mutanten lässt sich in **Abb. 6** eine Rezeptor-Bande bei 75-80 kDa darstellen, die der komplex-glykosylierten Rezeptorform entspricht. Des Weiteren zeigt sich vor allem beim V2R und bei der F287L-Mutante eine deutlich ausgeprägte Oberflächenexpression wohingegen die V277A-Mutante weniger an der Plasmamembran exprimiert zu sein scheint. Stimuliert man die Rezeptoren für 20 min mit AVP, zeigt sich sowohl beim V2R wie auch bei den beiden Mutanten eine ausgeprägte Abnahme der Banden-Stärke, was auf eine Internalisierung der vormals membranständigen Rezeptoren hindeutet.

Ergebnisse

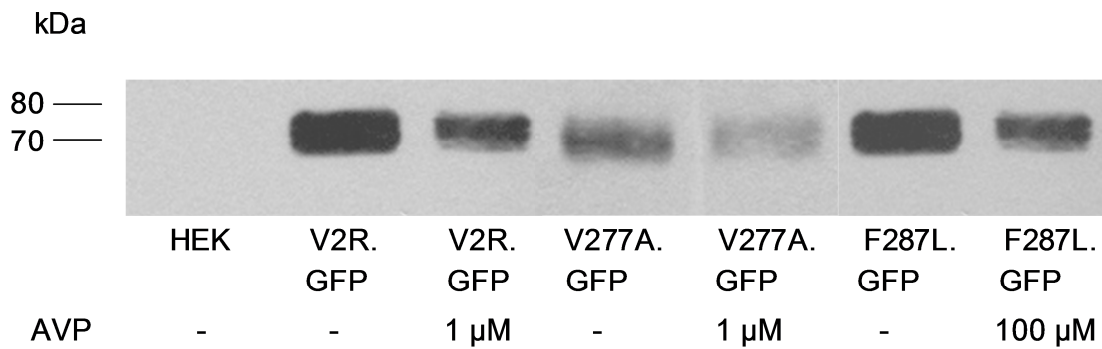


Abbildung 6: Oberflächenbiotinylierung von V2R.GFP, V277A.GFP und F287L.GFP vor und nach Stimulation mit AVP (für 20 min). Stabil transfizierte HEK 293 Zellen wurden mit Biotin markiert, anschließend mit Neutravidin und GFP präzipitiert. Durch Immunoblot wurden die Proteine aufgetrennt und mit Hilfe eines Anti-GFP-AK detektiert. Die Bande entsprechen den Rezeptoren im Ruhezustand (-) sowie nach Stimulation mit AVP (1-100 μ M). Man sieht sowohl beim V2R wie auch bei beiden Mutanten V277A und F287L eine deutliche Abnahme der Bandenstärke nach Stimulation mit AVP, was einer Rezeptorinternalisierung entspricht. Kontrolle: leere HEK 293 Zellen (HEK).

4.5 Analyse des V2R und der Mutanten L44F, G185C und R202C mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop

Zur Verifizierung der Expression und zur Darstellung des Internalisierungsverhaltens des V2R und der Mutanten wurden Bilder-Serien am Laser Scanning Mikroskop (LSM) erstellt. Durch transiente Transfektion wurden sowohl Rezeptor.GFP-Fusionsproteine wie auch Rezeptor-cDNA + β -Arrestin2.GFP-Konstrukte in HEK 293 Zellen exprimiert. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert und anschließend in einer Wärmekammer unter dem Mikroskop betrachtet. Anhand der an lebenden Zellen erstellten Aufnahmen in unstimuliertem Zustand ließen sich sowohl die subzelluläre Verteilung der Rezeptoren sowie des β -Arrestin 2, als auch die Rezeptorexpression an der Zellmembran darstellen. Nach Zugabe unterschiedlicher Mengen von AVP (Endkonzentration in der Wärmekammer: 500 nM - 100 μ M) konnte durch die Rezeptor.GFP-Konstrukte die Internalisierung des Rezeptors unter dem Mikroskop über einen definierten Zeitraum direkt verfolgt werden. Mit Hilfe des β -Arrestin2.GFP-Konstrukts wurde das Bindungs- und Internalisierungsverhalten von β -Arrestin 2 und somit indirekt auch des V2R dargestellt. Die Ko-Transfektion von Rezeptor.CFP- (V2R) und β -Arrestin2.YFP-Konstrukten mit anschließender Überlagerung der Bilder ermöglichte eine Aussage über die Ko-Lokalisation beider Signale (**Abb. 7**).

4.6 Subzelluläre Verteilung des V2R

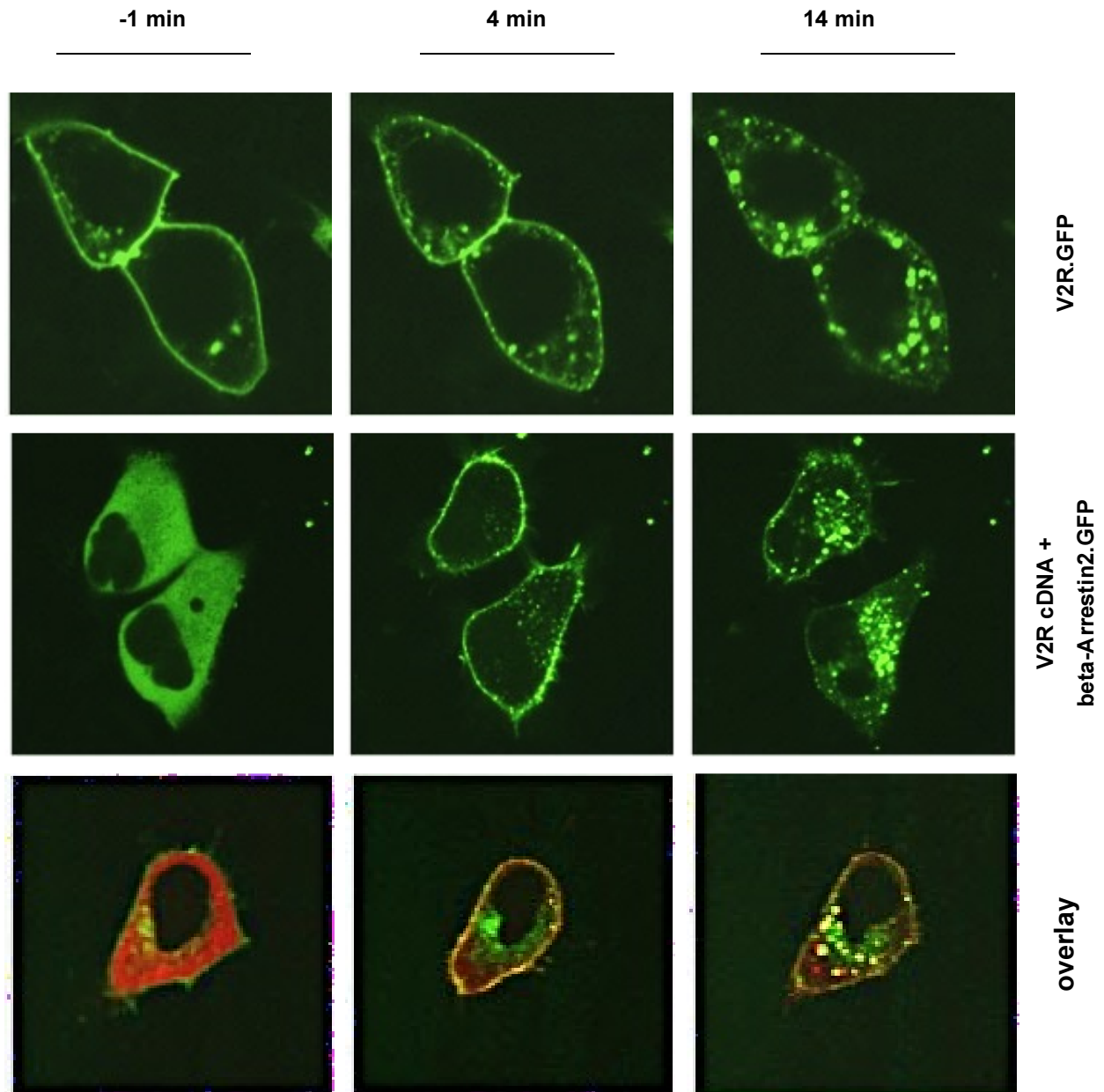


Abbildung 7: Subzelluläre Verteilung des V2R und β -Arrestin 2 vor und nach Stimulation mit AVP. Lebende HEK 293 Zellen wurden transient transfiziert mit V2R.GFP, V2RcDNA + β -Arr2.GFP und V2R.CFP + β -Arr2.YFP (Überlagerung der beiden Signale: Rezeptor: grün, β -Arrestin: rot, Ko-Lokalisation: gelb). Gezeigt werden Bilder bei -1 min (= unstimuliert), 4 min und 14 min nach Stimulation mit AVP. V2R.GFP: Stimulation mit 1 μ M AVP; V2R cDNA + β -Arr2.GFP: Stimulation mit 500 nM AVP; V2R.CFP + β -Arr2.YFP: Stimulation mit 10 μ M AVP

Wie auch schon in vorherigen Experimenten gezeigt (**Abb. 4-6**), ist der V2R vor allem membranständig, deutlich erkennbar an dem fluoreszierenden GFP-Signal der Plasmamembran (**Abb. 7, obere Bildserie**). Die Akkumulation der GFP-Signale innerhalb der Zelle unter Ruhebedingungen könnte sowohl dem Golgi-Apparat wie auch dem perizentriolären endozytotischen Recycling-Kompartiment entsprechen. Nach Stimulation mit AVP (hier 1 μ M) kommt es sukzessiv zu einer Internalisierung des GFP-gebundenen V2R in die Zelle hinein. Nach ungefähr 15 min ist der Großteil der vormals membranständigen Rezeptoren internalisiert (**Abb. 7, obere Bildserie**). Denselben Effekt kann man bereits bei niedrigeren AVP-Konzentration beobachten (hier nicht gezeigt).

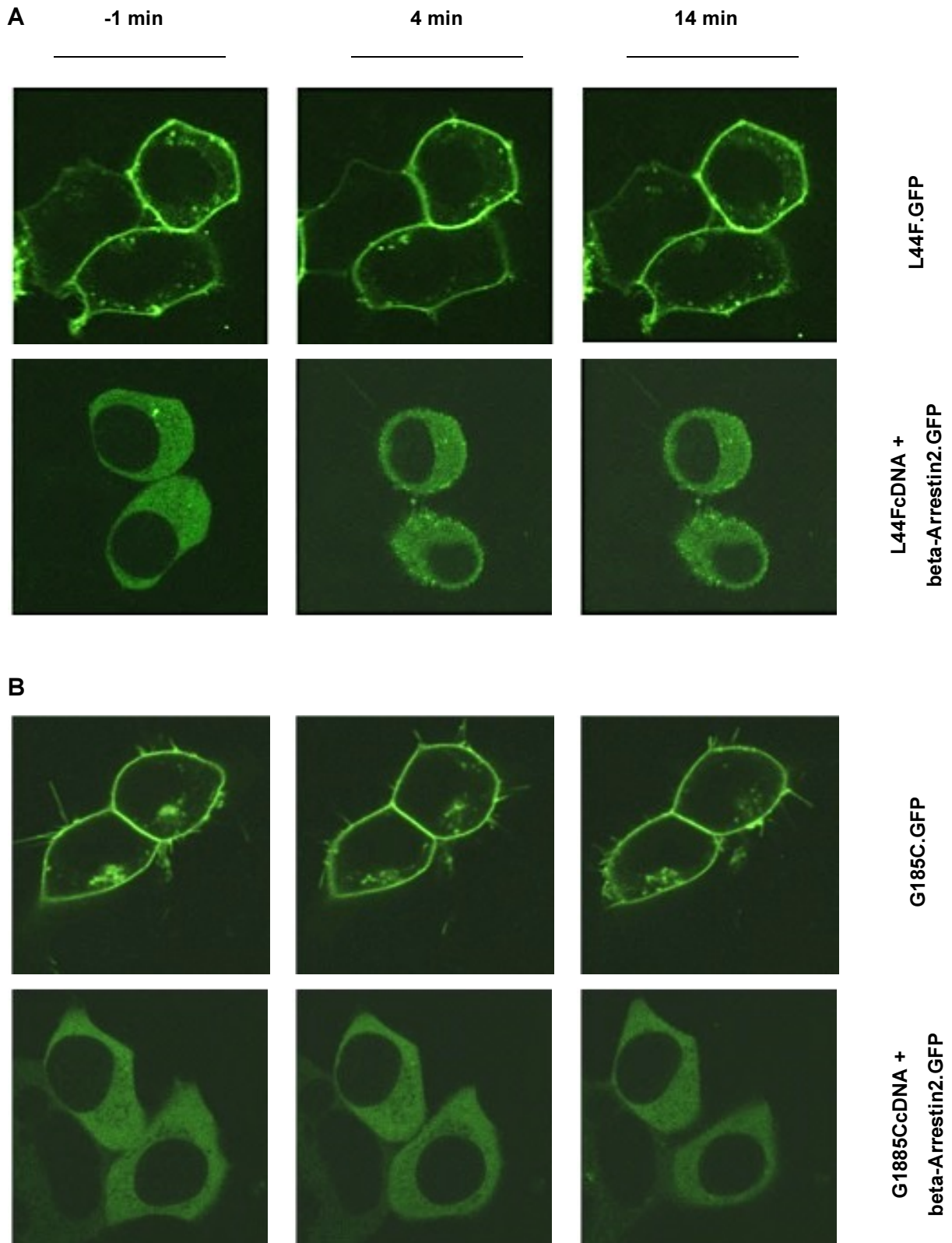
Das β -Arrestin 2-Signal der mit V2RcDNA + β -Arr2.GFP transient transfizierten Zelle zeigt im Ruhezustand eine diffuse Verteilung im Zytoplasma mit Aussparung des Zellkerns. Bei Zugabe von AVP (hier 500 nM) kommt es zuerst zu einer Rekrutierung und Clusterung des β -Arrestin 2 an der Plasmamembran und anschließend ebenfalls zu einer Internalisierung (**Abb. 7, mittlere Bildserie**).

Bei Ko-Transfektion von Rezeptor.CFP und β -Arrestin2.YFP mit anschließender Überlagerung der Signale zeigt sich erneut das unterschiedliche Verteilungsmuster in der Zelle: der Rezeptor (hier grün) ist vor allem an der Plasmamembran exprimiert, β -Arrestin 2 (hier rot) zeigt eine homogene Verteilung innerhalb der Zelle (**Abb. 7, untere Bildserie**). Nach Zugabe von AVP (hier 10 μ M) kommt es erst zur Bindung von β -Arrestin 2 an den V2R mit sichtbarer Ko-Lokalisation an der Plasmamembran (nach 4 min, hier gelbes Signal) und anschließend zur gemeinsamen Internalisierung (gelbes Signal nach 14 min, **Abb. 7, untere Bildserie**), wobei in unseren Experimenten eine länger andauernde Ko-Lokalisation von V2R und β -Arrestin 2 beobachtet wird (hier nicht gezeigt).

4.7 Subzelluläre Verteilung der V2R Mutanten L44F, G185C und R202C

Die Patienten-Mutanten L44F, G185C und R202C sind als Auslöser des X-NDI bekannt und bezüglich cAMP-Aktivierung und AVP-Bindungskapazität bereits pharmakologisch untersucht und vorbeschrieben worden (Schülein et al. 2000 und 2001). Die als bindungsdefekt beschriebenen Mutanten L44F, G185C und R202C wurden sowohl als GFP-Fusionsproteine, wie auch als cDNA zusammen mit dem β -Arrestin2.GFP-Konstrukt durch transiente Transfektion in HEK 293 Zellen exprimiert und unter dem LSM mit hohen Dosen von AVP stimuliert (Endkonzentration in der Wärmekammer: 10-100 μ M, **Abb. 8**).

Ergebnisse



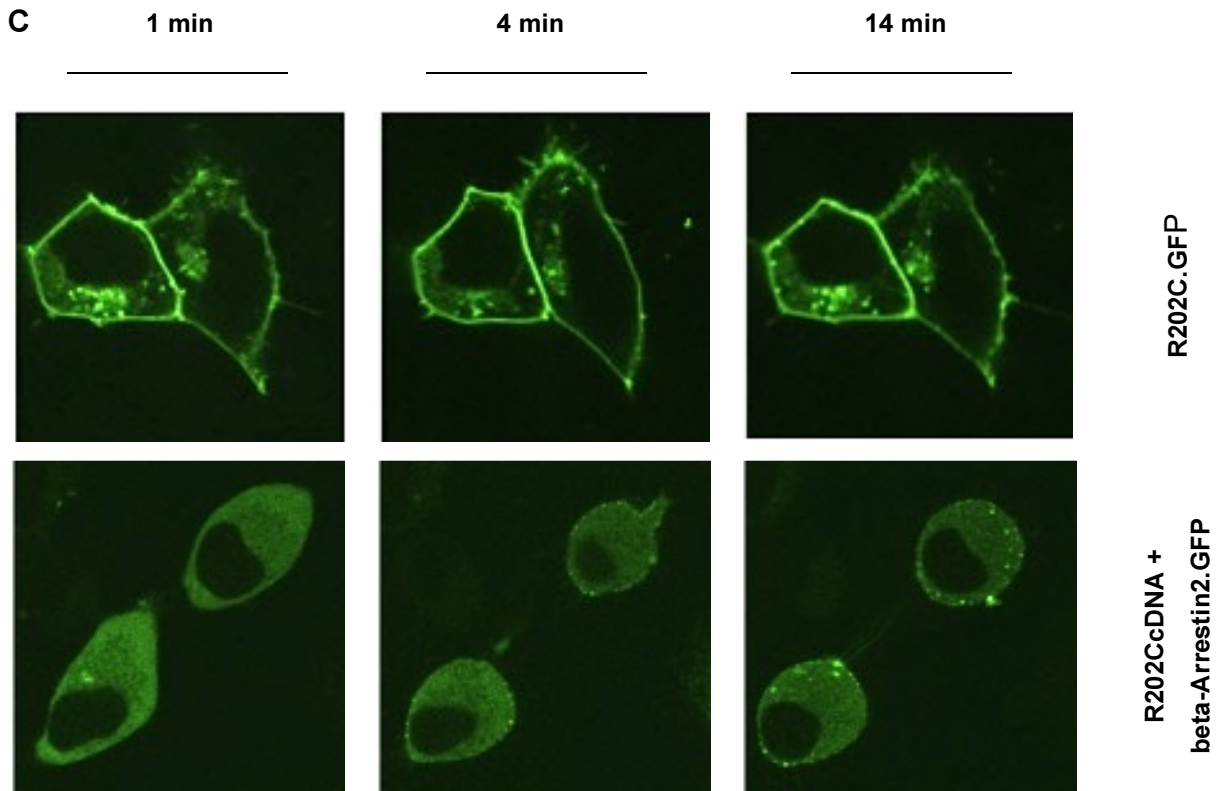


Abbildung 8 A, B und C: Subzelluläre Verteilung der V2R Mutanten L44F (A), G185C (B) und R202C (C) sowie β -Arrestin 2 vor und nach Stimulation mit AVP. Lebende HEK 293 Zellen wurden transient transfiziert mit L44F.GFP und L44FcDNA + β -Arr2.GFP / G185C.GFP und G185C cDNA + β -Arr2.GFP / R202C.GFP und R202C cDNA + β -Arr2.GFP. Nach dem ersten Bild (-1 min) wurde AVP hinzugegeben und über knapp 15 Minuten alle 2 min ein neues Bild der Zellen angefertigt. Alle Rezeptor.GFP-Fusionsproteine wurden mit 10 μ M AVP stimuliert, alle β -Arrestin2.GFP-Fusionsproteine + cDNA wurden mit 100 μ M AVP stimuliert (jeweilige Endkonzentration in der Wärmekammer).

Alle drei Mutanten zeigten die gleiche subzelluläre Verteilung an der Plasmamembran wie der wildtypische Rezeptor. Die Expressionsraten der Rezeptoren an der Plasmamembran scheinen sowohl untereinander wie auch im Vergleich mit dem V2-Rezeptor ähnlich zu sein, erkennbar an der Intensität des Rezeptor.GFP-Signals an der Plasmamembran. Die intrazelluläre Akkumulation der GFP-Signale stellt auch hier vermutlich den Golgi-Apparat oder das perizentrioläre endozytotische Recycling-Kompartiment dar.

Bei den Mutanten L44F und R202C ließ sich bei hoher Konzentration von AVP (100 μ M) allenfalls eine schwache Rekrutierung und Internalisierung von β -Arrestin 2 nachweisen (**Abb. 8, A und C**). Über die Rezeptoren der beiden Mutanten lässt sich anhand der Bilder keine eindeutige Aussage in Bezug auf eine Internalisierung nach Stimulation mit AVP (hier: 10 μ M, **Abb. 8, A und C**) machen. Die G185C-Rezeptormutante ließ sich ebenfalls

auch bei einer Dosis von 10 μM AVP nicht stimulieren, ebenso wie β -Arrestin 2 bei hoher Konzentration von AVP (100 μM) weder nennenswert an die Plasmamembran rekrutiert noch internalisiert wurde (**Abb. 8 B**).

4.8 Stimulation mit peptidischen V2R Analoga

Nachdem die Mutanten trotz hoher Konzentrationen von AVP keine oder auch nur geringe Internalisierung zeigten, verfolgten wir einen anderen Ansatz. Es wurde versucht, die Mutanten mit sogenannten peptidischen AVP-Analoga (V2R Agonisten) zu behandeln, um eine hinreichende Stimulation der Rezeptoren zu erreichen.

Diese Analoga (**Abb. 9**) haben eine ähnliche Struktur wie das physiologische Hormon AVP, weisen jedoch an unterschiedlichen Positionen einen Austausch von Aminosäuren auf. So weist beispielsweise das eingesetzte DAVP (992141) die rechtsdrehende Aminosäure Arginin an Position 8 auf, bei OVP (992158) wurde an Position 8 das Arginin durch Ornithin ersetzt und das LVP (992161) enthält an Stelle des Arginin an Position 8 ein Lysin. Die Agonisten 200208 und 200194 sind Aminosäurderivate des Ornithin. Die Aminosäuren wurden an mehreren Positionen verändert und teilweise durch synthetisch hergestellte ersetzt (**Abb. 9**).

Die HEK 293 Zellen wurden erneut transient transfiziert, wobei sowohl die Rezeptor.GFP-Fusionsproteine wie auch das β -Arrestin2.GFP-Fusionsprotein + cDNA genutzt wurden. Unter gleichen Bedingungen erfolgte unter dem LSM die Zugabe der Analoga in einer Gesamtkonzentrationen von 10 μM in der Wärmekammer und die Zellen wurden bis zu 20 min unter dem Mikroskop beobachtet.

Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse der Messungen im Folgendem in tabellarischer Form dargestellt (**Abb. 9**).

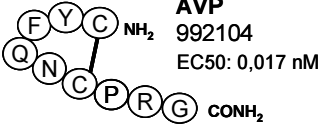
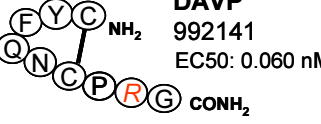
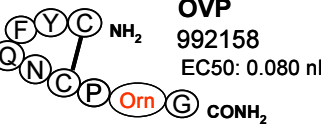
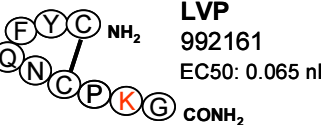
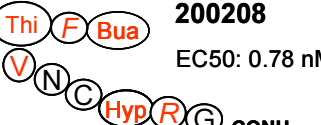
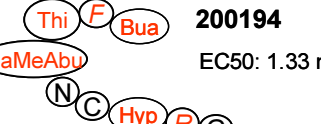
AVP / Peptidische Analoga	Wildtyp	L44F	G185C	R202C
 <p>AVP 992104 EC50: 0,017 nM</p>	+	(+)	-	(+)
 <p>DAVP 992141 EC50: 0.060 nM</p>	+	-	-	-
 <p>OVP 992158 EC50: 0.080 nM</p>	+	-	n. d.	-
 <p>LVP 992161 EC50: 0.065 nM</p>	+	-	-	-
 <p>200208 EC50: 0.78 nM</p>	+	n. d.	-	-
 <p>200194 EC50: 1.33 nM</p>	+	n. d.	-	-

Abbildung 9: Aminosäurestruktur von AVP und der peptische V2R Analoga sowie Ergebnis der Anwendung auf den Wildtyp und die Mutanten L44F, G185C und R202C. Die Untersuchung des V2R und der Mutanten fand erneut am LSM statt. Es wird deutlich, dass alle AVP-Analoga in der Lage waren, den wildtypischen Rezeptor zu stimulieren. Bei den Mutanten hingegen konnte trotz hoher Konzentration der Analoga (10 μ M) keine Stimulation der Rezeptoren erreicht werden, noch war eine Rekrutierung und Internalisierung von β -Arrestin 2 sichtbar.

Abkürzungen: „+“: stimulierbar; „(+“: wenig stimulierbar; „-“: nicht stimulierbar; n. d.: nicht durchgeführt.

Dargestellt sind außerdem die Aminosäurestrukturen von AVP und den Agonisten im Einzelcode: BUA = Butylalanin, CaMeAbu = (S)-2-amino-2-methyl-butanoic acid, C = Cystein, F = Phenylalanin, G = Glycin, Hyp = Hydroxyprolin, K = Lysin, N = Asparagin, Orn = Ornithin, P = Prolin, Q = Glutamin, R = Arginin, Thi = 2-Thienylalanin, V = Valin, Y = Tyrosin. Rechtsdrehende Aminosäuren sind kursiv dargestellt, der Austausch von Aminosäuren ist rot markiert.

EC50 = mittlere effektive Konzentration: Konzentration, bei der ein halbmaximaler Effekt beobachtet wird (bezogen auf den Wildtyp).

Ergebnisse

In der Tabelle sind sowohl AVP wie auch die getesteten Analoga in ihrer Aminosäuresequenz dargestellt.

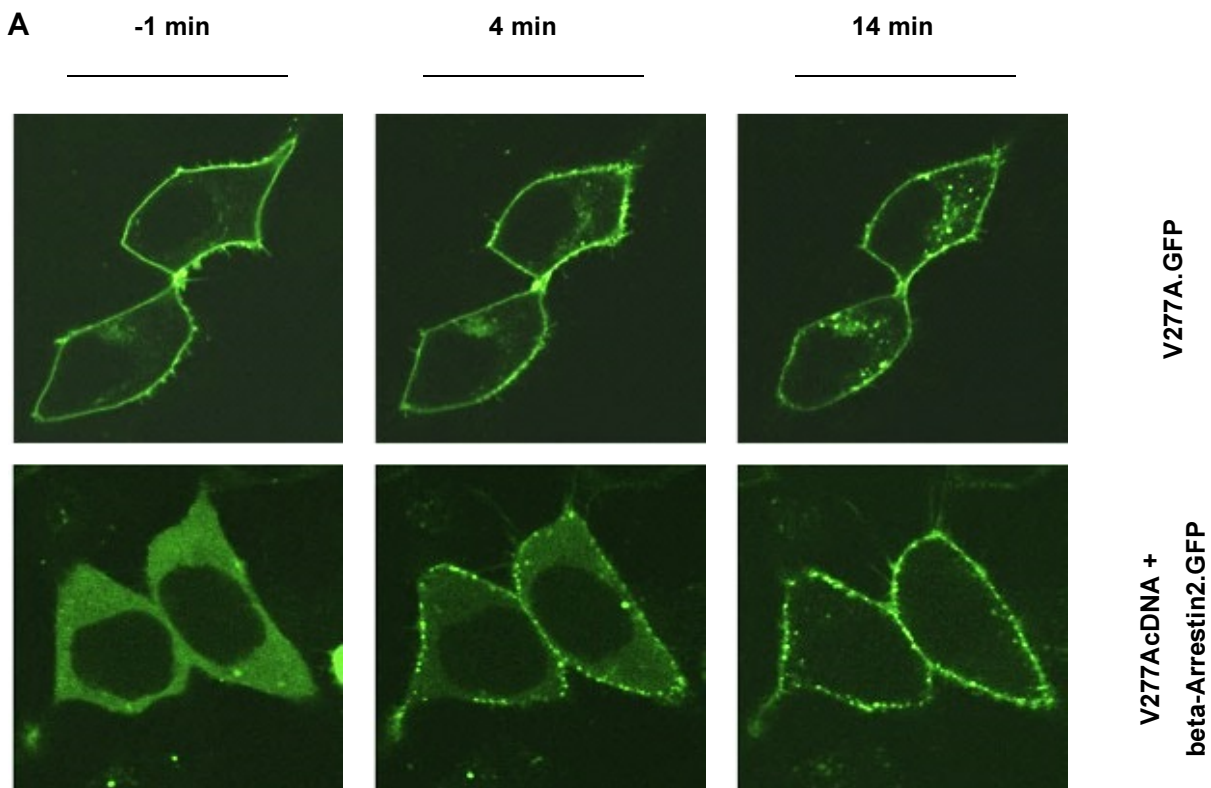
Die Anwendung der Analoga auf dem wildtypischen Rezeptor und den Rezeptormutanten fand am LSM unter den gleichen Bedingungen statt wie oben beschrieben. Angewandt auf den wildtypischen Rezeptor, wurde bei einer Dosierung von 10 μM AVP in der Wärmekammer eine Internalisierung des Rezeptors und eine Rekrutierung des β -Arrestin 2 an die Plasmamembran mit anschließender Internalisierung beobachtet (**Abb. 9**).

Alle Mutanten hingegen zeigten bei Anwendung der Analoga in selbiger Konzentration weder eine Rezeptorinternalisierung, noch eine Rekrutierung des β -Arrestin 2 an die Plasmamembran (**Abb. 9**).

4.9 Subzelluläre Verteilung der V2R Mutanten V277A und F287L

Die DNA-Sequenz beider Mutanten stammt von Patienten, welche an X-NDI leiden. Experimente haben gezeigt, dass die F287L-Mutante einen erheblichen Bindungsdefekt aufweist, aufgrund dessen auch eine deutlich gestörte Kopplung resultiert. Die V277A-Mutante hingegen hat eine mit dem V2R vergleichbare Bindungskapazität, weist jedoch im AC-Assay eine erheblich nach rechts verschobene Kurve und demnach ebenfalls ein Kopplungsdefekt auf (Schmidt, A., 2005).

Die in **Abb. 4** dargestellte Gesamtexpression der V2R Mutanten V277A und F287L ist ähnlich ausgeprägt wie die des wildtypischen Rezeptors. Im Biotinylierungsexperiment (**Abb. 6**) zeigte sich nach Rezeptor-Stimulation mit AVP eine deutliche Reduktion der Rezeptoren an der Plasmamembran, was auf eine Internalisierung selbiger schließen lässt. Die beiden Mutanten wurden ebenfalls auf ihr Expressions- und Internalisierungsverhalten untersucht. Die Konstrukte V277A.GFP oder V277A cDNA + β -Arr2.GFP und F287L.GFP oder F287L cDNA + β -Arr2.GFP wurden in HEK 293 Zellen durch transiente Transfektion exprimiert und mittels LSM dargestellt (**Abb. 10, s.u.**).



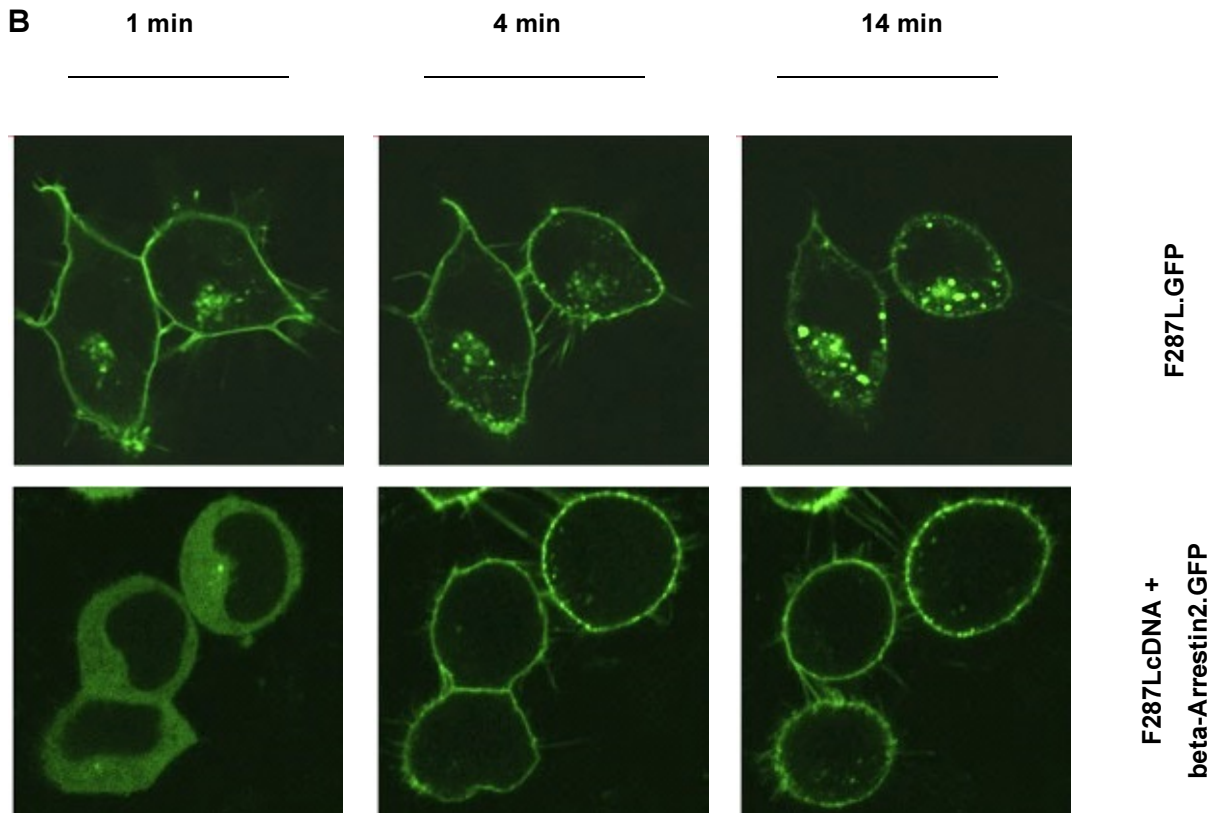


Abbildung 10 A und B: Subzelluläre Verteilung der V2R Mutanten V277A (A) und F287L (B) und β -Arrestin 2 vor und nach Stimulation mit AVP: HEK 293 Zellen wurden transient transfiziert mit V277A.GFP, V277A cDNA + β -Arr2.GFP, F287L.GFP und F287L cDNA + β -Arr2.GFP. Nach Stimulation mit AVP (beide Mutanten: je 10 μ M) zeigen die Mutanten V277A und F287L eine deutliche Internalisierung, jedoch scheint β -Arrestin 2 vor allem bei der F287L-Mutante nach Zugabe von AVP zu großen Teilen an der Plasmamembran zu verbleiben. -1 min entspricht dem Ruhezustand.

Beide Mutanten zeigen übereinstimmend mit den vorherigen Experimenten ein deutliches Expressionssignal in der Plasmamembran. Nach Stimulation mit AVP internalisieren die membranständigen Rezeptoren beider Mutanten. Im Unterschied zum V2R und allen zuvor gezeigten Mutanten scheint die F287L-Mutante nach Stimulation mit AVP β -Arrestin 2 zwar an die Plasmamembran zu rekrutieren, allerdings konnte nur eine sehr geringe Internalisierung des β -Arrestin 2 beobachtet werden (**Abb. 10 B**). Auch nach 30 min kam es weder zu einer Zunahme der Internalisierung, noch zu einer Redistribution oder Umverteilung des β -Arrestin 2, vielmehr verblieb es in Clustern an der Zellmembran (hier nicht gezeigt). Die V277A-Mutante zeigte eine ähnliche, jedoch weniger ausgeprägte Tendenz: Der Rezeptor zeigte nach Stimulation mit AVP eine deutliche Internalisierung

(**Abb. 10 A**), wohingegen β -Arrestin 2 nach Stimulation mit AVP grostenteils an der Plasmamembran verbleibt.

Um die Resultate zu verifizieren, wurden Rezeptor.CFP- und β -Arr2.YFP-Konstrukte der Mutanten ko-transfiziert. Durch anschließende Überlagerung der Signale konnte erneut eine Aussage über die Lokalisation und die Frage nach gemeinsamer oder unabhängiger Internalisierung von Rezeptor und β -Arrestin 2 gemacht werden (**Abb. 11 – 14**)

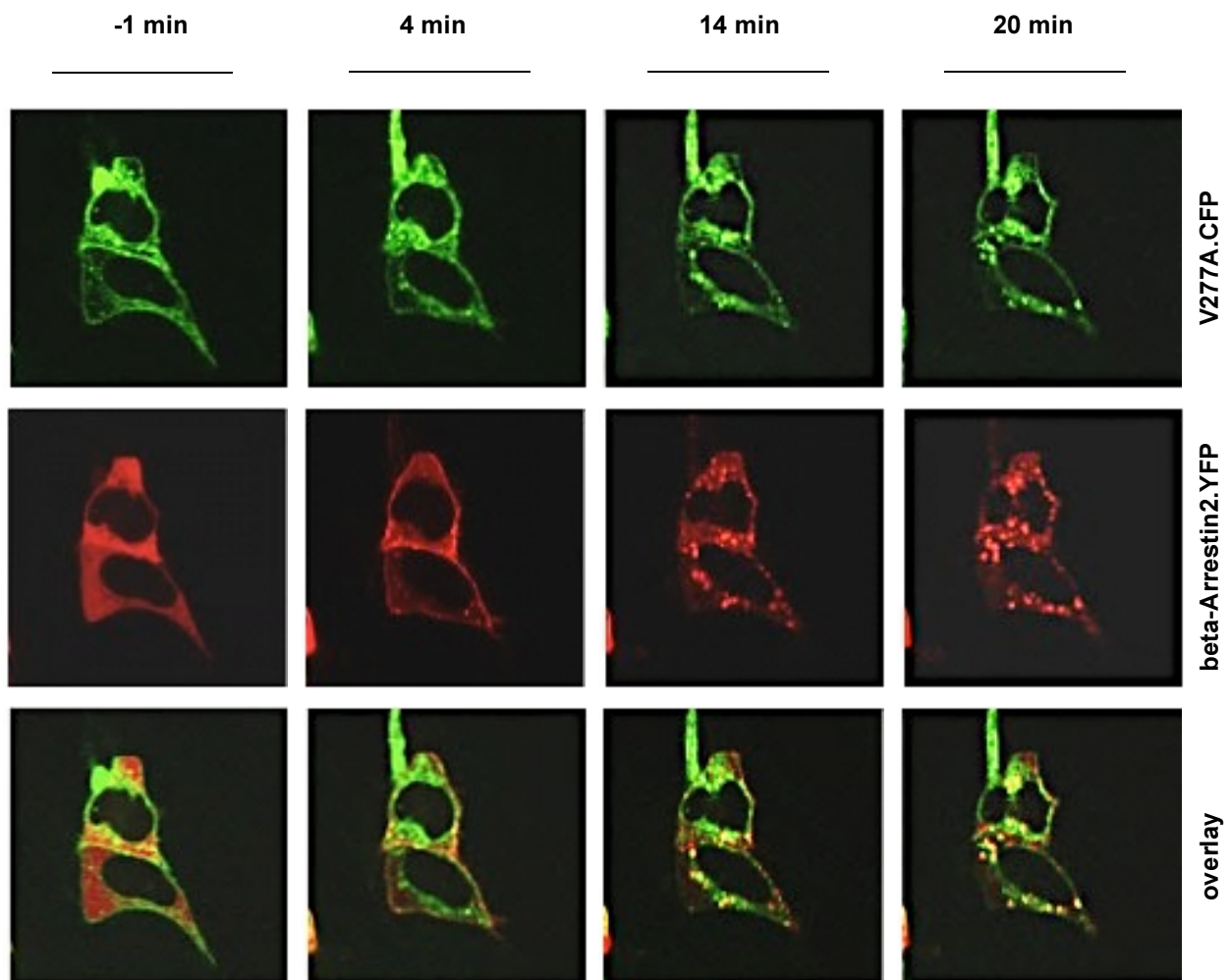


Abbildung 11: Subzelluläre Verteilung der V2R Mutante V277A und β -Arrestin 2 vor und nach Stimulation mit AVP. HEK 293 Zellen wurden transient ko-transfiziert mit V277A.CFP (grüner Kanal) + β -Arr2.YFP (roter Kanal), anschließend wurden die Bilder uberinandergelegt (overlay). Vor Stimulation mit AVP (-1 min) zeigen Rezeptor und β -Arrestin 2 die bereits bekannte Verteilung an der Plasmamembran resp. intrazellulär. Gezeigt werden Bilder 4, 14 und 20 min nach Stimulation mit AVP (hier 10 μ M). -1 Minute entspricht dem Ruhezustand. Das gelbe Signal im overlay zeigt die Ko-Lokalisation von Rezeptor und β -Arrestin 2.

Ergebnisse

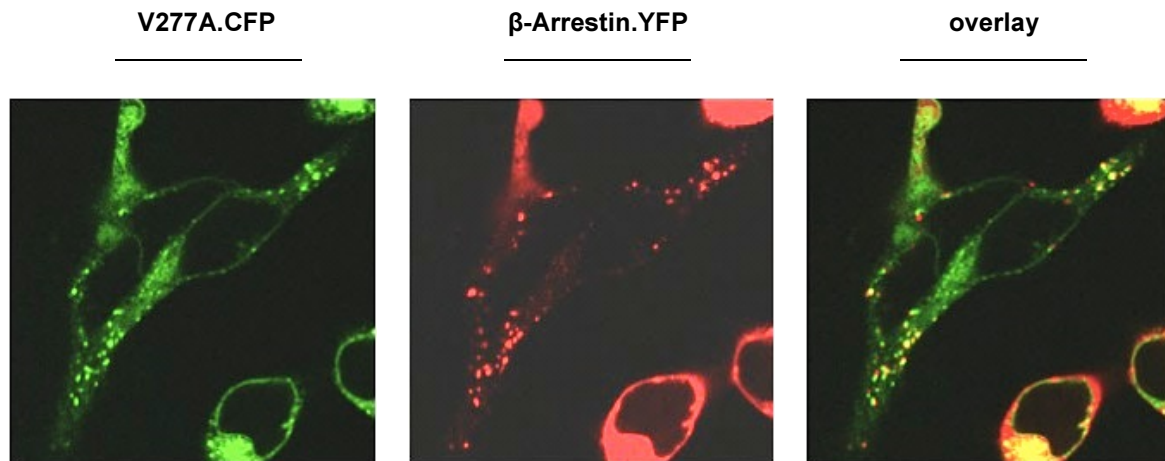


Abbildung 12: Subzelluläre Verteilung der V2R Mutante V277A und β-Arrestin2 nach Stimulation mit AVP. Einzelbild, angefertigt 20 min. nach Stimulation mit AVP (10 μM). Sowohl die Rezeptormutante wie auch β-Arrestin 2 sind internalisiert worden und zeigen im overlay eine deutliche Ko-Lokalisation (gelbes Signal).

Ergebnisse

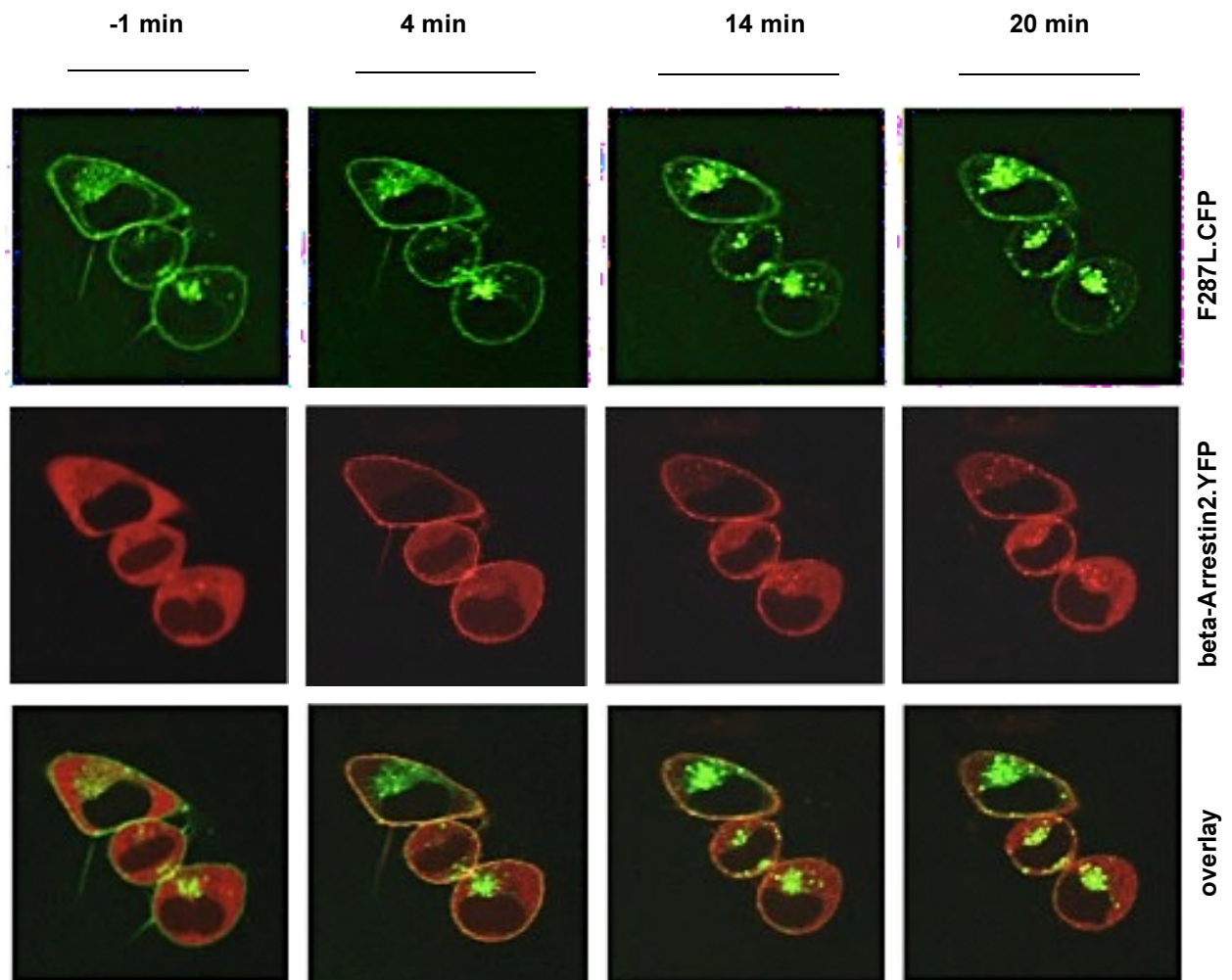


Abbildung 13: Subzelluläre Verteilung der V2R Mutante F287L und β -Arrestin 2 vor und nach Stimulation mit AVP. HEK 293 Zellen wurden transient ko-transfiziert mit F287L.CFP (grüner Kanal) + β -Arr2.YFP (roter Kanal), anschließend wurden die Bilder übereinandergelegt (overlay). Vor Stimulation mit AVP (-1 min) zeigen Rezeptor und β -Arrestin 2 die bereits bekannte Verteilung an der Plasmamembran resp. intrazellulär. Gezeigt werden Bilder 4, 14 und 20 min nach Stimulation mit AVP (hier 10 μ M). -1 Minute entspricht dem Ruhezustand. Das gelbe Signal im overlay zeigt die Überlagerung und Ko-Lokalisation von Rezeptor und β -Arrestin 2.

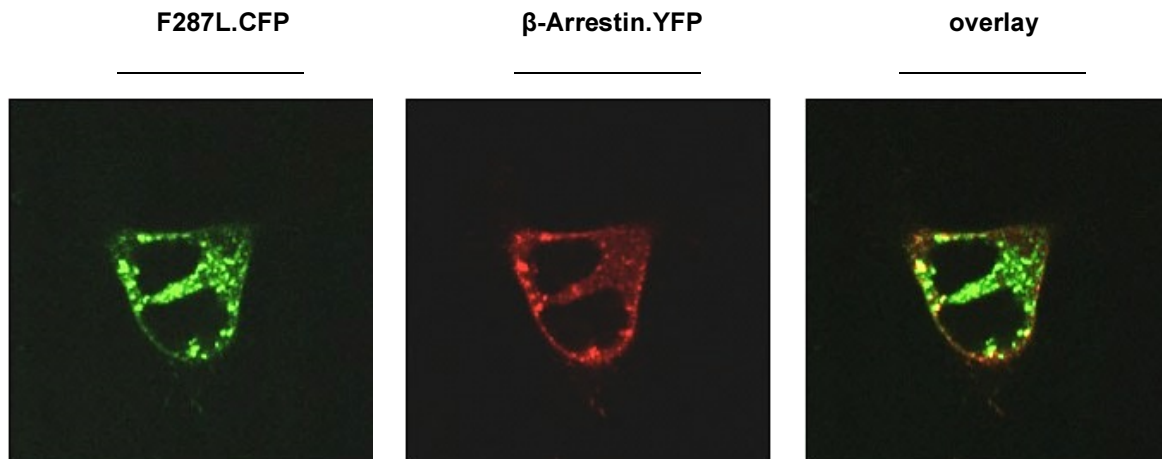


Abbildung 14: Subzelluläre Verteilung der V2R Mutante F287L und β -Arrestin 2 nach Stimulation mit AVP. Einzelbild, angefertigt 20 min. nach Stimulation mit AVP (hier: 10 μ M). Gut sichtbar ist die deutliche Internalisierung der Rezeptormutante. B-Arrestin 2 hingegen internalisiert nur teilweise, der Rest bleibt in Clustern an der Plasmamembran zurück. Die Ko-Lokalisation (gelbes Signal) scheint weniger deutlich als beim Wildtyp-Rezeptor (vergl. **Abb. 7**)

Die V277A-Mutante internalisiert zu großen Teilen gemeinsam mit β -Arrestin 2 und zeigt 20 Minuten nach Stimulation mit AVP eine ausgeprägte Ko-Lokalisation (**Abb. 11**). Das Einzelbild (**Abb. 12**), aufgenommen 20 Minuten nach Stimulation mit AVP, verdeutlicht diesen Eindruck und erinnert an die Abbildungen des V2R in **Abb. 7**.

Ein weniger eindeutiges Bild zeigt die F287L-Mutante in **Abb. 13** und **14**. Anhand der hier gezeigten LSM-Bilder scheint sich der Eindruck des veränderten Internalisierungsmusters der F287L-Mutante im Vergleich zum V2R bestätigen. Während die Rezeptormutante F287L deutlich internalisiert, wird das β -Arrestin 2 an die Plasmamembran rekrutiert und verbleibt zu großen Teilen auch dort. Ein geringerer Teil des β -Arrestin 2 scheint in die Zelle zu internalisieren und ko-lokalisiert hier deutlich weniger mit dem Rezeptor als man es beim V2R beobachten konnte (vergl. **Abb. 7** und **Abb. 13, 14**).

5 Diskussion

5.1 X-chromosomaler NDI

Beim X-chromosomalen NDI (X-NDI) führen Mutationen im Bereich des *AVPR2* zu dessen Funktionslosigkeit. Ursache der Inaktivierung kann sowohl die fehlerhafte Transkription, Synthese der Rezeptoren, ihre intrazelluläre Prozessierung und ihr Transport, die defiziente Bindung von AVP sowie eine gestörte Signaltransduktion sein. Die meisten Mutationen im Bereich des Rezeptor-Gens führen zu fehlgefalteten Rezeptoren, welche in verschiedenen intrazellulären Kompartimenten retiniert werden. Hierbei spielt das intrazelluläre Qualitätskontrollsystem (QCS) eine wesentliche Rolle. Das QCS der Zelle besteht aus Proteinen, u.a. Chaperone und Enzyme, die größtenteils im ER, aber auch im ER/Golgi-intermediate compartment (ERGIC) sowie im Golgi-Apparat lokalisiert sind. Es ermöglicht in der Regel nur korrekt gefalteten Membranproteinen eine Reifung im sekretorischen intrazellulären Signalweg und den Transport zum endgültigen Wirkungsort, z.B. der Plasmamembran. Nur wenige krankheitsauslösende V2R Mutanten werden durch das Qualitätskontrollsystem der Zelle nicht retiniert, sondern erreichen die Plasmamembran und werden dort exprimiert. Hier weisen sie, obwohl ihrem natürlichen Liganden AVP zugänglich, eine verminderte Funktion oder kompletten Funktionsverlust auf.

Das Ziel dieser Arbeit war eine Charakterisierung einiger plasmamembranständiger X-NDI-auslösender Patientenmutanten bezüglich ihrer Prozessierung, Lokalisation, Internalisierung und Signalgebung. Des Weiteren wurden ausgewählte V2R-Mutanten mit synthetischen AVP-Analoga stimuliert, wobei deren Fähigkeit, eine Rezeptorinternalisierung auszulösen, überprüft wurde.

5.2 Die zelluläre Lokalisation und Expression des V2R und seiner Mutanten

Mit Hilfe von Membranpräparationen wurde die Gesamtexpressionen und der Glykosilierungsstatus sowohl des V2R wie auch der aus X-NDI-Patienten isolierten V2R Mutanten L44F, G185C, R202C, V277A und F287L semi-quantitativ dargestellt. Es ergaben sich sowohl beim V2R wie auch bei allen beschriebenen Mutanten zwei

immunreaktive Banden bei 75-80 und 65-70 kDa. Zur Charakterisierung der Rezeptor-Banden in der Membranpräparation wurde ein enzymatischer Verdau mit Glykosidasen durchgeführt.

Es ist bekannt, dass der V2R während der intrazellulären Rezeptorsynthese im sekretorischen Transportweg eine Reifung durchläuft, wobei er sowohl im endoplasmatischem Retikulum wie auch im Golgi-Apparat prozessiert wird und posttranslational modifiziert wird (Glykosylierung, Disulfidbrückenbildung, Palmytoylierung) (Sadeghi et al. 1997). Durch den enzymatischen Verdau der Rezeptoren mit Hilfe der Glykosidasen EndoH und PNGaseF konnten die immunreaktiven Banden zugeordnet werden. EndoH spaltet ausschließlich N-glykosidisch gebundene Glykoproteine vom Mannose-reichen Typ (kernglykosylierter Rezeptor), welche vor dem Erreichen des Golgi-Apparats angehängt werden. PNGaseF spaltet alle N-glykosidisch gebundenen Seitenketten (Mannose-reiche, komplexe und hybride Glykosylierungen), jedoch nicht die O-Glykosylierung, welche im Golgi-Apparat stattfindet. Von den zwei immunreaktiven Banden entspricht die Untere bei 65-70 kDa dem kernglykosylierten Rezeptor, die obere Bande bei 75-80 kDa dem komplex-glykosylierten Rezeptor, welcher im Golgi-Apparat prozessiert wurde und ein höheres Molekulargewicht aufweist, da er zusätzlich O-Glykosylierungen besitzt (siehe **Abb. 5**). Alle hier untersuchten Rezeptormutanten werden wie der V2R im ER und Golgi-Apparat prozessiert und erreichen durch ihre Faltung eine Transportkompetenz, da sie als reife, membranständige Rezeptoren nachweisbar sind, welche jedoch NDI auslösen. Demnach liegt die Ursache der Erkrankung nicht in einer fehlenden Plasmamembranexpression der Mutanten, sondern in einem Liganden-Bindungsdefekt und / oder Kopplungsdefekt auf Ebene der Signaltransduktion.

Die Kenntnis des Glykosylierungsstatus des Wildtyps und der Mutanten erlaubt jedoch keine Aussage über die tatsächliche Oberflächenexpression der Rezeptoren, sie dient lediglich dem Beweis einer intrazellulären Rezeptorprozessierung und Reifung. Die Expression an der Plasmamembran ermöglicht die Erreichbarkeit des Rezeptors für seine endogenen oder exogenen Liganden. AVP gilt als der wichtigste endogene Ligand, als Agonist des humanen V2R (hV2R). Die AVP-V2R-Interaktion führt nicht nur zur Rezeptorstimulation sondern auch zu seiner Aktivierung im Sinne von Internalisierung, Initiierung von Signaltransduktionen und Rezeptor-Desensibilisierung.

Zum Beweis einer Plasmamembranexpression und Fähigkeit zur Internalisierung der V2R Mutanten V277A und F287L wurde eine Biotinylierung der plasmamembranständigen Proteine vor und nach Stimulation mit AVP an intakten Zellen durchgeführt. In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die F287L-Mutante an der Plasmamembran von HEK 293-Zellen exprimiert wird, aber einen AVP-Bindungsdefekt aufweist (K_d 92,3 nM). Im AC-Assay zeigten beide Mutanten eine erhöhte EC_{50} (F287L.GFP = 388 +/- 45,3 nM > V277A.GFP = 368 +/- 94,2 nM; Kontrolle: V2R.GFP = 1,98 +/- 0,52 nM). Bei der V277A-Mutante besteht demnach eher ein Kopplungsdefekt, da ihre Affinität zu AVP im Vergleich zum V2R nur leicht erniedrigt ist (K_d V2R: 5,3 nM, K_d V277A: 22,2 nM). Bezüglich der F287L-Mutante ist eine eindeutige Zuordnung, wie bereits bei der V277A-Mutante beschrieben, nicht möglich. Aufgrund des erheblichen Bindungsdefekts kann keine sichere Aussage über eine suffiziente G-Protein-Kopplung gemacht werden, da eine defekte Bindung im AC-Assay ebenfalls zu einer Abnahme der zellulären cAMP-Aktivierung führt (Schmidt, A. 2005; Chen et al., 2002).

Im Biotinylierungsexperiment konnte gezeigt werden, dass es nach Stimulation mit AVP beim V2R und bei beiden Mutanten V277A und F287L zu einer deutlichen Abnahme plasmamembranständiger Rezeptoren kam (**Abb. 6**). Aufgrund des ausgeprägten Bindungsdefekts der F287L-Mutante wurde eine maximale AVP Konzentration eingesetzt (100 μ M). Es konnte ein direkter Zusammenhang zwischen AVP-Gabe und Rezeptorinternalisierung im Sinne einer semi-quantitativen Abnahme der Rezeptoranzahl auf der Plasmamembran nach AVP-Gabe nachgewiesen werden. Selbst die F287L-Mutante, welche einen Bindungs- und vermutlich auch Kopplungsdefekt aufweist, zeigte hier ebenfalls eine deutliche Internalisierung nach maximaler AVP-Stimulation (**Abb. 6**).

Weitere Befunde bezüglich zellulärer Verteilung und Internalisierung der Rezeptoren ergaben sich durch die konfokale Laser Scanning Mikroskopie. Mit Hilfe eines Rezeptor-GFP-Fusionsproteins gelang es, die zelluläre Lokalisation eines Rezeptors sowohl im Ruhezustand als auch nach Stimulation mit AVP oder anderen potentiellen Liganden (Agonisten, partiellen Agonisten oder Antagonisten) zu visualisieren. Ein Vorteil dieser Methode ist die Darstellung der Rezeptoren an lebenden Zellen über mehreren Stunden mit entsprechenden Vorrichtungen, sodass auch nach Liganden-Stimulation die Rezeptorinternalisierung beobachtet werden kann. Neben der direkten Sichtbarmachung

der Rezeptoren besteht ebenfalls die Möglichkeit, weitere an der Internalisierung beteiligte Proteine als GFP-Fusionsproteine zu visualisieren.

Der hV2R als GFP-Fusionsprotein, wie auch alle anderen hier untersuchten V2R Mutanten, zeigten ohne Ligandenstimulation (Kontrollbedingungen) unter dem Laser Scanning Mikroskop vor allem eine plasmamembranständige Verteilung (**Abb. 7**), wodurch die o.g. Biotinylierungsexperimente bestätigt werden konnten. Geringe GFP-Signale waren ebenfalls intrazellulär detektierbar, wobei es sich hier vermutlich um transportkompetente Rezeptoren auf dem Weg zur Plasmamembran sowie um intrazelluläre Akkumulationen von Rezeptoren handeln könnte, die konstitutiv internalisiert worden sind (Schmidt, A. 2005). Wie erwartet, kommt es nach Stimulation mit 1 μM AVP des V2R zu einer deutlichen Internalisierung des Rezeptors mit konsekutiver Abnahme des GFP-Signals an der Plasmamembran (**Abb. 7**). Nach Stimulation der Patientenmutationen mit AVP wurden hingegen unterschiedliche Ergebnisse erhoben. Die V2R Mutanten V277A und F287L zeigten bei steigenden Konzentrationen von AVP eine eindeutige konzentrationsabhängige Rezeptorinternalisierung (**Abb. 10 - 14**), was wiederum die erhobenen Ergebnisse der Biotinylierungsexperimente bestätigt. Interessanterweise ist ein solcher Grad an Internalisierung nicht bei den anderen untersuchten V2R Mutanten L44F, G185C und R202C trotz maximaler Konzentration von AVP (bis 100 μM) wiederzufinden. L44F und R202C zeigten bei Einsatz höchster AVP Konzentration (100 μM) allenfalls eine sehr schwache Rezeptorinternalisierung, welche bei der G185C-Mutante nicht nachweisbar war (**Abb. 8**).

5.3 Bindungsmodell der V2R Mutanten

Anhand von Bindungsexperimenten konnten Schülein et al. bezüglich der G185C- und R202C-Mutante einen Bindungsdefekt nachweisen (Schülein et al. 1999 und 2000). In einem 3-D-Modell des V2R (Oksche et al., 2002, Schülein et al., 2000) wird unterschieden zwischen einer großen Bindungstasche, gebildet aus den Transmembrandomänen 3, 4, 5 und 6 sowie der zweiten extrazellulären Schleife und einer kleineren Bindungstasche aus den Transmembrandomänen 2, 3 und 7 mit Teilen der extrazellulären Schleife 1, 2 und 3. In diesem Modell liegt Cystein 192 an der Spitze der langen zweiten extrazellulären Schleife und damit an exponierter Position, um potentielle neue Disulfidbrücken zu bilden.

In Bezug auf die V2R Mutanten G185C und R202C könnte die zusätzliche Cystein-Mutation zur beschriebenen Disulfidbrücke mit Cystein192 führen, ohne die bereits bestehende und in der Familie der GPCR konservierte Disulfidbrücke zwischen Cys-112 und Cys-192 zu zerstören. Diese Konstellation führt möglicherweise zum Verschluss der Bindungstasche für AVP, woraus der beschriebene Bindungsdefekt resultieren könnte. Die unter dem LSM erhobenen Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Theorie dieses Modells.

Oksche et al. fanden in einem Vergleich zwischen dem murinen V2R (mV2R) und dem humanen V2R (hV2R) heraus, dass der mV2R neben deutlich höherer Bindungsaffinität zu AVP mit korrespondierenden niedrigeren EC_{50} -Werten eine veränderte zelluläre Verteilung des Rezeptors aufweist. Die Verteilung der Rezeptoren an der Plasmamembran (hV2R) resp. intrazellulär (mV2R) hängt ausschließlich mit einer Aminosäure an Position 100 an der Grenze zwischen der 2. Transmembrandomäne und der 1. extrazellulären Schleife zusammen. Im Falle des mV2R entspricht dies der negativ geladene Aminosäure Aspartat (N100), beim hV2R dem positiv geladene Lysin (K100). In einem theoretischen Modell des hV2R wird spekuliert, dass das positiv geladene Lysin zur Stabilisierung der Rezeptorkonformation Wasserstoffbrückenbindungen mit Aminosäuren an definierten Positionen eingeht. Bezüglich des mV2R sind solche Wasserstoffbrückenbindungen zur Stabilisierung des Rezeptors aufgrund des negativ geladenen Aspartats nicht denkbar (Oksche et al. 2002).

Das Experiment beweist, dass bereits der Austausch einer einzigen Aminosäure an empfindlicher Position eine signifikante (Konformationsänderung)-Änderung bedeuten kann, welche z.B. aufgrund einer fehlerhaften Faltung des Rezeptorproteins zu einer veränderten Plasmamembranexpression führen kann. Eine ausschließlich intrazelluläre Verteilung des Rezeptors muss jedoch nicht zwangsläufig zu dessen Funktionslosigkeit führen, wie der mV2R beweist. Bezüglich der L44F Mutante würde der Austausch zwischen Leucin zu Phenylalanin zu einem Austausch zwischen einer α -Aminosäure und einer aromatische Aminosäure führen. Leucin an Position 44 in der ersten Transmembrandomäne liegt nahe dem Bereich der hypothetischen Wasserstoffbrückenbindung zwischen Glutamat 40 und Lysin 100. Der Aromat Phenylalanin an Position 44 könnte möglicherweise ebenfalls eine hypothetische

Konformationsänderung auslösen, welche die Rezeptoreigenschaften nachhaltig beeinflussen kann. In Experimenten ergab die Patientenmutante L44F weder im Bindungs- noch im AC-Assay eine Restaktivität, sodass die Mutante als nicht funktionell klassifiziert wurde (Oksche et al. 1995). In dieser Arbeit wurde bei Einsatz von hohen Konzentrationen von AVP (100 μ M) eine Restaktivität im Sinne einer Internalisierung nachgewiesen. Demnach besteht eine gewisse Restaffinität zu AVP, die erst bei hohen Konzentrationen nachweisbar ist. Ob eine Aktivierung des Rezeptors bei diesen hohen AVP-Konzentrationen auch erfolgt, wurde jedoch nicht untersucht und bleibt somit offen.

5.4 Peptidische Analoga am V2R und seinen Mutanten

Die drei V2R Mutanten L44F, G185C und R202C weisen alle einen Bindungsdefekt bezüglich AVP auf, sind jedoch aufgrund ihrer hier gezeigten Lokalisation an der Plasmamembran potentiellen Liganden zugänglich, was eine große therapeutische Chance bedeutet.

AVP ist ein cyclisches Nonapeptid, welches im Hypothalamus gebildet wird und fungiert als physiologischer Ligand am hV2R. Für diese Arbeit wurden peptidische Analoga untersucht, welche sich entweder nur in einer rechts- oder linksdrehenden Aminosäure vom AVP unterscheiden oder eine fast komplett veränderte Struktur im Sinne von künstlichen Aminosäuren aufwiesen. Bei einigen peptidischen Liganden blieb die physiologische Disulfidbrücke zwischen Position 1 und 6 erhalten, wohingegen sie in zwei anderen fehlte. Die Struktur eines Nonapeptids wurde hingegen beibehalten (**Abb. 9**). Am bekanntesten ist beispielsweise das synthetische Analogon Deamino-Desmopressin (DDAVP), welches ein rechtsdrehendes Arginin an Position 8 aufweist. DDAVP wird als Medikament beim zentralen Diabetes Insipidus genutzt als Substitution für AVP. Des Weiteren wird DDAVP bei dem von-Willebrand-Jürgens-Syndrom eingesetzt, weil es die V2R-vermittelte Plasmakonzentration des von-Willebrand-Faktors erhöht und somit die Hämostase verbessert (Kaufmann et al. 2000). DDAVP wurde in dieser Arbeit jedoch nicht als peptidischer Agonist untersucht. Das Ziel war es zu klären, ob diese peptidischen Analoga in der Lage sind, die AVP-bindungsdefekten Mutanten zu stimulieren und eine Internalisierung auszulösen. Diese Liganden könnten somit als potentielle Therapeutika für

die hier untersuchten Mutanten fungieren und möglicherweise auch bei anderen V2R Mutanten eingesetzt werden.

Alle Analoga wurden zunächst am wildtypischen Rezeptor getestet und führten zur Internalisierung des V2R. Nach Stimulation der Mutanten L44F, G185C oder R202C konnte unter dem LSM gezeigt werden, dass es zu keiner sichtbaren Internalisierung durch die peptidischen Analoga kam, wobei hier ebenfalls hohe Analoga-Konzentrationen von bis zu 10 μM verwendet wurden (**Abb. 9**). In Bezug auf die genutzten peptidischen Analoga kann davon ausgegangen werden, dass keines von ihnen in der Lage war, an die V2R Mutanten hinreichend zu binden um eine Internalisierung auszulösen; oder dass sie zwar gebunden haben, aber nicht die korrekte Rezeptorkonformation vorlag um eine Internalisierung auszulösen. Um diese Hypothesen zu bestätigen, wäre sowohl ein Bindungs-Assay sowie ein AC-Assay nach Stimulation mit peptidischen Analoga vs. AVP denkbar, welche in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt wurden.

Bei Bindung von AVP an den V2R kommt es u. a. zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, sodass verschiedene Signalwege initiiert werden. Es ist denkbar, dass die verwendeten Analoga sowohl aufgrund ihrer Größe und / oder der strukturellen Ähnlichkeit zu AVP die bindungsdefekten V2R Mutanten nicht stimulieren konnten. Sollte die Bindungstasche der G185C- und R202C-Mutante tatsächlich durch eine weitere Disulfidbrücke verkleinert sein, benötigt man zum Beispiel kleinere Moleküle, welche in die Bindungstasche hineinpassen könnten. Keines der vorliegenden AVP-Analoga scheint klein genug um in die Bindungstasche zu passen und weist somit womöglich nur geringe oder keine Affinität zu den untersuchten V2R Mutanten auf.

Auf der Suche nach passenden Agonisten für plasmamembranständige V2R Mutanten ist jedoch nicht nur die Rezeptorbindung entscheidend, sondern ebenfalls eine suffiziente Rezeptor-G-Protein-Kopplung. Eine Aktivierung der entsprechenden Signalkaskaden und konsekutive Translokation von AQP2 in die apikale und basolaterale Plasmamembran zur Wasserrückresorption ermöglicht erst den gewünschten therapeutischen Effekt beim X-chromosomalen NDI. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit nur durch eine bestimmte Rezeptorkonformation möglich, die im Fall des hV2R durch AVP und einigen AVP-Analoga erreicht wird. Bezüglich der X-NDI-auslösenden V2R Mutanten ist offen ob eine solche Rezeptorkonformation überhaupt durch ein Molekül induzierbar ist. Ferner ist es auch

wahrscheinlich, dass jede Mutante ein etwas anderes Molekül braucht, um die cAMP-Signalkaskade zu stimulieren, was eine sehr individuelle Lösung für jeden Patienten bedeutet und damit ein sehr unattraktives Forschungsziel (developable target) für die forschende Pharmaindustrie darstellt.

5.5 Die Funktion von β -Arrestin als Gerüstprotein

Neben der direkten Darstellung der Rezeptoren unter dem LSM wurde als weiteres Protein β -Arrestin 2 untersucht. β -Arrestine spielen eine wichtige Rolle bezüglich Rezeptorinternalisierung, -Desensitivierung, -Down-Regulierung und Resensitivierung. Des Weiteren agieren sie als Gerüstproteine für die Clathrin-abhängige Rezeptorendozytose und vermitteln Signaltransduktion (Luttrell et al. 2002). In der Literatur ist beschrieben, dass der V2R als Klasse-B-Rezeptor nach AVP-Stimulation zusammen mit β -Arrestin 2 internalisiert, wobei die Bindung zwischen Rezeptor und β -Arrestin 2 bestehen bleibt bis der Rezeptor recycelt oder abgebaut wird. Die lange Bindung zwischen Rezeptor und β -Arrestin 2 führt zu einem langsameren Recycling des Rezeptors. (Lefkowitz et al. 2005).

In dieser Arbeit wurde neben einer alleinigen Darstellung des β -Arrestin 2 als GFP-Konstrukt ebenfalls ein Rezeptor-CFP-Fusionsprotein mit β -Arrestin2.YFP nach transientser Co-Transfektion untersucht. Somit war sowohl die isolierte Darstellung des β -Arrestin 2 als auch dessen Interaktion mit den Rezeptoren gleichzeitig möglich. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen in Übereinstimmung mit der Literatur, dass im Ruhezustand β -Arrestin 2 zytoplasmatisch verteilt ist, wohingegen die V2R überwiegend an der Plasmamembran exprimiert werden (**Abb. 7**). Nach Stimulation des Rezeptors kommt es innerhalb von Sekunden zu einer Rekrutierung des β -Arrestin 2 an die Plasmamembran und zu einer anschließenden Internalisierung. Bezüglich des V2R ergibt sich nach Stimulation mit AVP in der Überlagerung der Bilder von V2R.CFP und β -Arrestin2.YFP eine deutlich sichtbare Ko-Lokalisation (**Abb. 7**) beider Fluoreszenzsignale. Selbiges Ergebnis konnte für die V277A-Mutante gezeigt werden (**Abb. 10 A, 11 + 12**). Unterschiede bezüglich Rezeptor / β -Arrestin 2 - Ko-Lokalisation ergaben sich bei der F287L-Mutante: Nach Stimulation mit 10 μ M AVP kam es zu einer ausgeprägten β -Arrestin 2-Rekrutierung und Rezeptorinternalisierung, jedoch mit deutlich verringerter Ko-Lokalisation von Rezeptormutante und β -Arrestin 2. Auch wenn β -Arrestin 2 an die

Plasmamembran rekrutiert wurde, findet sich eine weitaus weniger ausgeprägte intrazelluläre Clusterbildung. Hierbei war die Ko-Lokalisation der F287L-Mutante und β -Arrestin 2 im Vergleich zum V2R oder der V277A-Mutante deutlich schwächer (**Abb. 10 B, 13 + 14**).

Diese Arbeit beschreibt erstmalig eine mangelnde Ko-Internalisierung der F287L-Mutante mit β -Arrestin 2 (**Abb. 13 + 14**). Diesbezüglich scheint sich die F287L-Mutante wie ein „Klasse-A-Rezeptor“ zu verhalten, dessen Charakteristik eine nur flüchtige Bindung zwischen β -Arrestin und Rezeptor ist. Um diese Hypothese zu verifizieren, wären z.B. Co-Immunopräzipitationen des Rezeptor- β -Arrestin Komplexes über die Zeit nach Rezeptorstimulation nötig, welche hier nicht durchgeführt wurden.

Bei einer nur flüchtigen Bindung von β -Arrestin an den Rezeptor mit rascher Dissoziation des Komplexes nach Internalisierung, wie bei Klasse-A-Rezeptoren beschrieben, ist die Voraussetzung für eine schnelle Rückkehr der Rezeptoren an die Plasmamembran gegeben. Dies würde eine schnellere Verfügbarkeit der Rezeptoren an der Plasmamembran ermöglichen mit ggf. erneuter Aktivierung. Ein Recycling der F287L-Mutante konnte jedoch innerhalb des relativ kurzen beobachteten Zeitraumes (bis 30 min., hier nicht gezeigt) nicht nachgewiesen werden. Somit kann diese Mutante zunächst nicht als Klasse-A Rezeptor bezeichnet werden und zeigt, dass eine transiente Bindung von β -Arrestin nicht ausreichend für ein schnelles Recycling (innerhalb von 30 min.) des Rezeptors ist. Sehr wahrscheinlich wird die F287L-Mutante nicht schnell genug dephosphoryliert um ein Recycling zu induzieren (Innamorati et al. 2001). Jedoch scheint die flüchtige Bindung von β -Arrestin 2 an die Mutante ausreichend für eine Interaktion mit Clathrin, da eine Rezeptorinternalisierung nachgewiesen werden konnte (**Abb. 10 B**).

Die Bedeutung von β -Arrestinen bezüglich Internalisierung, Downregulierung und Signalgebung beim V2R ist bereits mehrfach untersucht worden (Ren et al. 2005). β -Arrestin 2 dient als Gerüstprotein für unterschiedliche Signaltransduktionswege. Einer dieser intrazellulären Signalwege ist die durch MAP-Kinasen (Mitogen-aktivierte Kinasen = MAPK) vermittelte Stimulation unterschiedlicher zellulärer Prozesse. Die MAPK sind eine Familie aus evolutionär konservierten Serin- und Threoninkinasen, welche durch Vermittlung externer Signale Zellwachstum und Zellteilung, Differenzierung und Apoptose regulieren. Der V2R kann die MAPK ERK1/2 (Extracellular-signal Regulated Kinasen) über

zwei voneinander unabhängige Wege aktivieren: G_s triggert hauptsächlich eine frühe ERK-Aktivierung, während β -Arrestin 2 hauptsächlich eine späte Aktivierung induziert. Der Umfang der vom V2R vermittelten ERK-Aktivierung hängt ebenfalls von den Kinasen ab, welche den Rezeptor phosphorylieren (Ren et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden diese Signalwege nicht untersucht. Denkbar wäre jedoch, dass es aufgrund der verminderten Rezeptor / β -Arrestin 2 - Internalisierung und Ko-Lokalisation zu einer veränderten Signalgebung kommen könnte, zum Beispiel in Form einer reduzierten MAPK-Aktivierung.

Ferner deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass der mutierte V2R auch ohne eine G-Proteinkopplung und anschließender cAMP-Signaltransduktion eine Rekrutierung der Internalisierungsmaschinerie auslösen kann; möglicherweise in Zusammenhang mit einem bestimmten Faltungszustand des Rezeptors. Es scheint, dass jede Funktion, die der V2R ausüben kann, durch eine bestimmte Rezeptorkonformation hervorgerufen wird, wobei der wildtypische Rezeptor alle effektauslösenden Konformationen erreichen kann und mutierte Rezeptoren nur einige wenige.

5.6 NDI: Therapeutische Optionen

Es existieren unterschiedlich starke Ausprägungen des NDI, jedoch kann anhand des klinischen Erscheinungsbildes aufgrund der Vielfältigkeit potentieller Mutationen nicht auf eine bestimmte Mutation oder die Genese rückgeschlossen werden. Die derzeitige Behandlung des X-chromosomalen NDI ist unbefriedigend und häufig unzureichend. Neben einer ausreichenden Flüssigkeitszufuhr, welche lebensnotwendig ist, erfolgt eine salz- und proteinarmen Diät sowie die Gabe von Thiaziddiuretika und Cyclooxygenase-Inhibitoren. Thiaziddiuretika bewirken eine Reduktion des Urinvolumens vermutlich durch erhöhte Natriumreabsorption im proximalen Tubulus mit konsekutiv erhöhter Wasserreabsorption. Gelegentlich werden Thiaziddiuretika auch mit Kalium-sparenden Diuretika wie Amilorid kombiniert. Cyclooxygenase-Inhibitoren wie Indometacin bewirken u. a. durch eine Hemmung der Prostaglandinsynthese eine Abnahme des medullären Blutflusses und bewirken über eine Abnahme der GFR eine Verminderung der Wasserausscheidung (Oksche et al. 1997, Lentze et al. 2003).

5.6.1 Anwendung von V2R-Antagonisten und -Agonisten bei intrazellulär retinierten Mutanten

Bezüglich des X-NDI wird der Großteil der Mutanten aufgrund von Fehlfaltung weiterhin intrazellulär retiniert, nur eine Minderheit erreicht die Plasmamembran. Mittlerweile wurde gezeigt, dass einige intrazellulär retinierten Mutanten mit Hilfe von V2R-Antagonisten, sogenannten Pharmakochaperonen, soweit stabilisiert werden konnten, dass ein Transport an die Plasmamembran möglich war (Morello et al., 2000). Hier wären sie sowohl ihrem physiologischen Liganden AVP wie auch weiteren potentiellen Substanzen zugänglich. Diesbezüglich wurde von Bernier et al. eine vielversprechende Phase II Studie mit dem nicht-peptidischen V_{1A}R-Antagonisten SR49059 an Patienten mit X-NDI durchgeführt, wobei deren Genmutationen im *AVPR2* charakteristischerweise zu einer intrazellulären Rezeptor-Retention führten. Durch Einsatz des Rezeptor-Antagonisten wurden die intrazellulär retinierten Mutanten vermutlich soweit stabilisiert, sodass diese durch das QCS der Zelle an die Plasmamembran rekrutiert werden konnten. Neben vielversprechenden Ergebnissen bezüglich Abnahme der Urin-Ausscheidung und Erhöhung der Urin-Osmolalität ergab sich im weiteren Verlauf der Verdacht einer Beeinflussung des Cytochrom-P450-Systems, sodass die Studie abgebrochen werden musste (Bernier et al. 2006).

Neben einem Transport zur Plasmamembran zur dortigen Aktivierung durch einen Liganden ist ebenfalls ein anderer Ansatz denkbar: Robben et al. gelang es, 6 intrazellulär retinierte Mutanten mit Hilfe des V2R-Antagonisten OPC-51 sowie mit zwei neuartigen peptidischen V2R-Agonisten (VA88 und VA89) zu stimulieren und einen suffizienten cAMP-Anstieg sowie eine Translokation von AQP2-Vesikeln an die apikale Plasmamembran auszulösen. Dabei wurden die V2R Mutanten nicht an die Plasmamembran rekrutiert, sondern wurden direkt in den retinierten intrazellulären Kompartimenten, d.h. in diesem Fall dem ER, aktiviert (Robben et al. 2009). Inwieweit dieser Ansatz eine therapeutische Option verspricht, erfordert noch weitere Untersuchungen.

In diesem von Robben et al. beschriebenen seltenen Fall konnte bei sechs Mutanten durch die gleichen Substanzen ähnliche Effekte nachgewiesen werden. Der therapeutische Ansatz der nicht-peptidischen Agonisten scheint den Pharmakochaperonen (nicht-

peptidische Antagonisten) in diesem Fall überlegen zu sein, da es gelungen ist, intrazellulär retinierte Mutanten direkt zu aktivieren. Die Notwendigkeit einer intrazellulären Stabilisierung und Rekrutierung an die Plasmamembran wurde dadurch umgangen (Los et al. 2010).

Die hier beschriebenen Erfolge bezüglich Plasmamembranrekrutierung durch V2R-Antagonisten oder direkte, intrazelluläre Aktivierung der Rezeptormutanten konnten bisher jedoch nur an einigen wenigen V2R Mutanten gezeigt werden. Es wird ebenfalls deutlich, dass der Schritt von einem Funktionsnachweis in vitro zu einer funktionalen und verträglichen Therapie in vivo langwierig, kostenaufwendig und sehr risikobehaftet ist.

5.6.2 Neue Anwendung von V2R-Antagonisten bei SIADH

Gegenteilig zum Diabetes insipidus ist das Syndrom der inadäquaten Antidiurese (SIADH = syndrome of inappropriate ADH-secretion (ADH = antidiuretic hormone = AVP)) welches eine Dysbalance im Wasserhaushalt beschreibt. Die Ursachen sind endogener, exogener oder idiopathischer Genese; pathophysiologisch kommt es zu einer gesteigerten Rückresorption von Wasser mit konsekutiver hypotonen Hyponatriämie im Rahmen eines Verdünnungseffektes. Eine ektope Produktion von AVP, z.B. beim kleinzelligen Bronchialkarzinom, kann bekanntermaßen zu SIADH führen (Esposito et al., 2011). Mittlerweile besteht eine offizielle Zulassung von drei V2R-Antagonisten für die Behandlung von euvolumetrischer und hypervolumetrischer Hyponatriämie, wie sie beispielsweise im Rahmen eines SIADH vorkommen kann: Conivaptan, Tolvaptan und Mozavaptan. Die Medikamente wirken über eine Blockade des V2R und führen zu einer Abnahme von AQP 2 in den Sammelrohren der Niere, sodass vermehrt Wasser ausgeschieden wird. (Esposito et al. 2011). Weitere Anwendungsgebiete wie z.B. Herzinsuffizienz oder Leberzirrhose mit Aszites waren zwar Gegenstand intensiver Forschung, hier gelang jedoch bislang keine Zulassung.

Zuletzt wurde ebenfalls ein „nephrogener SIADH“ (NSAIDH) beschrieben, wobei die Ursache in einer Mutation im V2R-Gen liegt und zu einer konstitutiven Aktivität einer Rezeptormutante im Sinne eines „gain-of function“ führt (R137C und R137L). Die konstitutive Aktivität führt zu übermäßiger Wasseraufnahme bei erniedrigtem AVP-Spiegel

und somit zu rezidivierenden Episoden von Hyponatriämie bei erhöhter Urinosmolalität (Feldman et al. 2005, Morin et al., 2012).

5.7 Ausblick: NDI - therapeutische Visionen

Bezüglich einer therapeutischen Option der bereits plasmamembranständigen V2R Mutanten, von denen einige in dieser Arbeit charakterisiert werden, ist weiterführende Forschung notwendig. Über die genauere Ursache der beschriebenen Bindungs- und / oder Kopplungsdefekte der plasmamembranständigen Mutanten ist bisher nur wenig verstanden worden. Die Anwendung der peptidischen Analoga auf die drei Rezeptormutanten L44F, G185C und R202C blieb zumindest unter dem LSM erfolglos; jedoch konnte der Wildtyp durch alle Analoga hinreichend stimuliert werden (**Abb. 9**). Die Experimente erlauben zumindest eine Aussage darüber, dass ein exklusiver Therapieansatz für die verschiedenen plasmamembranständigen Rezeptormutanten, derzeit nicht absehbar ist. Zuvor konnte auch an im ER retinierten V2R Mutanten, die durch Pharmacochaperone an die Plasmamembran rekrutiert wurden, keine funktionelle Aktivität in Abwesenheit oder Anwesenheit von AVP aufgezeigt werden (Wüller et al., 2004).

Die Suche nach „passenden“ Liganden, welcher den „gewünschten“ therapeutischen Effekt auslöst, wird durch die Beobachtung der funktionellen Selektivität („biased agonism“) herausgefordert: Eine biologisch wirksame Substanz kann unterschiedliche Signalwege auslösen und andere unberührt lassen, möglicherweise in Abhängigkeit von der Konformation eines Rezeptors. Unterschiedliche Rezeptorkonformationen wiederum bewirken die Aktivierung unterschiedlicher Effektorproteine und Initiierung von Signaltransduktionswegen (Kenakin et al 2007). So führt die Stimulation des V2R mit seinem Agonisten AVP zu β -Arrestin 2 - Rekrutierung, Internalisierung und Aktivierung der Signalkaskade und somit zu Phosphorylierung von Effektorproteinen mit Einbau von AQP-Vesikeln in die Plasmamembran. Selbiger V2R-Agonist führt bei Bindung an die F287L-Mutante zwar zu β -Arrestin 2 - Rekrutierung, jedoch zu deutlich schwächerer Rezeptorinternalisierung sowie verminderter intrazellulärer Ko-Lokalisation von Rezeptor und β -Arrestin 2. Der Agonist AVP trifft bei der Rezeptormutante F287L möglicherweise

auf eine bereits veränderte Rezeptorkonformation, die zu einer bevorzugten β -Arrestin 2 Rekrutierung führt .

Beim Großteil der intrazellulär retinierten Mutanten vermutet man eine intakte intrinsische Aktivität bzw. das Vorliegen bestimmter Rezeptorkonformationen, welche sich durch oben genannte Experimente von Robben et al. und Morello et al. zu bestätigen scheinen. Da die krankheitsauslösenden Rezeptoren, egal ob intrazellulär retiniert oder plasmamembranständig exprimiert, offensichtlich problematische „drug-targets“ darstellen, besteht die Notwendigkeit nach anderen therapeutischen Ansätzen zu suchen. Ein eleganter Gedanke wäre beispielsweise eine Umgehung der bindungs- oder kopplungsdefekten Rezeptoren durch Substanzen, welche die intrazelluläre Signalkaskade direkt aktivieren können um die vermutete intrinsische Aktivität nutzen. Eine Substanz, welche beispielsweise spezifisch die Adenylatcyclase in den Hauptzellen des Sammelrohrs direkt stimuliert, könnte somit zu einem Anstieg von cAMP und zum gewünschten therapeutischen Effekt führen. Ähnliche Ansätze wurden schon in der Vergangenheit probiert, in dem man Phosphodiesterasehemmer zur unspezifischen Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel zu nutzen versuchte, was jedoch erfolglos blieb.

Auf die lange Sicht ist momentan bei den hier dargestellten Gründen ein kurativer Therapieansatz nicht absehbar. In Bezug auf genetisch bedingte Erkrankungen ist die Gentherapie seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver und auch umstrittener Forschung. Ob mittels solcher neuartigen Therapien eine Heilung auch des X-NDI gelingen könnte bleibt offen und bedarf weiterführender Forschung. Mittelfristig erscheint die aktuelle therapeutische Option der Patienten bestehend aus Diuretika, NSAR und konservativen Maßnahmen die beste Wahl, um die Symptome zu kontrollieren und ein individuelles Maß an Lebensqualität zu erreichen.

6 Literaturverzeichnis

Balanescu S, Rutishauser J. Diabetes insipidus: Differentialdiagnostik und Therapie. Schweiz Med Forum 2010;10(7):123–128.

Barret L, Singer M, Clapp L. Vasopressin: Mechanisms of Action on the Vascular in Health and in Septic Shock. Crit Care Med 2007;Vol. 35, No 1.

Bernier V, Morello J-P, Zarruk A et al. Pharmacologic Chaperones as a Potential Treatment for X-linked Nephrogenic Diabetes Insipidus. J Am Soc Nephrol 2006;17:232-243

Charest P, Oligny-Longpre G, Bonin H, Azzi M, Bouvier M. The V2 vasopressin receptor stimulates ERK1/2 activity independently of heterotrimeric G-protein signalling. Cel Signal. 2006

Chen CH, Chen WY, Liu HL et al. Identification of mutations in the arginine vasopressin receptor 2 gene causing nephrogenic diabetes insipidus in chinese patients. J Hum Genet 2002;47: 66-73.

DeWire S, Seungkirl A, Lefkowitz R, Shenoy S. β -Arrestins and Cell Signaling. Annu. Rev. Physiol. 2007;69:483-510.

Esposito P, Piotti G, Bianzina S, Malul Y, Dal Canton A. The syndrome of inappropriate antidiuresis: pathophysiology, clinical management and new therapeutic options. Nephron Clin Pract 2011;119:c62–c73.

Feldmann B, Rosenthal S, Vargas G et al. Nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis. N Engl J Med 2005;352;18.

Fujiwara T, Bichet D. Molecular Biology of Hereditary Diabetes Insipidus. *J Am Soc Nephrol* 2005;16: 2836-2846.

Hermosilla R, Oueslati M, Donalies U et al. Disease-causing V2 vasopressin receptors are retained in different compartments of the early secretory pathway. *Traffic* 2004; 5: 993-100.

Innamorati G, Le Gouill C, Balamotis M, Birnbaumer M. The Long and the Short Cycle. *JBC* 2001;Vol. 276, No. 16, pp. 13096–13103.

Innamorati G, Sadeghi H, Tran N, Birnbaumer M. A serine cluster prevents recycling of the V2 vasopressin receptor. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1998;Vol. 95 pp. 222-2226.

Kaufmann J, Oksche A, Wollheim C, Günther G, Rosenthal W, Vischer U. Vasopressin-induced von Willebrand factor secretion from endothelial cells involves V2 receptors and cAMP. *J Clin Invest* 2000;106: 107-116.

Kenakin TP. Pharmacological Onomastics: What's in a name?
British Journal of Pharmacology 2008;153, 432–438.

Kim GH, Ecelbarger C, Mitchell C, Packer R, Wade J, Knepper M. Vasopressin increases Na-K-2CL cotransporter expression in the thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol* 1999;276(45): 96-103.

Lefkowitz R, Shenoy S. Transduction of receptor signals by β -arrestins. *Science* 2005;308.

Lentze M, Schaub J, Schulte F, Spranger J. *Pädiatrie Grundlagen und Praxis*. 2003;Springer-Verlag.

Los E, Deen P, Robben J. Potential of Non-peptide (Ant)agonists to Rescue Vasopressin V2 Receptor Mutants for the Treatment of X-linked Nephrogenic Diabetes Insipidus. *J of Neuroendocrinology* 2010;22, 393-399.

Luttrell L, Lefkowitz R. The role of β arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Science* 2002;115: 455-465.

Maekawa C, Kitahara T, Kizawa K et al. Expression and Translocation of Aquaporin-2 in the Endolymphatic Sac in Patients with Meniere's Disease. *Journal of Neuroendocrinology* 2010;22, 1157–1164.

Marples D, Frokiaer J, Nielsen S. Long-term regulation of aquaporins in the kidney. *Am J Physiol* 1999;276(45): 331-339.

Monstein HJ, Truedsson M, Ryberg A, Ohlsson B. Vasopressin Receptor mRNA Expression in the Human Gastrointestinal Tract. *Eur Surg Res* 2008;40:34–40.

Morin D, Tenenbaum J, Ranchin B, Durroux T. Nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis. *International Journal of Pediatrics: Volume 2012;Article ID 937175.*

Oksche A, Leder G, Walet S et al. Variant Amino Acids in the Extracellular Loops of Murine and Human Vasopressin V2 Receptors Account for Differences in Cell Surface Expression and Ligand Affinity. *Molecular Endocrinology* 2002;16(4):799-813.

Oksche A, Schülein R, Rutz C et al. Vasopressin V2 Receptor Mutants That Cause X-Linked Nephrogenic Diabetes Insipidus: Analysis of Expression, Processing, and Function. *Molecular Pharmacology* 1996;50: 820-828.

Oksche A, Rosenthal W. The molecular basis of nephrogenic diabetes insipidus. *J Mol Med* 1998;76: 236-337.

Oksche A, Rosenthal W. *Molekulare Grundlagen des Diabetes insipidus centralis und renalis. Endokrinopathien* © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2001.

Oligny-Longpre G, Corbani M, Zhou J, Hogue M, Guillon G, Bouvier M. Engagement of β arrestin by transactivated insulin-like growth factor receptor is needed for V2 vasopressin receptor-stimulated ERK1/2-activation. PNAS March 9, 2012.

Oueslati M, Hermosilla R, Schöneberger E et al. Rescue of a nephrogenic diabetes insipidus-causing vasopressin V2 receptor mutant by cell-penetrating peptides. J Biol Chem 2007;282(28): 20676-20685.

Pin JP, Neubig R, Bouvier M et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXVII. Recommendations for the Recognition and Nomenclature of G Protein-Coupled Receptor Heteromultimers. Pharmacol Rev 2007;59:5–13.

Rajagopal S, Rajagopal K, Lefkowitz R. Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. 2010.

Reiter E, Lefkowitz R. GRKs and β -arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signalling. Review TRENDS in Endocrinology and Metabolism 2006;Vol. 17 No.4.

Ren XR, Reiter E, Seungkirl A, Jihee K, Wie C, Lefkowitz R. Different G Protein-coupled receptor kinases govern G protein and β -arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor. 2005.

Robben J, Kortenoeven M, Sze M et al. Intracellular activation of vasopressin V2 receptor mutants in nephrogenic diabetes insipidus by nonpeptide agonists. PNAS July 21,2009, vol.106, no.29, 12195-12200.

Sadeghi H, Innamorati G, Dagra M, Birnbaumer M. Palmitoylation of the V2 Vasopressin Receptor. Mol. Pharmacol. 1997;52:21-29.

Schmidt Antje. Die konstitutive Internalisierung des humanen Vasopressin-V2-Rezeptors. 2005;Diplomarbeit.

Schülein R, Zühlke K, Krause G, Rosenthal W. Functional rescue of the nephrogenic diabetes insipidus-causing vasopressin V2 receptor mutants G185C and R202C by a second site suppressor mutation. *J Biol Chem* 2001;276: 8384-8392.

Schülein R, Zühlke K, Oksche A, Hermosilla R, Furkert J, Rosenthal W. The role of conserved extracellular cysteine residues in vasopressin V2 receptor function and properties of two naturally occurring mutant receptors with additional extracellular cysteine residues. *FEBS Letters* 2000;466 101-106.

Schwieger I, Lautz K, Krause E, Rosenthal W, Wiesner B, Hermosilla R. Derlin-1 and p97/Valosin-containing protein mediate the endoplasmic reticulum-associated degradation of human V2 vasopressin receptors. *Mol Pharmacol* 2007;73: 697-708.

Shenoy S, Lefkowitz R. Multifaceted Roles of β arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem. J.* 2003;375, 503-515.

Shenoy S, Negin PM, Lefkowitz R. Regulation of V2 Vasopressin Receptor degradation by Agonist-promoted Ubiquitination. *JBC* 2003;278(46): 45954-45959.

Thibonnier M, Coles P, Thibonnier A, Shoham M. The basic and clinical pharmacology of nonpeptide vasopressin receptor antagonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41: 175-202.

Valenti G, Procino G, Tamma G, Carosino M, Svelto M. Minireview: Aquaporin 2 trafficking. *Endocrinology* 2005;146(12): 5063-5070.

Van Lieburg AF, Knoers NVAM, Monnens LAH. Clinical Presentation and Follow-Up of 30 Patients with Congenital Nephrogenic Diabetes Insipidus. *J Am Soc Nephrol* 1999;10: 1958-1964.

Literaturverzeichnis

Wenkert D, Schoneberg T, Merendino Jr J et al. Functional Characterization of five V2 vasopressin receptor gene mutations. *Mol And Cell Endocrinol* 1996;124: 43-50.

Wüller S, Wiesner B, Löffler A et al. Pharmacochaperones post-translationally enhance cell surface expression by increasing conformational stability of wild-type and mutant vasopressin V2 receptors. *J Biol Chem* 2004;279(45): 47254-47263

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Berit Bohnekamp, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Funktionelle Charakterisierung von krankheitsauslösenden Vasopressin V2-Rezeptor Mutanten“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum:

Unterschrift: Berit Bohnekamp

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Berit Bohnenkamp hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Poster: B. Bohnenkamp, B. Wiesner, G. Krause, R. Schüle, R. Hermosilla, W. Rosenthal, A. Oksche: „Functional characterization of vasopressin V2 receptor mutants with defects in AVP-binding“ auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) in Mainz, Deutschland
47th Spring Meeting of the German Association of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT). April 4 – 6, 2006. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, Suppl. 1 Vol. 372 Mainz, Germany.

Abstract: Bohnenkamp B, Lautz K, Brandt U, Rosenthal W, Oksche A, Hermosilla R. Characterization of two NDI-causing V₂ receptor mutants: Arrestin-dependent and -independent internalisation. 48th Spring Meeting of the German Association of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT). March 13 – 15, 2007. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, Suppl. 1 Vol. 375: 18-18 32. Mainz, Germany

Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Curriculum Vitae

Publikationsliste

Poster: B. Bohnkamp, B. Wiesner, G. Krause, R. Schülein, R. Hermosilla, W. Rosenthal, A. Oksche: „Functional characterization of vasopressin V2 receptor mutants with defects in AVP-binding“ auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) in Mainz, Deutschland
47th Spring Meeting of the German Association of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT). April 4 – 6, 2006. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, Suppl. 1 Vol. 372 Mainz, Germany.

Abstract: Bohnkamp B, Lautz K, Brandt U, Rosenthal W, Oksche A, Hermosilla R. Characterization of two NDI-causing V₂ receptor mutants: Arrestin-dependent and -independent internalisation. 48th Spring Meeting of the German Association of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT). March 13 – 15, 2007. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, Suppl. 1 Vol. 375: 18-18 32. Mainz, Germany

Danksagung

Mein grosser Dank geht an meine Doktorväter Herr PD Dr. Ralf Schüle, Herr PD Dr. Alexander Oksche und Herr Prof. Dr. Ricardo Hermsilla für die Betreuung meiner Doktorarbeit; ihre kontinuierliche Unterstützung, ihre Motivation und ihre Bereitschaft, mir die experimentelle Grundlagenforschung näher zu bringen.

Ich bedanke mich ausserdem bei meinen ehemaligen Kollegen für die vielen gemeinsamen Stunden innerhalb und ausserhalb des Labors, ihre hilfreichen Ratschläge und ihre Geduld: Katja, Solveig, Isa, Evelina, Phillip, Alexandra, Mario, Verena. Ich danke den MPA's Monika und Ursel für ihre Hilfe und Anleitung bei den Zellkulturarbeiten.

Ich danke den Arbeitskollegen des Leibniz-Instituts für molekulare Pharmakologie für Ihre Unterstützung.

Ich bedanke mich bei meiner Familie und bei meinen Freunden, die mich in beruflicher und privater Hinsicht immer unterstützt und voller Zuversicht an mich geglaubt haben.