

**Identifizierung transportrelevanter
Aminosäurereste im proximalen C-Terminus des
humanen Vasopressin V2-Rezeptors**

D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des akademischen Grades

D o c t o r r e r u m n a t u r a l i s

(Dr.rer.nat.)

im Fach Biologie

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
am Institut für Chemie der Freien Universität Berlin

von

Diplombiologin Anja Thielen
geboren am 26. Juni 1967 in Düsseldorf

Präsident der Freien Universität Berlin

Univ. Prof. Dr. Dieter Lenzen

Dekan des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie

Univ. Prof. Dr. Hartmut Hilger

Gutachter:

1. Prof. Dr. Walter Rosenthal

2. Prof. Dr. Hartmut Oschkinat

eingereicht: 02. März 2004

Tag der mündlichen Prüfung: 10. August 2004

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Ich erkläre, dass ich mich bisher nicht an einer anderen Einrichtung um einen Doktorgrad beworben habe und keinen derartigen Titel besitze.

Berlin, den 01. März 2004

Anja Thielen

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG	5
2. SUMMARY	7
3. EINLEITUNG	9
3.1. EINTEILUNG DER GPCR.....	9
3.2. FUNKTION DES VASOPRESSIN V2-REZEPTORS	13
3.3. KO- UND POSTTRANSLATIONALE MODIFIKATIONEN DES V2-REZEPTORS UND ANDEREN GPCR	14
3.4. INTRAZELLULÄRER TRANSPORT VON GPCR.....	19
3.5. DER INTRAZELLULÄRE C-TERMINUS ALS TRANSPORTRELEVANTE DOMÄNE DES V2-REZEPTORS	23
3.6. ZIEL DIESER ARBEIT	25
4. MATERIAL UND METHODEN	26
4.1 MATERIAL	26
4.1.1 Bakterienstämme und eukaryontische Zelllinien	26
4.1.2 Chemikalien.....	27
4.1.3 Desoxyribonukleinsäuren	30
4.1.4 Geräte.....	38
4.1.5 Medien.....	40
4.2 METHODEN	42
4.2.1 Gerichtete Mutagenese.....	42
4.2.2 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mit der Polymerase-Ketten-Reaktion.....	44
4.2.3 Spezifische DNA-Spaltung durch Verdau mit Restriktions- <i>endonukleasen</i>	45
4.2.4 Ethanol f ällung.....	46
4.2.5 Horizontale Agarosegelelektrophorese	47
4.2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten mit Hilfe des Gene Clean Kits (<i>Dianova</i>)	47
4.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten	48
4.2.8 Herstellung von kompetenten <i>E.coli</i> Zellen und Transformation	49
4.2.9 Nukleinsäure-Isolierungsmethoden	50
4.2.10 DNA Konzentrations- und Reinheitsbestimmung	51
4.2.11 DNA-Sequenzierung nach der Dideoxymethode.....	51
4.2.12 Säugerzellkultur.....	53
4.2.13 Transiente Transfektion von COS1- und HEK 293-Zellen	55
4.2.14 Membran-Präparation von eukaryontischen Zellen und Proteinbestimmung.....	56
4.2.15. Bestimmung der Rezeptorzahl an intakten Zellen.....	57
4.2.16 Mikroskopie an lebenden Zellen.....	59
4.2.17 Nachweis der Transportfähigkeit des Rezeptors über Biotinylierung	60
4.2.18 Analyse des Glykosylierungsstatus von Membranproteinen.....	61
4.2.19 Nachweis der Fusionsproteine	62
4.2.20 Herstellung eines anti-GST-GFP-Antiserums zur spezifischen Präzipitation und Detektion des GFP-markierten V2-Rezeptors	66
5. ERGEBNISSE	69
5.1. HERSTELLUNG EINES ANTI-GFP-ANTISERUMS ZUR SPEZIFISCHEN PRÄZIPITATION UND DETEKTION DES GFP-MARKIERTEN V2-REZEPTORS.....	70
5.1.1. Das polyklonale Kaninchen-anti-GFP-Antiserum erkennt spezifisch GFP-markierte V2-Rezeptoren im Western-Blot.....	71
5.1.2. Das polyklonale Kaninchen-anti-GFP-Antiserum präzipitiert spezifisch V2R-GFP-Fusionsproteine.....	73
5.2. DIE SERINE S330, S331, S333, S334 UND S338 DES PROXIMALEN C-TERMINUS HABEN KEINEN EINFLUSS AUF DEN TRANSPORT DES V2-REZEPTORS ZUR PLASMAMEMBRAN.	75
5.2.1. Gerichtete Mutagenese des proximalen C-Terminus.....	75

5.2.2. Bindungsstudien an intakten COS.1-Zellen.....	76
5.2.3. Lokalisation der GFP-markierten V2-Rezeptormutanten in HEK293-Zellen	77
5.3. DIE HYDROPHOBEN AMINOSÄUREN F328, V332 UND L336, SOWIE DAS SERIN 329 DES PROXIMALEN C-TERMINUS SIND FÜR DEN EFFIZIENTEN TRANSPORT DES V2-REZEPTORS ZUR PLASMAMEMBRAN NOTWENDIG.....	81
5.3.1. Bindungsstudien an intakten COS.1-Zellen.....	81
5.3.2. Lokalisation der GFP-markierten V2-Rezeptormutanten in HEK293-Zellen	82
5.3.3. Analyse des Glykosylierungsstatus der GFP-markierten V2-Rezeptormutanten in HEK293-Zellen.....	84
5.3.4. Lokalisation der GFP-markierten Rezeptormutanten in HEK293-Zellen im LSM mit Hilfe der Rhodamin 6G-Färbung.....	86
5.4. DER PROXIMALE C-TERMINUS IST IN EINEM VERKÜRZTEN TRANSPORTSYSTEM, DAS UNABHÄNGIG VON DER GESAMTREZEPTORFALTUNG IST, NICHT TRANSPORTRELEVANT.....	89
5.4.1. Konstruktion der GFP-markierten V2-Rezeptorfragmente	90
5.4.2. Lokalisation der GFP-markierten V2-Rezeptorfragmente in HEK293-Zellen	91
5.4.3. Analyse des Glykosylierungsstatus der GFP-markierten V2-Rezeptorfragmente in HEK293-Zellen.....	92
5.5. DIE HYDROPHOBEN AMINOSÄUREN IM PROXIMALEN C-TERMINUS STELLEN KEIN TRANSPORTMOTIV DAR.....	94
5.5.1. Gerichtete Mutagenese der GFP-markierten V2-Rezeptorfragmente	95
5.5.2. Lokalisation der GFP-markierten V2-Rezeptorfragmente in HEK293-Zellen.....	95
5.5.3. Detektion der V2-Rezeptorfragmente an der Oberfläche von HEK293-Zellen	97
5.6. ZUSAMMENFASSUNG DER TRANSPORTRELEVANZ DER EINZELNEN AMINOSÄUREN IM PROXIMALEN C-TERMINUS DES V2-REZEPTORS:.....	98
5.7. ERSTELLUNG EINES STRUKTURMODELLS FÜR DEN INTRAZELLULÄREN C-TERMINUS DES V2-REZEPTORS	100
5.7.1. Einführung der verschiedenen Mutationen in der 1.IZS und der 1.TMD	103
5.7.2. Gerichtete Mutagenese der möglichen Interaktionspartner in der 1.IZS und der 1.TMD	106
5.7.3. Bindungsstudien an intakten HEK293-Zellen.....	107
5.7.4. Lokalisation der GFP-markierten Rezeptor-Mutanten in HEK293-Zellen	109
6. DISKUSSION	112
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	120
8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	135
9. LEBENS LAUF.....	139
10. DANKSAGUNG.....	140

1. ZUSAMMENFASSUNG

Der G-Protein-gekoppelte Vasopressin V2 Rezeptor vermittelt die regulierte Wasserrückresorption im Sammelrohr der Niere. Der proximale C-Terminus des Rezeptors ist für den Transport zur Plasmamembran essentiell. Verkürzungen innerhalb des proximalen C-Terminus führen zu einem im ER retinierten Rezeptor. Ein Glutamat-Dileuzin-Motiv innerhalb dieses Bereiches ist beim V2-Rezeptor zwar essentiell für den ER-Export, stellt aber kein Transport-Signal dar. In dieser Arbeit wurden die anderen Reste dieses transportrelevanten Bereichs auf ihre Bedeutung für den Oberflächentransport des V2-Rezeptors hin untersucht. Es wurden mehrere Mutationen eingeführt, und deren Auswirkungen auf den Transport in COS.1-Zellen und HEK293-Zellen hin untersucht.

Alle untersuchten hydrophoben Aminosäuren dieses Bereiches: F328, V332, L336, waren ebenso wie die früher beschriebenen hydrophoben Reste L339 und L340 transportrelevant. Die Mutation dieser Reste führte zu Rezeptoren, die im ER retiniert werden. Die Mutation der im proximalen C-Terminus gehäuft auftretenden Serine S330, S331, S333, S334 und S338 hatte dagegen keinen Effekt auf den Transport. Nur die Mutation von S329, der ersten Aminosäure nach Austritt aus der Membran, führte zu Rezeptoren, die im ER retiniert werden.

Die transportrelevanten Aminosäuren können zu einem linearen Transportmotiv oder einer faltungsrelevanten Struktur beitragen, deren Mutation dann zur Erkennung durch das Qualitätskontrollsystem des ER führt. Um diese Frage zu beantworten, wurde die Transportfunktion der einzelnen Aminosäuren mit Hilfe eines verkürzten Rezeptorfragments untersucht. Dieses ermöglicht Transportstudien unabhängig von der komplexen Faltung eines 7TMD-Proteins. Alle im Gesamtzeptor relevanten Aminosäuren waren bei Einzel- oder Mehrfachtausch in dem verkürzten Rezeptorfragment nicht transportrelevant. Diese Ergebnisse zeigen, dass im proximalen C-Terminus, kein unabhängiges Transportsignal vorliegt, sondern dass dieser Bereich für eine transportkompetente Faltung des Gesamtproteins wichtig ist.

Basierend auf den Kristallstrukturdaten des Rhodopsins, wurde ein computergestütztes Modell des V2-Rezeptors berechnet. Der proximale C-Terminus des Rhodopsins bildet eine amphipatische α -Helix, die Helix 8. Nach dem

Modell könnte der entsprechende Bereich des V2-Rezeptors ebenfalls eine α -helikale Struktur einnehmen: Die hydrophoben Aminosäuren der amphipatischen Helix 8 würden intramolekulare Wechselwirkungen mit Aminosäuren der ersten intrazellulären Schleife und der ersten transmembranären Domäne eingehen. Die postulierten Interaktionen für L339 und E335 wurden experimentell überprüft. Die erhaltenen Daten unterstützten die postulierte α -Helix nicht. Möglicherweise nimmt der proximale C-Terminus des V2-Rezeptors im ER eine Schleifen-Struktur ein. Die Daten dieser Arbeit lassen es nach der Veröffentlichung der ersten Kristallstruktur eines GPCR sinnvoll erscheinen, erneut ein Schleifen-Modell des proximalen C-Terminus zu berechnen, und anhand dieses Modells die intramolekularen Interaktionen des proximalen C-Terminus neu zu überprüfen.

2. SUMMARY

The G protein-coupled human vasopressin V2 receptor mediates the regulated reabsorption of water in the renal collecting duct epithelial cells. It was shown that a glutamate/dileucine motif in the proximal C terminus is critical for receptor transport from the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi apparatus. The aim of this work was to test whether the amino acids lying in the vicinity of the glutamate/dileucin motif also influence ER exit of and whether this region represents a transport signal or a folding-relevant domain.

To this end, the amino acid residues in the proximal C terminus were exchanged by site-directed mutagenesis and intracellular transport of the mutant proteins in transiently transfected HEK 293 cells was assessed by glycosylation state analyses, ligand binding studies and confocal laser scanning microscopy. Mutation of the hydrophobic residues in this region (F328, V332, L336) led to receptors that are more or less trapped in the ER. These amino acids are thus necessary for ER to Golgi transport. In contrast, the multiple serin residues (S330, S331, S333, S334 and S338) of the proximal C terminus have no influence on the receptor transport, with the exception of S329 which is located most likely at the interface between the proximal C terminus and the membrane.

The transport relevant amino acids in the proximal C terminus may represent a linear transport signal recognized by components of ER to Golgi vesicles. Alternatively, they may be necessary for transport-competent receptor folding to pass the quality control system of the ER. To assess these two possibilities, the transport functions of the relevant residues were studied independent of full length receptor folding. To this end the C terminus was fused to a receptor fragment consisting only of the N terminus, the first transmembrane domain and the first intracellular loop of the V2 receptor. In this system, mutation of the hydrophobic amino acid residues did not influence receptor trafficking. These results demonstrate that the hydrophobic residues are not part of a linear transport signal. Instead they are necessary to establish a transport-competent folding state.

Based on the crystal structure of rhodopsin, we calculated a structure model of the V2 receptor. The model predicts that the proximal C terminus (as in rhodopsin) constitutes an amphipatic α -helix and that the hydrophobic residues of

this helix interact with hydrophobic residues of the first intracellular loop and the first transmembrane domain. However, site-directed mutagenesis and transport studies to prove these interactions were not successful. Recent nuclear magnetic resonance studies for the proximal C terminus of rhodopsin indicate that this region may form both a helical and a loop structure depending on the activation state of the protein. If the same holds true for the V2 receptor, future experiments to prove interactions within the receptor molecule should be repeated based on a newly-calculated loop model.

9. LEBENS LAUF

- Persönliches** Anja Thielen, geborene Niedergesäss
geboren am 26. Juni 1967 in Düsseldorf
verheiratet seit dem 10. März 2000
Geburt meines Sohnes Jacob Felix am 15. Mai 2000
- Anschrift** 12167 Berlin, Karl-Stielerstr. 12a
030/2928872
thielen-berlin@t-online.de
- Schule** 1973–1977 Lindengrundschule, Düsseldorf
1977–1983 Realschule an der Ackerstrasse, Düsseldorf
1983–1987 Nelly-Sachs-Gymnasium, Neuss
- Studium** 1988 Studium der Germanistik an der Heinrich-Heine-Universität in
Düsseldorf
- 1989–1997 Studium der Biologie an der Universität des Saarlandes
Vordiplom am 12. Oktober 1993 mit der Note „gut“
Hauptstudium in Genetik, Mikrobiologie, Biochemie
- Diplomarbeit in der Medizinischen Biochemie
Thema: „Untersuchungen zu Chaperon / Substrat-Interaktionen“
- Diplom am 16. Juni 1997 mit der Note „sehr gut“
- Promotion** Beginn der Promotion am 1. September 1997 am Forschungsinstitut
für Molekulare Pharmakologie in Berlin im Bereich Molekulare
Medizin / Zellbiologie
Untersuchung der Transportrelevanz des proximalen C-Terminus beim
humanen Vasopressin V2-Rezeptor“
- Erziehungsurlaub von April 2000 bis November 2001
- Berufstätigkeit** 2003, Projektleiterin „Bekämpfung der Kastanienminiermotte“, IQ
Mediatech GmbH, Berlin
- Seit 2004, wissenschaftliche Mitarbeiterin beim Verband der
Cigarettenindustrie, Berlin; verantwortlich für den Bereich : „Rauchen
und Krebsentstehung“

Berlin, 01. März 2004

10. DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich bei:

Herrn Prof. Dr. Walter Rosenthal, besonders für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit nach der Babypause am Institut zu beenden;

Herrn Prof. Dr. Hartmut Oschkinat für die konstruktive Kritik und Begutachtung meiner Arbeit;

Herrn Dr. Ralf Schüle für die gute Betreuung. Seine ruhige, sachliche Art war oft hilfreich, Probleme, die während der Arbeit auftraten, zu bewältigen;

Herrn Dr. Ricardo Hermosilla, dessen Arbeiten einen Grundstein für diese Arbeit gelegt haben und der mir stets geduldig, nicht nur bei Computerproblemen, geholfen hat;

Herrn Dr. Gerd Krause für sein Modell des V2-Rezeptor-C-Terminus und die Hilfe bei der Auswahl der Interaktionspartner;

Frau Dr. Gisela Papsdorf, nicht nur für die gut funktionierende Zellkultur; sondern auch für die aufmunternden Worte, die sie gerade in der letzten Phase der Arbeit für mich hatte;

Herrn Dr. Burkhard Wiesner und Frau Brunhilde Oczko für die Unterstützung bei den LSM-Aufnahmen;

Herrn Dr. Erhard Klausenz und Frau Bärbel Mohs für die unendlich vielen DNA-Sequenzierungen;

Frau Jenny Eichhorst, Frau Dr. Claudia Rutz und Frau Dr. Martina Alken, von deren guter Labororganisation ich in mancher Notlage profitieren konnte;

Frau Dr. Kerstin Zühlke für die freundschaftliche Unterstützung während dieser langen Zeit;

und natürlich allen meinen anderen Arbeitskollegen am FMP Berlin für die nette Arbeitsatmosphäre;

Im Angedenken danke ich

Herrn John Dickson, der mich auf unnachahmliche Weise in die Geheimnisse der Molekularbiologie eingeführt hat;

Zu guter Letzt möchte ich meinem Mann

Daniel danken, der mir mit der Betreuung von unserem Sohn Jacob oft den Rücken frei gehalten hat. Sein Optimismus hat mich immer motiviert, diese Arbeit zu vollenden.