

6. DISKUSSION

Der Vasopressin V2-Rezeptor bildet, wie viele andere Rezeptoren der Familie A, durch eine Palmitoylierung im C-Terminus eine 4. intrazelluläre Schleife aus. Dieser proximale Bereich des C-Terminus spielt eine wesentliche Rolle für den Oberflächentransport des V2-Rezeptors. Mutagenesen der Palmitoylierungsstellen C341S und C342S führten zu einem erheblich reduzierten Transport des Rezeptors (SCHÜLEIN et al., 1996). Auch Verkürzungen des Rezeptors vor den Palmitoylierungsstellen führten zu einer vollständigen Retention (SADEGHI et al., 1997, OKSCHE et al., 1998).

Beim V2-Rezeptor wurde ein potentiell Glutamat-Dileuzin-Motiv (E³³⁵LRS³³⁹L³⁴⁰) innerhalb des transportrelevanten Bereichs identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass diese Reste zwar essentiell für einen effizienten Transport des V2-Rezeptors sind (SCHÜLEIN et al., 1998), sie aber wahrscheinlich kein Transportsignal darstellen (KRAUSE et al., 2000).

Auch bei anderen GPCR ist der proximale C-Terminus für einen effektiven Oberflächentransport notwendig, wie z.B. beim LH/CG-Rezeptor (RODRIGUEZ et al., 1992), ET_A-Rezeptor (CYR et al., 1993), Histamin H₂-Rezeptor (FUKUSHIMA et al., 1997) und beim α_{1B} -adrenergen Rezeptor (WANG et al., 2000).

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der anderen Reste des proximalen C-Terminus für den Oberflächentransport des V2-Rezeptors untersucht.

Der V2-Rezeptor besitzt im proximalen C-Terminus auffallend viele Serine (6 von insgesamt 12 Resten in diesem Bereich sind Serine). Die Rezeptormutanten der verschiedenen Serine S330A, S331A, S333A, S334A und S338A verhalten sich in Bindungsstudien wie der wildtypische Rezeptor. Auch bei den mikroskopischen Aufnahmen, sowie bei der Analyse des Glykosylierungsstatus der jeweiligen Mutanten in den Western-Blots konnten keine Unterschiede zum wildtypischen Rezeptor gefunden werden (siehe Abb. 8).

Serine und Threonine sind potentielle Phosphorylierungsstellen, durch die häufig die Aktivität, bzw. die Verfügbarkeit eines Proteins reguliert wird. Beim V2-Rezeptor wird allerdings keiner dieser Reste im proximalen C-Terminus phosphoryliert (INNAMORATI et al., 1997), sondern ausschließlich Serin- und Threoninreste im distalen Bereich des C-Terminus (INNAMORATI et al., 1998). Diese Phosphorylierungen werden durch die GRK vermittelt und regulieren beim V2-Rezeptor Internalisierung und Recycling (INNAMORATI et al., 1999). Ähnliche distale Phosphorylierungen, die die Aktivierbarkeit der Rezeptoren regulieren, konnten bei verschiedenen anderen GPCR charakterisiert werden, wie dem Somatostatin-Rezeptor Typ 3 (ROTH et al., 1997), κ -Opioid-Rezeptor (APPLEYARD et al., 1999) und dem α_{1B} -adrenergen Rezeptor (LATTION et al., 1994; LUTRELL und LEFKOWITZ, 2002).

Ob und welche Bedeutung die Häufung der Serine im proximalen C-Terminus des V2-Rezeptors hat, bleibt unklar. Die Daten dieser Arbeit zeigen aber, dass die einzelnen Reste nicht faltungsrelevant sind und auch kein Bestandteil eines linearen Transportsignals.

S329 hat als einziges Serin einen Effekt auf die Faltung und damit den Transport des Rezeptors. Dieses Serin bildet den Übergang von der 7.TMD zur 4.IZS und ist vermutlich die erste Aminosäure des proximalen C-Terminus. Eine Mutation zu einem Alanin führte zu einer 70%igen Reduktion der spezifischen Bindung von [3 H]AVP in der Sättigung im Vergleich zum wildtypischen Rezeptor. Die mikroskopischen Aufnahmen des GFP-markierten Rezeptors zeigen entsprechend eine verstärkte Retention des mutierten Proteins (siehe Abb. 9). Vermutlich ist die unmittelbare Nähe dieser Aminosäure zur Membran der entscheidende Faktor für die destabilisierende Wirkung von Mutationen an dieser Position.

Alle Mutationen der hydrophoben Aminosäuren (F328, V332 und L336) im proximalen C-Terminus zu hydrophilen Resten führen zu einem erheblichen Transportverlust (siehe Abb. 9 und 10). Die Mutanten F328T und L336T wurden vollständig im endoplasmatischen Retikulum retiniert. Die Mutation V332T führte dagegen nur zu einem ca. 50%igen Verlust der spezifischen Bindung von [3 H]AVP in der Sättigung im Vergleich zum wildtypischen Rezeptor (siehe Abb. 9). Der

relative Transportdefekt wurde durch die mikroskopischen Aufnahmen und der Analyse des Glykosylierungsstatus bestätigt (siehe Abb. 9 und 10).

Unmittelbar vor den beiden palmitoylierten Cysteinen liegen zwei weitere hydrophobe Reste: L339 und L340. Durch andere Arbeiten ist bekannt, dass der Austausch von L339T zu komplett im ER retinierten Rezeptoren führt, während der Austausch von L340T zu einem um 50% reduzierten Transport führt (SCHÜLEIN et al., 1998). L340 ist damit wie V332 für den Oberflächentransport nicht essentiell, macht aber den Transport effektiver. Die Mutagenesestudien des proximalen C-Terminus beim V2-Rezeptor, aber auch beim Dopamin D1-Rezeptor lassen den Schluss zu, dass die Hydrophobizität der Aminosäuren in diesem Bereich die Transportrelevanz bestimmen und nicht die Identität der jeweiligen Aminosäuren (SCHÜLEIN et al., 1998; BERMAK et al., 2001).

Die Bedeutung der Hydrophobizität des proximalen C-Terminus für den ER-Golgi-Transport kann auf völlig verschiedenen Ursachen beruhen:

Erstens könnten die hydrophoben Aminosäuren ein unabhängiges ER-Export-Signal darstellen. Ein unabhängiges Transportsignal sollte mehrere Eigenschaften erfüllen. Es sollte auf andere Proteine übertragbar sein, also unabhängig vom Rest des Proteins, bzw. von der Gesamtfaltung des Proteins funktionieren. Ferner sollte es auf der cytoplasmatischen Seite eines Membranproteins lokalisiert sein, um von Proteinen, die für die Bildung von Transportvesikeln mitverantwortlich sind, erkannt werden zu können. Die bisher bekannten ER-Export-Signale bei Membranproteinen sind klein und bestehen meist aus 2 hydrophoben benachbarten Aminosäuren oder 2 sauren Resten (NUFER et al., 2001; MA et al., 2001; HAURI et al., 2000). Bei GPCR wurde ein derartiges ER-Export-Signal bislang noch nicht identifiziert.

Zweitens könnten die hydrophoben Aminosäuren auch für die Faltung und Struktur des Proteins wichtig sein. Mutierte und fehlgefaltete Rezeptoren können die Qualitätskontrolle im ER nicht mehr überwinden und werden im Zellinneren retiniert (siehe Review: ELLGAARD und HELENIUS, 2003).

Um den Unterschied zwischen Faltung und Transport herauszuarbeiten, wurde in dieser Arbeit ein verkürztes Rezeptorkonstrukt verwendet, mit dem die Transportrelevanz der Aminosäuren des proximalen C-Terminus unabhängig von

der Gesamtrezeptorfaltung untersucht werden kann. Das Konstrukt besteht aus den ersten 71 Aminosäuren des V2-Rezeptors, also dem N-Terminus, der 1.TMD und der 1.IZS. An diese 71 Aminosäuren wurde der C-Terminus mit den jeweiligen Mutationen fusioniert. C-terminal ist dieses verkürzte Rezeptorfragment mit dem grün fluoreszierenden Protein GFP markiert (siehe Abb. 12). Wenn innerhalb des proximalen C-Terminus ein kurzes, lineares Transportsignal liegt, so sollten die jeweiligen transportdefekten Mutationen auch bei den verkürzten Proteinen zu einem Transportdefekt führen.

Die experimentellen Daten zeigten dagegen, dass alle kurzen Konstrukte unabhängig von ihrer Mutation effektiv an die Zelloberfläche transportiert werden (LSM-Lokalisationsstudien, Analyse des Glykosylierungsstatus; siehe Abb. 13). Auch die gleichzeitige Mutation aller hydrophoben Aminosäuren in diesem Bereich zu Threoninen oder Alaninen ist für die Oberflächenexpression der verkürzten Rezeptorfragmente bedeutungslos (Biotinylierungsexperimente: siehe Abb. 15; LSM-Lokalisationsstudien: siehe Abb. 14). Die hydrophoben Aminosäuren des proximalen C-Terminus F328, V332, L336, sowie L339 und L340 sind demnach nur für den Gesamtrezeptor transportrelevant und damit nicht Bestandteil eines Transportsignals.

Für den Dopamin D1-Rezeptor (D1R), ebenfalls ein Rezeptor der Familie A, wurden mit ähnlichen Versuchen andere Ergebnisse erhalten. Hier treten die hydrophoben Aminosäuren des proximalen C-Terminus im gleichen Muster wie im V2R auf und sind ebenfalls entscheidend für den ER-Export. Bei diesem Rezeptor handelt es sich aber um ein von der Rezeptorfaltung unabhängiges Signal, da es auf ein verkürztes CD8-Protein übertragbar ist (BERMAK et al., 2001). Beim D1-Rezeptor wurde ferner gezeigt, dass das hydrophobe Motiv und potentielle ER-Export-Signal im proximalen C-Terminus spezifisch mit γ -COP, einer Komponente des COPI-Komplexes interagiert (BERMAK et al., 2002). COPI-Vesikel sind vor allem für den Transport innerhalb des Golgi-Apparats und vom ERGIC zurück in das ER verantwortlich. COPI-Vesikel vermitteln z.B. die Retention von nicht assemblierten Proteinuntereinheiten oder die Rückführung von ER-ständigen Proteinen, die in das ERGIC gelangt sind (YAMAMOTO et al., 2001; KAPPELER et al., 1997). Wenn das hydrophobe Motiv des D1-Rezeptors wirklich ein ER-Export-Signal ist, so würde man eine Interaktion mit COPII-Proteinen vermuten, die den anterograden ER-Golgi-Transport regulieren (OTTE und BARLOWE,

2002). Es ist daher unklar, welche Bedeutung das hydrophobe Motiv des D1-Rezeptors tatsächlich hat.

Beim V2-Rezeptor liegt nach den Ergebnissen mit den verkürzten Konstrukten die Bedeutung des proximalen C-Terminus eindeutig in der Gesamtproteinfaltung. Der Mechanismus der ER-Retention der faltungsdefekten V2-Rezeptoren ist unklar. Die faltungsdefekten Rezeptor-Mutanten F328T, S329A, V332T und L336T könnten durch eine verlängerte Interaktion mit dem Calnexin/Calreticulin-System im ER zurückgehalten werden. Für die transportdefekte Mutante R337X wurde eine Retention durch das Calnexin/Calreticulin-System postuliert (MORELLO et al., 2001). Zukünftige Arbeiten auf dem Gebiet der ER-Retention und der Degradation von V2-Rezeptormutanten sind besonders für einen therapeutischen Ansatz bei NDI-Patienten mit transport- bzw. faltungsdefekten V2-Rezeptoren interessant. Ein Ansatz könnte z.B. die Nutzung von selektiven V2R-Antagonisten als pharmakologische Chaperone sein, die in der Lage sind, transportdefekte V2-Rezeptoren zu stabilisieren und aus dem ER heraus an die Zelloberfläche zu bringen (MORELLO et al., 2000).

Das Calnexin/Calreticulin-System arbeitet auf der lumenalen Seite des ER. Über Chaperone, die die Faltung der cytoplasmatischen Bereiche von GPCR unterstützen ist wenig bekannt. Lediglich beim Rhodopsin konnte bisher gezeigt werden, dass die Anwesenheit von hsc70 und hdj1b die cytosolische Faltung des Rezeptors beeinflusst (CHAPPLE und CHEETHAM, 2003). Um mehr über die GPCR-Reifung zu erfahren, wäre es interessant, Interaktionspartner des proximalen C-Terminus zu identifizieren. Die mit dem proximalen C-Terminus interagierenden Proteine könnten entscheidende Hinweise liefern, wie die entsprechenden faltungsdefekten Mutanten erkannt werden. Gerade die hydrophoben Reste des proximalen C-Terminus könnten eine potentielle Bindungsstelle für cytosolische Chaperone, wie hsc70 darstellen (RUDIGER et al., 1997).

Wie trägt der proximale C-Terminus zur Gesamtproteinfaltung bei? Einen Hinweis auf eine strukturelle Bedeutung des proximalen C-Terminus gibt das Muster vor, in dem die hydrophoben Aminosäuren auftreten: HxxxHxxxHH. Die

Positionen der hydrophoben Aminosäuren sind in den C-Termini der Familie A der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren hoch konserviert und wurde bei über 70 Vertretern gefunden (siehe Abb. 18; KRAUSE, et al., 2000). Auch beim Rhodopsin, dem bestuntersuchten Vertreter der Familie A, treten hydrophobe Reste in diesem Muster auf. Die Kristallstrukturdaten des Rhodopsins (PALCZEWSKI et al., 2000) zeigen, dass der proximale C-Terminus dort eine amphipatische α -Helix (Helix 8) bildet. Die unpolare Seite wird durch die hydrophoben Aminosäuren des proximalen C-Terminus gebildet, während jeweils drei hydrophile Aminosäuren zur polaren Seite beitragen. Zwei unabhängige NMR-Untersuchungen der löslichen C-Termini des β_2 -adrenergen Rezeptors und des Ratten Angiotensin II AT1a-Rezeptors weisen daraufhin, dass die proximalen C-Termini dort ebenfalls natürlicherweise α -helikale Strukturen einnehmen können (JUNG et al., 1996; FRANZONI et al., 1997).

Die berechnete Sequenzähnlichkeit zwischen dem V2-Rezeptor und dem Rhodopsin im Bereich des proximalen C-Terminus liegt bei 82%. Aufgrund dieser hohen Übereinstimmung sollten sich die Strukturdaten des Rhodopsins relativ gut auf den V2-Rezeptor übertragen lassen.

Eine computergestützte Berechnung der Struktur des V2-Rezeptors zeigt, dass der proximale C-Terminus des V2-Rezeptors ebenfalls eine Helix-Struktur einnehmen könnte (siehe Abb. 17).

Das berechnete Modell des V2-Rezeptors postuliert eine intramolekulare Interaktion der 8. Helix mit Resten aus der 1.IZS und der 1.TMD (siehe Abb. 15 und Tabelle 1). Um das Modell experimentell zu beweisen, wurde versucht den Faltungs- bzw. Transportdefekt der C-terminalen Mutationen durch die Einführung von spezifischen zusätzlichen Mutationen an den Positionen der potentiellen Interaktionspartner wieder aufzuheben („Rescue“-Experimente). Die postulierten Wechselwirkungen konnten experimentell nicht bestätigt werden.

Für die Daten gibt es mehrere Erklärungen. Eine Möglichkeit ist, dass der proximale C-Terminus zwar eine Helix bildet und die vorhergesagten Interaktionen stattfinden, aber die Mutagenesen so gewählt wurden, dass sie diesen Faltungsdefekt nicht aufheben können. Der V2-Rezeptor ist ein komplexes Protein.

Die gewählten Mutationen könnten zu einem zusätzlichen Faltungsdefekt oder zu sterischen Behinderungen in der lokalen Umgebung geführt haben.

Eine andere Möglichkeit ist, dass der C-Terminus des V2R mehrere Konformationen einnehmen kann. Das V2R-Modell in dieser Arbeit beruht auf den Strukturdaten des Rhodopsins. Es liegen aber verschiedene Ergebnisse über die Struktur des C-Terminus beim Rhodopsin vor. YEAGLE publizierte 1997 eine Flüssigkeits-NMR-Analyse des Rhodopsin-C-Terminus. In dieser Analyse wurde gezeigt, dass der N-terminale Bereich der 4. IZS (ca. 7 – 8 Aminosäuren) eine α -helikale Verlängerung der 7.TMD bildet. Der andere Bereich des proximalen C-Terminus bildet eine U-förmige Schleife, der durch die hydrophoben Reste stabilisiert wird. Auch hier hat eine computergestützte Berechnung des V2-Rezeptors ein gut übereinstimmendes Modell erarbeitet. Nach diesem Modell würde der Bereich ab L336 also keine Helix, sondern eine Schleifenstruktur bilden. Interessanterweise interagieren nach dem Schleifen-Modell die gleichen Reste des proximalen C-Terminus mit Resten der 1.TMD (L339 mit A61, bzw. L62) (KRAUSE et al., 2000).

Möglicherweise kann der proximale C-Terminus beide Konformationen, also Schleife und Helix, einnehmen. Diese Hypothese wird durch einige experimentelle Daten gestützt. So konnte gezeigt werden, dass sich die Konformation des proximalen C-Terminus beim Rhodopsin und beim β_2 -adrenergen Rezeptor reversibel ändern kann (ABDULAEV et al., 1998; KRISHNA et al., 2002; PELEG et al., 2001).

Die Rhodopsin-Kristallstruktur stellt den inaktiven ligandengebundenen Zustand des Rezeptors dar. Durch Lichteinfall wird der Rezeptor aktiviert. Diese Aktivierung führt zu Konformationsänderungen, die wiederum über die transmembranären Domänen auch auf den C-Terminus übertragen werden (siehe Review: SAKMAR, 2002). Es wurde postuliert, dass die Helix 8 des proximalen C-Terminus durch die Aktivierung in eine U-förmige Schleife übergehen könnte (KRISHNA et al., 2002). Diese beobachteten Konformationsänderungen des C-Terminus durch Änderungen des Aktivierungszustands könnten den scheinbaren Widerspruch der beiden publizierten Strukturen des Rhodopsin-C-Terminus erklären. Möglicherweise kann der V2R-C-Terminus auch beide Konformationen

einnehmen. Zumindest lassen sich beide Modelle, das Helix- und das Schleifen-Modell, gleichermaßen gut auf den V2-Rezeptor übertragen.

Am wichtigsten ist in diesem Zusammenhang die Klärung der Frage, in welcher Konformation der proximale C-Terminus des Rhodopsins unmittelbar bei oder nach seiner Synthese im ER einnimmt, d.h., wenn der Rezeptor noch kein Retinal gebunden hat. Sollte hier beim Rhodopsin und damit wahrscheinlich auch beim V2-Rezeptor eine Schleifenstruktur vorliegen, müsste die Strategie, intramolekulare Interaktionspartner beim V2-Rezeptor zu finden, neu überdacht werden.

Schleifen-Strukturen spielen bei der Initiation der Proteinfaltung eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass es faltungsrelevante Bereiche gibt, die im reifen Protein eine helikale Struktur einnehmen, aber bei den ersten Faltungsschritten zunächst eine Schleifen-Struktur ausbilden (WRIGHT et al., 1988). Es ist also durchaus vorstellbar, dass der C-Terminus des Rhodopsins und des V2R zunächst eine Schleifen-Struktur einnehmen und erst im Stäbchenzellen-Außensegment, bzw. der Plasmamembran eine helikale Struktur ausbilden.

Die obigen Ausführungen lassen es sinnvoll erscheinen, erneut eine Struktur des C-Terminus des V2-Rezeptors auf der Basis des Schleifen-Modells zu berechnen. Die Kristallstruktur des Rhodopsins hat zu definierten Helixenden geführt, die die Ausgangslage für ein solches Schleifen-Modell wesentlich verbessert hat. Auf der Grundlage dieses Modells könnte versucht werden, durch Doppelmutationen im C-Terminus und in der 1.IZS einen „Rescue“ zu erhalten. Momentan wird auch eine Kristallstruktur des β_2 -adrenergen Rezeptors erarbeitet (WARNE et al., 2003). Diese Experimente werden sicher zusätzliche Daten liefern, die zeigen, ob die C-Termini der verschiedenen GPCR der Familie A eine individuelle oder eine generelle Struktur einnehmen.