

## 1. Zusammenfassung

Die meisten G Protein-gekoppelten Rezeptoren verfügen extrazellulär über zwei konservierte Cysteine, die zu einer Disulfidbrücke verknüpft werden. Es ist bekannt, daß diese Disulfidbrücke für die korrekte Ausbildung der Ligandenbindungsdomäne und/oder für den intrazellulären Transport wichtig ist.

Mutationen im Gen des G-Protein gekoppelten V2-Rezeptors führen zum X-chromosomal vererbten nephrogenen *Diabetes insipidus* (NDI). Bei den meisten der bekannten extrazellulären missense Mutationen des V2-Rezeptors kommt es zur Einführung eines zusätzlichen Cysteins. In verschiedenen Veröffentlichungen wurde postuliert, daß diese zusätzlichen Cysteine die konservierte Disulfidbrücke beeinflussen und zur Bildung einer neuen Brücke führen können.

In dieser Arbeit wurde diese Hypothese überprüft.

Dazu wurde zunächst untersucht, welchen Phänotyp die Mutation der konservierten Cysteine bewirkt.

Die konservierten Cysteine wurden durch Alanin bzw. Serin ersetzt. Die Expression der Rezeptoren erfolgte transient in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293). Die mutierten Rezeptoren (C112S, C112A und C192S, C192A) waren, zum größten Teil transportdefekt, nicht in der Lage, das Hormon Arginin-Vasopressin (AVP) zu binden und. Die konservierten Cysteine des V2-Rezeptors sind demnach sowohl für die korrekte Struktur der Ligandenbindungsdomäne als auch für den intrazellulären Transport von großer Bedeutung.

Danach wurde überprüft, ob zwei der NDI-auslösenden Mutanten mit zusätzlich eingeführten Cysteinen (G185C und R202C), den gleichen, oben beschriebenen Phänotyp der Mutanten der konservierten Cysteine vermitteln. Diese Rezeptoren (G185C, R202C) wurden an die Zelloberfläche transportiert, waren dort aber bindungsdefekt. Die beobachtete Transportkompetenz der beiden NDI-bewirkenden Mutationen ließ schlußfolgern, daß diese zusätzlichen Cysteine höchstwahrscheinlich nicht die konservierte Disulfidbrücke beeinflussen.

Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurde für die extrazellulären Rezeptordomänen des V2-Rezeptors ein Strukturmodell entwickelt. Nach diesem Modell könnten die zusätzlich eingeführten Cysteinreste auch, anstatt die bestehende, konservierte Verbindung zu lösen, eine zweite

Disulfidbrücke mit dem freien, nichtkonservierten extrazellulären Cystein C195 des Rezeptors eingehen. Zum experimentellen Nachweis dieser Hypothese wurde in den NDI-verursachenden Rezeptoren G185C und R202C zusätzlich der Rest C195 durch ein Alanin ersetzt. Dadurch wird die potentielle Bildung einer zweiten Disulfidbrücke unterbunden. Diese Doppelmutation führte zu einer Wiederherstellung der Funktionen in beiden NDI-verursachenden Rezeptoren. Dies läßt darauf schließen, daß die zweite Disulfidbrücke bei den NDI-bewirkenden Rezeptormutanten G185C und R202C tatsächlich gebildet wird.

In der Arbeit konnte ferner gezeigt werden, daß der freie Cysteinrest C195 keine Funktion für den V2-Rezeptor hat. Er ist sogar nachteilig, weil er den Rezeptor empfindlich für zusätzlich eingeführte Cysteine macht. Weitere Untersuchungen ergaben, daß dieser Rest in der Evolution erst auf der Stufe der höheren Primaten eingeführt wurde. Mit Hilfe der Datenbankanalysen konnte ferner gezeigt werden, daß das Vorhandensein einer ungeraden Anzahl an extrazellulären Cysteinen (wie beim V2-Rezeptor) bei Klasse I G Protein-gekoppelten Rezeptoren sehr selten ist. Es besteht also offenbar ein Selektionsdruck, Konstellationen mit einer ungeraden Anzahl von Cysteinen zu vermeiden, da diese den Rezeptor empfindlich für zusätzlich eingeführte Cysteine machen würden.

## Summary

The G protein-coupled vasopressin V2 receptor (V2 receptor) contains a pair of conserved cysteine residues (C112 and C192) which are thought to form a disulfide bond between the first and the second extracellular loop. The conserved cysteine residues were found to be important for the correct formation of the ligand binding domain of some G protein-coupled receptors and for the efficient intracellular receptor transport.

Mutations in the gene of the V2 receptor cause X-linked nephrogenic diabetes insipidus (NDI). Most of the missense mutations on the extracellular face of the receptor introduce additional cysteine residues. Several groups have proposed that the residues might disrupt the conserved disulfide bond of the V2 receptor.

Here we assessed the properties of the V2 receptor after site-directed mutagenesis of its conserved cysteine residues in transiently transfected human embryonic kidney (HEK 293) cells. Mutant receptors (C112S, C112A and C192S, C192A) were non-functional and located mostly in the cell's interior. The conserved cysteine residues of the V2 receptor are thus not only important for the structure of the ligand binding domain but also for intracellular receptor transport.

We then analyzed the defects of two NDI-causing mutant V2 receptors with additionally introduced cysteines (G185C, R202C). The mutant receptors were efficiently transported to the plasma membrane but were defective in ligand-binding. Taking this unaffected intracellular transport of both NDI-causing mutant receptors into account, our results indicate that the observed impairment of ligand-binding by the additional cysteine residues is not due to the prevention of disulfide bond formation between the conserved cysteine residues.

To verify this results, we calculated a structure model of the extracellular receptor domains. The model suggests that the additional cysteine residues may form a second disulfide bond with the free, nonconserved extracellular cysteine residue C195 rather than impairing the conserved bond. To address this question experimentally, we used the NDI-causing mutant receptors G185C and R202C. Their C195 residue were replaced by alanine to eliminate the hypothetical second disulfide bonds. This second-site mutation led to a functional rescue of both NDI-causing mutant receptors, strongly suggesting that the second disulfide bonds are indeed formed in the case of these two receptors.

Furthermore we proved in this work that the presence of the cystein residue C195 is not essential for the V2 receptor function. Because makes the receptor sensitiv to „additional cystein mutations“ this residue even is disadvantageous.

Furthermore it was shown that C195 is not conserved among the V2 receptors of other mamalian species and is only conserved in higher primates.

With the help of data bank analyses we demonstrate that the presence of an uneven number of extracellular cystein residues, as in the human V2 receptor, is rare among class I G protein-coupled receptors. A strong selection pressure is obviously existing to avoid such a situation since these receptors would be predisposed to inactivation by the mutational introduction of additional extracellular cystein residues.