

## 2. Einleitung

G Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) spielen eine entscheidende Rolle für die Signaltransduktion von Zellen. Sie sind sowohl an der Erkennung körpereigener Moleküle (wie Hormone, Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren), als auch an der Übermittlung von Signalen (sensorische, wie Licht, Duft, Geschmack und durch Pharmaka hervorgerufene) beteiligt.

Die Familie der GPCR bildet bei Wirbeltieren mit bisher rund 2000 beschriebenen Rezeptortypen die größte Proteinfamilie (Bockaert and Pin, 1999). Es wird geschätzt, daß 1-3 % des menschlichen Genoms für GPCR codieren. In anderen Spezies, z.B. *Caenorhabditis elegans* wurden ca. 1100 GPCR-Sequenzen nachgewiesen, was sogar ca. 5 % des Genoms dieser Spezies entspricht (Bargmann, 1998).

GPCRs können in der Evolution sehr weit zurück verfolgt werden. So schlagen auch frühe Pflanzen (Plakidou-Dymock et al., 1998), Hefen (Dohlman et al., 1991) und Schleimpilze (*Dictyostelium discoideum*) (Devreotes, 1994) mit Hilfe der GPCR den Weg der Signaltransduktion ein. Selbst in Protozoen und in frühen diploblastischen Metazoen wurden von New et al. (1998) G Protein-gekoppelte Rezeptoren nachgewiesen.

G Protein-gekoppelte Rezeptoren sind heptahelikale Typ III-Membranproteine mit einem extrazellulären N- und einem intrazellulären C-Terminus. Sie werden nach Vergleich der Aminosäuresequenzen von Bockaert et al. (1999) in drei Hauptfamilien untergliedert, die nur wenig Homologien zueinander aufweisen.

Die Familie I, zu der die meisten Rezeptoren gehören, wird zusätzlich noch folgendermaßen untergliedert:

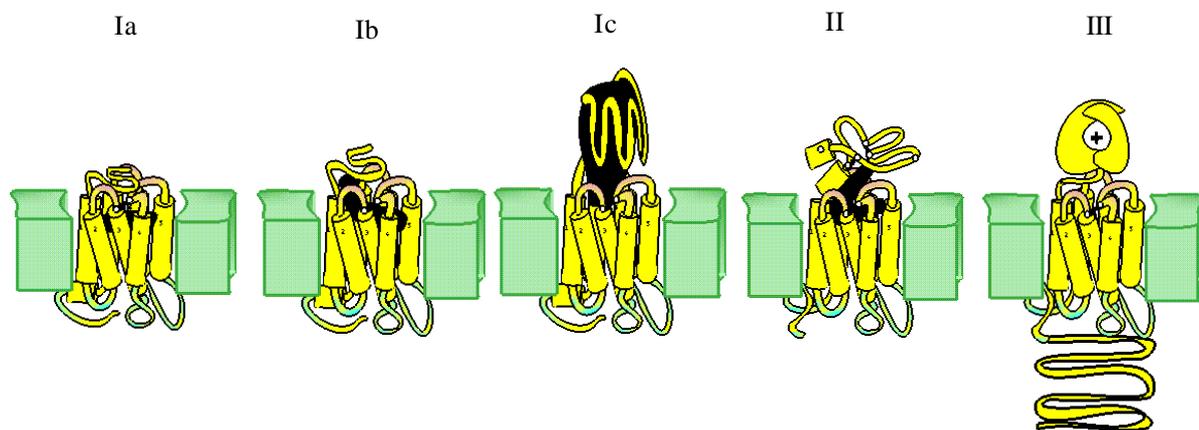
Familie Ia: Zu dieser Gruppe gehören Rezeptoren für kleine Liganden, wie Rhodopsin und der  $\beta$ -adrenerge Rezeptor. Die Bindungsregion liegt hier in einer Tasche, die von den sieben Transmembrandomänen (TM-I – TM-VII) gebildet wird.

Familie Ib: Zu dieser Familie gehören die Peptid-Rezeptoren. Die Ligandenbindungsstelle wird durch Teile der extrazellulären Schleifen und der oberen Regionen der Transmembrandomänen gebildet.

Familie Ic: In dieser Gruppe findet man die Glykoprotein-hormonrezeptoren, die einen sehr langen N-Terminus besitzen. Die Ligandenbindung erfolgt hierbei hauptsächlich im Bereich des extrazellulären N-Terminus.

Die Familie II der GPCR hat ähnliche Eigenschaften wie die Gruppe Ic, zeigt zu dieser aber keinerlei Sequenzhomologien. Zu den Liganden zählen hier die Hormone mit hohem Molekulargewicht, wie Glucagon, Sekretin u.a.

Zur Familie III gehören der metabotrope Glutamat-Rezeptor (mGluRs), der Ca<sup>2+</sup>-sensing-Rezeptor, verschiedene Pheromon-Rezeptoren und der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor. Es wird spekuliert, daß die langen extrazellulären Domänen dieser Rezeptoren auch selbst als aktivierender Ligand agieren können.



### Abb.1 : Einteilung und Diversität von GPCR.

(nach Bockaert et al., 1999) Dargestellt sind drei Hauptfamilien der GPCR ( I, II, III ). Die Familie I gliedert sich in die Unterfamilien Ia, Ib, und Ic. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Die GPCR-vermittelte Signaltransduktion erfolgt nach Bindung eines Liganden über heterotrimere G-Proteine. Durch Mutagenesen und biochemische Analysen von Rezeptoren, wie dem Rhodopsin und dem  $\beta$ -adrenergen Rezeptor, konnte gezeigt werden, daß nach Aktivierung durch den Liganden die G-Protein-Kopplungstelle durch eine Änderung der relativen Orientierung von TM-III und TM-VI zugänglich wird (Farrens et al. 1996, Bourne 1997). Struthers et al. (2000) beschrieben, daß die Konformationsänderung dabei nur sehr wenig ausgeprägt ist, da die Einführung von drei zusätzlichen Disulfidverbindungen, die die Transmembrandomänen des Rhodopsins miteinander verbinden, keine Reduktion der Signaltransduktion auslösten.

## 2.1 Intrazellulärer Transport von GPCR

Der intrazelluläre Transport von GPCR ist wichtig, da eine Signaltransduktionskette nur dann funktionieren kann, wenn die Rezeptoren in ihrem „richtigen“ Membrankompartiment lokalisiert sind.

Wie andere integrale Membranproteine auch, werden die GPCR noch während der Translation in die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) eingefädelt. Bei diesem Prozeß wird die endgültige Orientierung des Proteins festgelegt (Rappoport, 1990). Im ER findet ebenfalls die Faltung der Rezeptoren statt. Die Faltung erfährt eine Qualitätskontrolle. Nur korrekt gefaltete Proteine können in Vesikeln aus dem ER über die einzelnen Abschnitte des Golgi-Apparates zum Trans-Golgi-Network (TGN) transportiert werden (Kaiser und Ferro-Novick, 1998). Vom TGN aus werden die Membranproteine zu ihren „richtigen“ Zielkompartimenten (zur Plasmamembran, ER, Endo- oder Lysosomen) der Zelle transportiert, wo sie ihre Funktion ausüben. In Epithelzellen können Membranproteine in zwei unterschiedlich Plasmamembrankompartimente, in die apikale und basolaterale Membran, transportiert werden. Für GPCR ist über Signale, die den intrazellulären Transport der Rezeptoren steuern, wenig bekannt.

Ein weiterer wichtiger intrazellulärer Transportweg ist die Agonisten-vermittelte Internalisierung/Sequestrierung der Rezeptoren in Clathrin-Vesikel. Als Teil eines Desensibilisierungsprozesses werden GPCR auf das Ligandensignal hin von der Oberfläche in Vesikeln abgeschnürt und in ein frühes endosomales Kompartiment transportiert. Eine Gruppe von Rezeptoren gelangt nach Dissoziation des Agonisten erneut an die Zelloberfläche. In der anderen Gruppe findet man kein Recycling. Hier werden die Rezeptoren zusammen mit dem Agonisten in späten endosomalen Kompartimenten und Lysosomen abgebaut (Oksche et al., 2000).

## 2.2 Struktur der G Protein-gekoppelten Rezeptoren

Gemeinsame strukturelle Merkmale dieser Proteine sind ein extrazellulärer N-Terminus (7-595 Aminosäuren), ein intrazellulärer C-Terminus (12-359 Aminosäuren), sowie eine recht konservierte transmembranäre Struktur, die aus sieben hydrophoben  $\alpha$ -Helices (20-27 Aminosäuren für jede Helix) besteht. Die TMs I, IV und VII sind dabei signifikant hydrophober als

die TMs II, III, V und VI, die mehr ionische und/oder neutrale Reste aufweisen. Die Transmembrandomänen sind in der Aufsicht entgegen dem Uhrzeigersinn (von TM-I bis TM-VII) angeordnet und scheinen einen zentralen Kanal zu bilden. Sie sind über Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken jedoch so eng miteinander verbunden, daß sich keine Pore analog der Ionenkanäle bilden kann (Ji et al., 1998).

Die einzelnen Transmembrandomänen werden durch drei intrazelluläre (IL1, IL2, IL3) und drei extrazelluläre (EL1, EL2, EL3) Schleifen miteinander verbunden. Die Größe der Schleifen liegt zwischen 5-230 Aminosäuren. Die erste extrazelluläre Schleife ist bei 92 % aller GPCRs mit der zweiten über eine Disulfidbrücke verbunden.

Da bis vor kurzem keine hochauflösende Kristallstruktur von GPCR publiziert wurde, versuchte man Strukturinformationen über Computermodelle zu erhalten. Grundlage bildete dabei die niedrig-aufgelöste Struktur ( $\sim 7,5 \text{ \AA}$  in der Membranebene und  $16,5 \text{ \AA}$  in der senkrechten Ausrichtung) des Frosch-Rhodopsins (Gilbert, 1994).

Für das Modelling der Transmembrandomänen wurde die evolutionäre Konservierung mancher Aminosäurereste oder deren Hydrophilie berücksichtigt. Man bezog sich in der Strukturberechnung zusätzlich auf Reste, die für Ligandenbindung durch die Formierung des inneren hydrophilen Raums des Rezeptors von ausschlaggebender Bedeutung sind. Diese Reste bestimmen damit die lipid-unzugängliche Oberfläche jeder transmembranären Helix, ihre eingeschränkte Rotationsmöglichkeit und die Tiefe des Einsinkens in die Membran (Lomize et al., 1999).

Anfang des Jahres 2000 wurde von Palczewski et al. die Kristallstruktur des Rhodopsins mit einer Auflösung von  $2,8 \text{ \AA}$  beschrieben, die die Berechnung der Struktur G Protein-gekoppelter Rezeptoren stark vereinfachen wird.

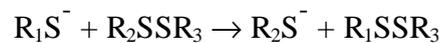
## **2.3 Bedeutung der Disulfidbrücken von GPCR für die Ligandenbindung**

Die Bindung des Liganden stellt die erste Reaktion in der Signalkette dar, die über einen G Protein-gekoppelten Rezeptor vermittelt wird. Wie und an welchen Stellen im Detail ein Ligand an einen GPCR bindet, ist bei allen GPCR-Klassen bislang noch recht unklar.

Für die Ausbildung der Ligandenbindungstasche spielen die konservierten extrazellulären Cysteine von GPCR eine entscheidende Rolle.

Die Rolle dieser Cysteine wurde zuerst mit chemischen Methoden beim  $\beta$ -adrenergen Rezeptor untersucht. Nach Behandlung der Rezeptoren mit Disulfid-reduzierenden Agenzien konnten die Rezeptoren den Liganden nicht mehr binden (Wright et al., 1983). Aus diesen Experimenten wurde geschlossen, daß zwischen den konservierten Cysteinen eine Disulfidbrücke gebildet wird und daß diese für die Ligandenbindung essentiell ist.

Die hauptsächliche chemische Reaktion für die Ausbildung der Disulfidbrücken ist der Thiol/Disulfid Austausch



bei dem das Thiolat-Anion  $R_1S^-$  ein Schwefelatom der Disulfid-Verbindung  $R_2SSR_3$  verschiebt. Disulfidbrücken werden durch zwei solcher Thiol/Disulfid- Austausch-Reaktionen mit Hilfe eines Redox-Reagents geformt und reduziert. Der erste Schritt läuft dabei über sogenannte „mixed disulfide bonds“ zwischen dem Protein und dem Redox-Reagent.

Wichtig für die Formierung von Disulfidbrücken ist der Abstand der Cystein-Reste. Die beiden Schwefelatome brauchen für den Thiol/Disulfid- Austausch eine definierte Nähe. Dieser kritische, nicht zu überschreitende Abstand zwischen zwei Cysteinen kann auch für die Aufklärung der Sekundär-, Tertiär- und Quartiärstruktur eines Proteins genutzt werden und damit andere abstands-messende Methoden, wie z.B. den Fluoreszenz-Resonanz-Energie Transfer und den nuklearen Overhauser-Effekt der NMR-Spektroskopie ergänzen (Wedemeyer et al., 2000).

Später wurde mit Hilfe gerichteter Mutagenesen bestätigt, daß diese Disulfidbrücken durch ihre strukturstabilisierenden Eigenschaften eine wichtige Rolle für die Funktionalität und Bindungsfähigkeit der Rezeptoren spielen.

Beim Rinder-Rhodopsin erhielten Davidson et al. (1994) durch den Austausch der konservierten Cysteine gegen Alanin instabile Metarhodopsin II- und III- Intermediate und damit eine reduzierte Transducin-Aktivierung. Die Mutation des dritten, nicht konservierten extrazellulären Cysteins hatte dagegen, im Vergleich zum Wildtyp, keine Veränderungen zur Folge (Karnik et al.,

1988). Cystein-Mutationen in den transmembranären Bereichen erbrachten ebenfalls einen wildtypischen Phänotyp.

Am Rhodopsin wurden im Zusammenhang mit Cysteinen einige krankheitsauslösende Mutationen beschrieben, die zur Retinitis pigmentosa führen. Zu diesen Mutationen gehören sowohl der Austausch der konservierten Cysteine gegen andere Aminosäuren (C110F, C110Y, C187Y) (Hwa et al., 1999) als auch die Einführung eines zusätzlichen Cysteins in die zweite intradiskale Schleife (Y178C). Der mögliche Defekt, der durch die Mutation der konservierten Cysteine hervorgerufen wird, ist mit den oben genannten Ergebnissen (Austausch der konservierten Cysteine beim Rinder-Rhodopsin) gut erklärbar. Für die Y178C Mutante wurde spekuliert, daß das zusätzliche Cystein die konservierte Disulfidbrücke beeinflusst und/oder auflöst (Sung et al., 1991).

Für den Tachykinin-Rezeptor zeigten Elling et al. (2000), daß auch hier die Disulfidbrücken für die Ligandenbindung notwendig sind. Savarese et al. (1992) zeigten ähnliches für den M1-muskarinergen Acetylcholin-Rezeptor.

Für den M3-muskarinergen Acetylcholin-Rezeptor wurden sich widersprechende Arbeiten publiziert. Zeng et al. (1999) beschrieben, daß die konservierten Disulfidverbindungen zwar für eine effiziente Oberflächenexpression, nicht aber für eine korrekte Faltung und G-Protein-Aktivierung notwendig sind (Mutationen C140A, C220A). Savarese et al. (1992) fanden hingegen nach Austausch der konservierten Cysteine eine reduzierte Ligandenbindungsaffinität und eine geringere Bildung des second messengers.

Auch der Austausch der konservierten Cysteine des Gonadotropin-Releasing-Hormon-Rezeptors (GnRH) (Cook et al., 1997) und des  $\mu$  Opioid-Rezeptors (Zhang et al., 1999) führten zu einer stark reduzierten funktionellen Antwort (GnRH – keine Bindung;  $\mu$  Opioid Rezeptor – keine Bindung, keine second messenger Aktivität).

Der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor verfügt extrazellulär über vier Cysteine, zwei konservierte und zwei nichtkonservierte. Bei diesem Rezeptor werden die Disulfidbrücken aber, anders als bei anderen GPCRs, zwischen je einem konservierten und einem nicht-konservierten Cystein (C106-C191 und C184-C190) ausgebildet. Beide Disulfidbrücken sind für die Ligandenbindung essentiell (Noda et al., 1994).

Beim Thromboxan-Rezeptor sind ebenfalls vier extrazelluläre Cysteine vorhanden (D'Angelo et al., 1996). Die Mutationen der konservierten Cysteine (C105S und C183S) führten zu einem

Verlust der Ligandenbindung. Mutationen der nichtkonservierten Cysteine führten dagegen zu keinen (C11S) oder nur zu geringen Beeinträchtigungen der Bindungskompetenz (C102S), so daß hier nicht klar ist, ob ebenfalls zwei Disulfidbrücken ausgebildet werden.

In ähnlicher Weise scheinen auch die vier, beim P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor vorhandenen extrazellulären Cysteine Disulfidbrücken auszubilden und damit eine Voraussetzung für die Ligandenbindung zu schaffen (Moro et al., 1999).

## **2.4 Heteromerbildung von GPCR mit Hilfe von Disulfidbrücken**

Traditionell besteht die Idee, daß sich das stöchiometrische Verhältnis zwischen Rezeptor und G-Protein wie 1:1 verhält. Neuere Arbeiten weisen jedoch darauf hin, daß dieses klassische Modell der Rezeptor/G-Protein Kopplung überholt ist.

So wurde gezeigt, daß eine Heterodimer-Bildung der GABA<sub>B</sub>R1- und GABA<sub>B</sub>R2-Subtypen Voraussetzungen für den Transport der Rezeptoren an die Zelloberfläche sind (Kuner et al., 1999).

Auch Jordan und Devi (1999) konnten am  $\kappa$ - und  $\delta$ -opioide-Rezeptor Heterodimere mit verschiedenen Ligandenbindungs- und funktionellen Eigenschaften nachweisen.

Zeng et al. (2000) zeigten Dimer bzw. Oligomer-Bildung beim M3-muskarinergen Rezeptor. Diese Oligomere, die an die Zelloberfläche transportiert werden und dort den Liganden binden können, setzen sich sowohl nicht-kovalent als auch über Disulfid-Austausch aus den Monomeren zusammen.

Auch beim metabotropen Glutamat-Rezeptor (mGluR) (Okamoto et al., 1998; Robbins et al., 1999) und beim Calcium-sensing Rezeptor (Bai et al., 1998) wurde die Fähigkeit nachgewiesen, über Disulfidbrücken verbundene Rezeptordimere zu bilden. Bei diesen Dimeren, die ebenfalls funktionsfähig an der Oberfläche zu finden sind, spielen die Cysteine des langen extrazellulären N-Terminus eine Rolle. Welche Regionen genau für die Bildung solcher Hetero- bzw. Homodimere in Frage kommen, ist aber zum größten Teil ungeklärt.

## **2.5 Struktur und Funktion des humanen Vasopressin-V2-Rezeptor**

Der humane Vasopressin-V2-Rezeptor (V2-Rezeptor) gehört zur Familie 1a der G Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR).

Der Rezeptor wird in polarisierten Epithelzellen sowohl *in situ* (Prinzipalzellen des Sammelrohres der Niere) als auch *in vitro* (Madin-Darby canine kidney cells Typ II, MDCKII) vorwiegend in der basolateralen Membran exprimiert (Schülein et al., 1998b ; Andersen-Beckh et al., 1999). Der Rezeptor vermittelt die antidiuretische Wirkung des Hormones Arginin-Vasopressin (AVP).

Das V2-Rezeptor Gen liegt auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms (Xq28; Seibold et al., 1992) und kodiert ein Protein von 371 Aminosäuren (Birnbaumer et al., 1992).

Der Vasopressin-V2-Rezeptor verfügt über drei extrazelluläre Cysteine: C112 in der ersten und C192 sowie C195 in der zweiten extrazellulären Schleife. Eine Disulfidbrücke wird dabei wahrscheinlich zwischen den beiden konservierten Cysteinen C112 und C192 gebildet. Pavo et al. konnten schon 1990 zeigen, daß der V2-Rezeptor in isolierten Membranen unter Einwirkung von Sulfhydryl Reagenzien in der Bindung inhibiert wird.

Der Rezeptor wird auch an weiteren Stellen posttranslational modifiziert:

Im C-Terminus befinden sich zwei palmitoylierte Cysteinreste (C341 und C342), über die der C-Terminus nicht kovalent in der Plasmamembran verankert ist. So kommt es zur Ausbildung einer sogenannten vierten intrazellulären Schleife (Krause et al., 2000).

An Position N22 des N-Terminus erfolgt im ER und frühen Golgi Apparat eine N-Glykosylierung (Schülein et al., 1996b). Die Threonin- und Serinresten des N-Terminus werden im Golgi-Apparat O-glykosyliert (Sadeghi und Birnbaumer, 1999).

Die biologische Funktion der N-Glykosylierung ist bis heute sowohl beim V2-Rezeptor als auch bei anderen GPCR nicht vollkommen verstanden. Trombetta und Helenius (1998) wiesen nach, daß die N-Glykosylierung in einem engen Zusammenhang zum Calnexin- bzw. Calretikulin-System stehen kann. Diese Chaperone können inkorrekte oder unvollständige Glykosylierungen erkennen und als Teil des Qualitätskontrollsystems des ER's fehlgefaltete Proteine im ER zurückhalten. Für viele Proteine spielt die N-Glykosylierung damit für die Faltung eine essentielle Rolle. Beim V2-Rezeptor scheint dies jedoch nicht der Fall zu sein. Die nicht-glykosylierte Mutante des V2-

Rezeptors zeigt in seiner Funktionalität keinen wesentlichen Unterschied zum wildtypischen Rezeptor (Sadeghi et al., 1997b).

Der V2-Rezeptor wird nach seiner Aktivierung durch den Liganden Arginin-Vasopressin (AVP) im C-Terminus reversibel phosphoryliert. Von anderen G Protein-gekoppelten Rezeptoren weiß man, daß die Phosphorylierung für die Rezeptor-Desensitivierung und auch für die Internalisierung wichtig ist. Die phosphorylierten Rezeptoren können mit dem inhibitorischen Protein  $\beta$ -Arrestin interagieren, das zum einen die G-Proteine verdrängen, zum anderen aber auch die Clathrin-vermittelte Endozytose der Rezeptoren bewirken kann (Attramada et al., 1992).

Für den V2-Rezeptor konnte eine Phosphorylierung der Serine S362, S363, S364 im C-Terminus nachgewiesen werden (Birbaumer et al., 1992), die für Desensitivierung und Internalisierung wichtig sind (Oakley et al., 2000).

Die Internalisierung des V2-Rezeptors erfolgt sehr schnell in Clathrin-Vesikeln (Pfeiffer et al., 1998). Bisher fehlt aber jeglicher Beweis eines Recyclings zur Plasmamembran. Wahrscheinlich wird der V2-Rezeptor in endosomalen Kompartimenten oder Lysosomen abgebaut (Oakley et al., 2000).

## 2.6 Die Funktion des V2-Rezeptors

Die Fähigkeit der Niere, den Urin bei einem Wasserdefizit zu konzentrieren, ist für das Überleben der terrestrisch lebenden Säugetiere von zentraler Bedeutung. Die Regulation des Wasserhaushaltes unterliegt einer strengen Kontrolle: Die Erhöhung der Plasmaosmolarität ( $>2\%$ ) oder eine Verminderung des Plasmavolumens ( $>10\%$ ) führen zur Sekretion des antidiuretischen Hormons (ADH) bzw. AVP.

AVP wird bei Wasserdefizit im Organismus von der Neurohypophyse freigesetzt und bewirkt die Erhöhung der Wasserrückresorption hauptsächlich in der Medulla der Niere.

AVP ist ein zyklisches Nonapeptid, dessen Aminosäuresequenz bei den Säugetieren identisch ist. Nur das Hausschwein und Beuteltier enthalten in Position 8 anstelle eines Arginin- einen Lysin-Rest.

AVP wird beim Menschen als AVP-NPII-Präprohormon von den magnozellulären Neuronen der *Nuclei supraopticus et paraventricularis* im Hypothalamus gebildet und im

Hypophysenhinterlappen gespeichert. Vor der Hormonausschüttung kommt es zur Prozessierung des Präprohormons, so daß nur AVP und das Trägerprotein NPII ins Blut gelangen (Review Oksche und Rosenthal, 1999).

Der Mechanismus der AVP-vermittelten Signaltransduktion verläuft wie folgt: Die Stimulation des V2-Rezeptors durch das antidiuretische Hormon AVP führt über eine Konformationsänderung des Rezeptors zur Aktivierung des heterotrimeren G-Proteins  $G_s$ , welches zur Stimulierung der membranständigen Adenylat-Zyklase führt. In der Folge wird aus ATP der Botenstoff zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) gebildet. Durch den Anstieg von cAMP kommt es zur Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA). Nach der Phosphorylierung des wasserselektiven Kanals Aquaporin 2 (AQP2) durch die PKA wird dieses Protein in der Membran von intrazellulären Vesikeln in die apikale Membran der Prinzipalzellen transloziert. Durch den Kanal kann nun Wasser in die Zelle eindringen und in der Folge über die AQP3- und AQP4-Kanäle der basolateralen Membran in das Interstitium zurückzufließen. Die treibende Kraft für diese hormongesteuerte Antidiurese ist der osmotische Gradient (hauptsächlich NaCl und Harnstoff) zwischen dem Lumen des Sammelrohrs und dem Interstitium der inneren Medulla (Review: Klußmann et al., 2000).

Weitere V2-Rezeptor vermittelte Effekte sind die Rückresorption von  $Na^+$  und  $Cl^-$  im dicken aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife des Nephrons, die über den Natrium-Kalium-2-Chlorid-Transporter (NKCC) verläuft (Kim et al., 1999) und eine erhöhte Expression der in der basolateralen Membran lokalisierten  $Na^+/K^+$ -ATPase (Charlton und Baylis, 1990). In dem zuletzt genannten Nephronsegment werden ferner der apikal lokalisierte, ATP-regulierte Kaliumkanal (ROMK) und der basolateral lokalisierte, nierenspezifische Chloridkanal (ClC-K) über AVP und V2-Rezeptoren reguliert (Kim et al., 1999). Über diese Proteine kommt es ebenfalls zu einer Verstärkung der AVP-vermittelten Wasserrückresorption.

Im Sammelrohr existiert zusätzlich eine Interaktion von Aldosteron und AVP. AVP stimuliert über den V2-Rezeptor die 11 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase, welche endogene Glukokortikoide (Cortisol und Corticosteron) inaktiviert. Dadurch wird die selektive Aktivierung von intrazellulären Mineralokortikoidrezeptoren (MR) durch Aldosteron gewährleistet (Alfaidy et al., 1997). Auf diese Weise unterstützt AVP zusätzlich die Aldosteron-gesteuerte Rückresorption von  $Na^+$ .

## 2.7 Rolle der Cysteine beim nephrogenen Diabetes insipidus (NDI)

Zahlreiche Erkrankungen beim Menschen und Tier werden durch Mutationen in Rezeptorgenen hervorgerufen. Ein Beispiel für eine solche Erkrankung ist der X-chromosomal vererbte nephrogene *Diabetes insipidus* (NDI), dem Mutationen im Gen des V2-Rezeptors zugrunde liegen (Rosenthal et al., 1992; Review Oksche und Rosenthal, 1998). Bei dieser Krankheit ist die Sensitivität der Niere für AVP verringert oder nicht mehr vorhanden, d.h. die regulierte Wasserrückresorption ist nicht mehr möglich.

Im V2-Rezeptor sind über 170 Mutationen beschrieben worden, wobei die Hälfte missense-Mutationen sind. Die meisten dieser Mutationen liegen in den Transmembrandomänen des Rezeptors. Diese Mutationen beeinflussen die Faltung des Rezeptors sehr stark und führen häufig zu einer intrazellulären Retention der mutierten Rezeptoren durch das Qualitätskontrollsystem des ER (Oksche et al., 1998; Krause et al., 2000).

Im Gegensatz zu den häufigen Mutationen in der transmembranären Domäne findet man in den intra- und extrazellulären Rezeptorbereichen verhältnismäßig wenige Mutationen. Hier ist aber bemerkenswert, daß die Mehrheit der krankheitsauslösenden Mutationen in den extrazellulären Loops mit Cysteinen in Zusammenhang stehen. Bei einer ersten Klasse von Mutationen werden zusätzlich Cysteine eingeführt. Dazu gehören die Mutationen R106C (Bichet et al., 1994), R181C (Pan et al., 1992,1994; Bichet et al., 1994; Schöneberg et al., 1998), G185C (van den Ouweland et al., 1992), R202C (Tsukaguchi et al., 1995; Bichet et al., 1994), R203C (van den Ouweland et al., 1992) und Y205C (van den Ouweland et al., 1992; Wildin et al., 1994; Yokoyama et al., 1996). Bei der zweiten Klasse der Mutationen wird das konservierte Cystein der ersten extrazellulären Schleife C112 gegen Tyrosin (Albertazzi et al., 2000) oder C112 gegen Arginin (Szalai et al., 1998) ausgetauscht.

Während es logisch erscheint, daß der Austausch der konservierten Cysteine gravierende Konsequenzen für die Rezeptorstruktur haben müßte, ist der Mechanismus, über den die zusätzlichen Cysteine einen Rezeptordefekt vermitteln, unbekannt. Die Aufklärung dieses Mechanismus war Gegenstand meiner Doktorarbeit.

## **2.8 Zielsetzung**

Die naheliegenste Hypothese für die Erklärung des Defekts, der durch die zusätzlichen Cysteine ausgelöst wird, ist, daß diese Reste die Ausbildung der konservierten Disulfidbrücke stören und eine alternative Brücke mit einer der beiden konservierten Cysteine bilden.

Die Hypothese der alternativen Brückenbildung wurde im Rahmen dieser Arbeit überprüft.