

7. Exponieren: Nach dem Trocknen wird auf die Nitrozellulose ein X-OMAT-Röntgenfilm (Kodak) aufgelegt. Die Exposition erfolgt je nach Signalstärke zwischen 1-5 Tagen.

## 4. Ergebnisse

Der Vasopressin-V2-Rezeptor besitzt extrazellulär drei Cysteine. Zwischen den beiden konservierten Cysteinen C112 und C192 wird höchstwahrscheinlich eine Disulfidbrücke ausgebildet.

In diversen Publikationen wurde auf mögliche strukturstabilisierende und damit funktionell wichtige Eigenschaften dieser konservierten Disulfidbrücken hingewiesen (Maiti et al., 2000; Qu et al., 1999).

Für den V2-Rezeptor sind diverse NDI auslösende Mutationen bekannt, bei denen zusätzliche extrazelluläre Cysteine eingeführt werden. Es wurde von mehreren Gruppen postuliert, daß diese Cysteine die Bildung der konservierten Disulfidbrücke stören könnten und so z.B. für Bindungsdefekte verantwortlich sind (Schulz, A. et al., 2000).

Thema dieser Arbeit war es, diese Hypothese zu überprüfen und den Defekt zu charakterisieren, der durch die zusätzlich eingeführten Cysteine entsteht.

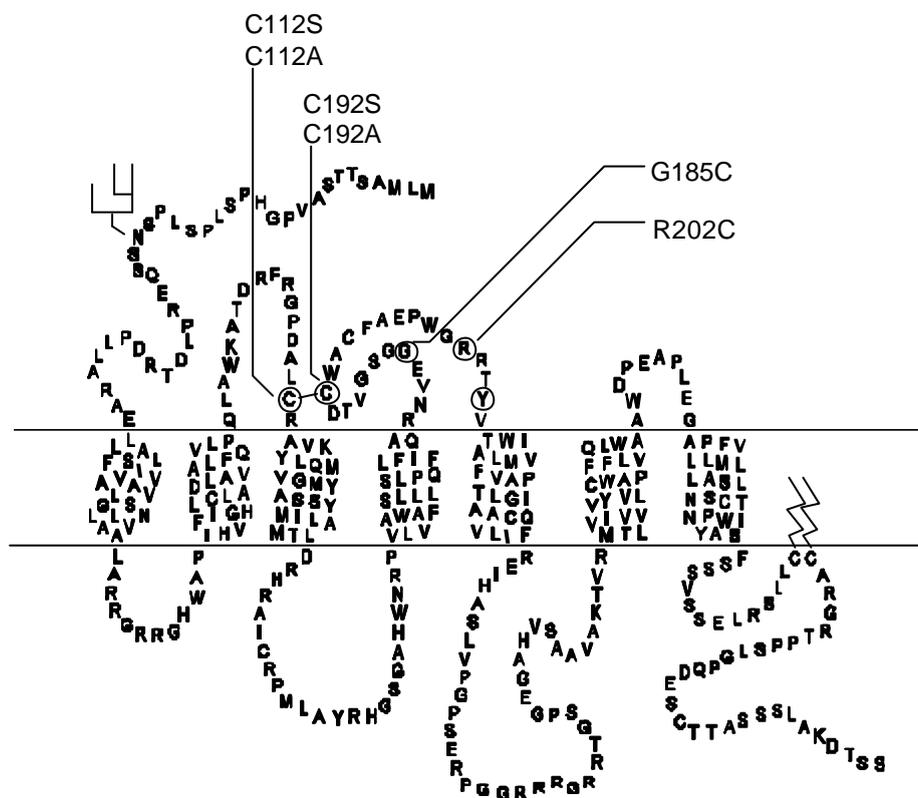
### **4.1 Bedeutung der konservierten Cysteine für den V2-Rezeptor und Charakterisierung dreier, natürlich vorkommender, mutierter Rezeptoren mit zusätzlichen extrazellulären Cysteinen**

#### 4.1.1 Gerichtete Mutagenese der extrazellulären Schleifen

Um klären zu können, ob die zusätzlichen Cysteine der NDI-Mutationen die konservierte Disulfidbrücke zerstören, mußte zunächst mit Hilfe von Rezeptormutanten geklärt werden, welche Bedeutung die konservierte Disulfidbrücke des V2-Rezeptors für die Rezeptorfunktion hat.

Dazu wurden die konservierten Cysteine C112 und C192 mit Hilfe der gerichteten

Mutagenese durch Serine oder Alanine ersetzt (Mutanten C112S, C112A, C192S, C192A). Wenn die zusätzlichen Cysteine der NDI-Mutanten tatsächlich die konservierte Disulfidbrücke zerstören, müßten die NDI-Mutanten den gleichen Phänotyp aufweisen wie die Mutanten, bei denen die konservierte Disulfidbrücke nicht mehr gebildet werden kann. Um dies zu überprüfen, wurden die NDI-Mutanten G185C und R202C ausgewählt und in die V2-Rezeptor cDNA mit gerichteter Mutagenese eingeführt (siehe Abbildung 2).



**Abb. 2 : zweidimensionales Topologiemodell des humanen Vasopressin-V2-Rezeptors.**

Alle posttranslationalen Modifikationen des Rezeptors sind aufgeführt: Glykosylierung am Asparagin 22, Palmitoylierung der Cysteine C341 und C342 und die Disulfidbrücken zwischen C112 und C192. Die durch gerichtete Mutagenese eingeführten Aminosäure-Austausche der konservierten Cysteine (C112S, C112A, C192S, C192A) und der NDI-bewirkenden Mutationen (G185C und R202C) sind ebenfalls eingezeichnet.

Für die gerichteten Mutagenesen wurde die wildtypische V2-Rezeptor cDNA auf dem Plasmid pRCDN2 als Templat benutzt. Die Mutagenesen wurden direkt mit Hilfe des QuikChange-

Mutagenesis-Systems (s. 3.2.1) in das Plasmid eingeführt (Oligonukleotide s. 3.1.3.3). Alle Mutationen wurden durch DNA-Sequenzierung bestätigt (s. 3.2.11) Es entstanden folgende rekombinante Plasmide: pC112S, pC112A, pC192S, pC192A, pG185C, pR202C (s. 3.1.3.2).

#### 4.1.2 [<sup>3</sup>H]AVP-Bindungsstudien an intakten HEK293 Zellen

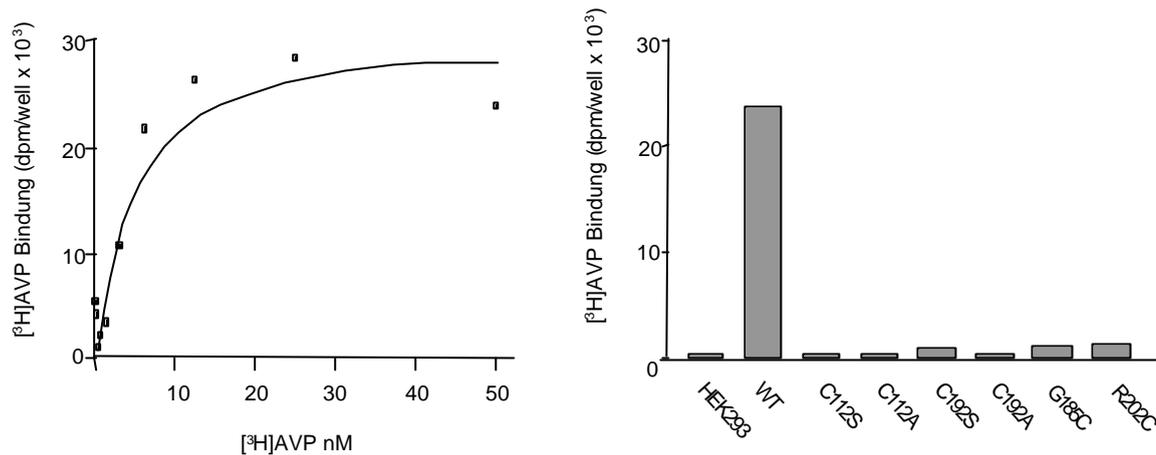
Um zu überprüfen, ob die Mutanten des V2-Rezeptors an die Oberfläche transportiert werden und dort den Liganden AVP binden, wurden HEK293-Zellen in 24-Well Platten mit allen mutierten Plasmiden transient transfiziert (s. 3.2.13). Anschließend wurden Bindungsexperimente mit [<sup>3</sup>H]AVP an intakten HEK293-Zellen durchgeführt (s. 3.2.15.1).

Für den wildtypischen V2-Rezeptor wurde eine Bindungskurve mit einer  $K_D$  von 4.6 nM und einer  $B_{max}$  von 5.3 pmol/mg erhalten, was im Einklang mit früheren Ergebnissen der Arbeitsgruppe stand (Schüle et al., 1998b).

Für die Mutanten der konservierten Cysteine C112 und C192 (C112S, C112A, C192S, C192A) konnte keine [<sup>3</sup>H]AVP Bindung mehr nachgewiesen werden (siehe Abb. 3).

Auch die Rezeptoren mit den NDI-Mutationen zeigen keinerlei Bindung (siehe Abb. 3).

Diese Daten lassen den Schluß zu, daß die konservierte Disulfidbrücke für die Ligandenbindung und /oder den intrazellularen Transport des V2-Rezeptors essentiell ist. Für die NDI-bewirkenden Mutationen stehen die Ergebnisse zunächst im Einklang mit der Hypothese, daß zusätzliche Cysteine die Ausbildung der Disulfidbrücke stören (gleicher Phänotyp).



**Abb. 3 : Spezifische [<sup>3</sup>H]AVP-Bindung für wildtypisch- und mutierte V2-Rezeptoren an intakten, transient transfizierten HEK293-Zellen.**

Links: Bindungskurve des wildtypischen Rezeptors. Die Bindungskurven der mutierten Rezeptoren C112S, C112A, C192S, C192A, G185C, R202C überlagern alle die x-Achse und sind deshalb nicht gezeigt. Auf der rechten Seite sind zur besseren Übersicht die spezifischen Werte der [<sup>3</sup>H]AVP-Bindung bei 50 nM (Sättigung) dargestellt. Alle Datenpunkte stellen Mittelwerte aus Duplikaten dar, die sich weniger als 10% voneinander unterscheiden. Die unspezifische Bindung trug in keinem Experiment mehr als 30% zur totalen Bindung bei. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Ergebnissen erhalten.

#### 4.1.3 Adenylylzyklase-Assay mit isolierten Membranen von transient transfizierten HEK293-Zellen

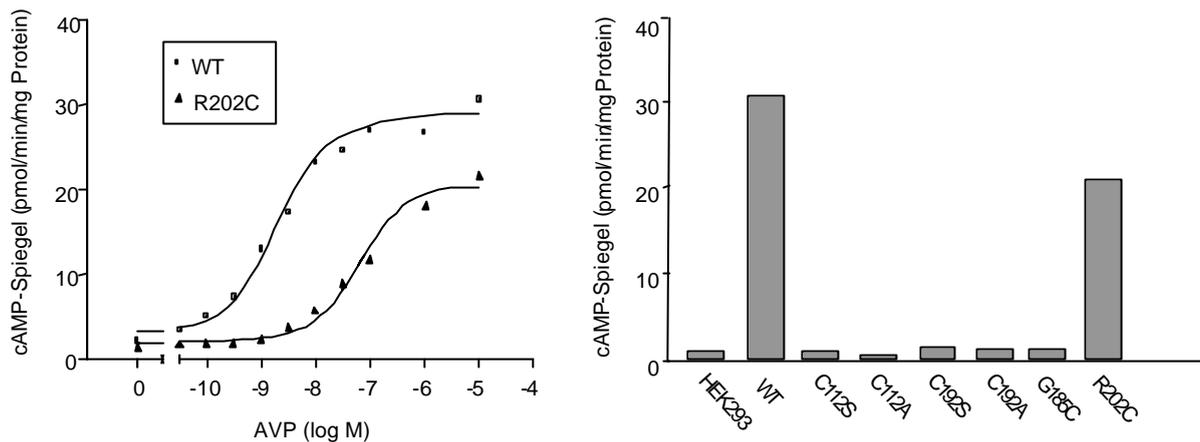
Zur Messung der Adenylylzyklase-Aktivität der Mutanten wurden HEK293-Zellen in 60 mm-Schalen mit allen mutierten Plasmiden transient transfiziert (s. 3.2.13). Anschließend wurde nach Stimulation mit AVP die Adenylylzyklase-Aktivität der Gesamtmembranen mit Hilfe des Umsatzes von [<sup>32</sup>P]ATP bestimmt.

Der wildtypische Rezeptor zeigte eine Dosis-Wirkungs-Kurve, deren EC<sub>50</sub> Wert (1.9 nM) im Einklang mit früheren Daten stand (Schüle et al., 1998b).

Wie in Abbildung 4 ersichtlich, führte der Austausch der konservierten Cysteine C112 und C192 gegen Serin oder Alanin zu einem inaktiven Rezeptor. Die Rezeptormutante G185C zeigte ebenfalls keine Aktivität.

Für den mutierten Rezeptor R202C konnte trotz des negativen Bindungsassays eine

Stimulierung der Adenylylzyklase nachgewiesen werden (siehe Abb. 4). Die Kurve war stark nach rechts verschoben ( $EC_{50}$  Wert 65.3 nM) und die  $EC_{max}$  war im Vergleich zum WT um 35% reduziert. Offensichtlich sind bei diesem mutierten Rezeptor niedrigaffine Bindungsstellen vorhanden, die sich nur mit dem wesentlich sensitiveren Adenylylzyklase-Assay nachweisen lassen.



**Abb. 4 : Adenylylzyklase-Aktivitätsassays für den wildtypischen und die mutierten V2-Rezeptoren an Gesamtmembranen von transient transfizierten HEK293 Zellen.**

Die Daten stellen Mittelwerte zweier, voneinander unabhängiger Experimente dar (jeweils in Duplikaten durchgeführt). Auf der linken Seite sind nur die Dosis-Wirkungskurven für den wildtypischen Rezeptor ( $EC_{50} = 1.9$  nM) und die R202C-Rezeptormutante ( $EC_{50} = 65.3$  nM) dargestellt. Die Dosis-Wirkungs-Kurven der mutierten Rezeptoren C112S, C112A, C192S, C192A, G185C überlappen mit der x-Achse und sind deshalb nicht gezeigt. Zur besseren Übersicht sind auf der rechten Seite alle Werte nach Stimulierung mit  $10\mu\text{M}$  AVP (maximale Stimulierbarkeit) dargestellt. Die Werte für die Duplikate der einzelnen Experimente unterscheiden sich weniger als 10%.

Die bei den Rezeptormutanten beobachteten Funktionsverluste könnten, wie oben erwähnt, darauf zurückzuführen sein, daß die AVP-Bindung durch die fehlende oder verschobene Disulfidbrücke ansich nicht mehr gewährleistet ist. Eine andere Möglichkeit wäre eine durch die gewandelte Cysteinstruktur veränderte dreidimensionale Struktur des Proteins, so daß das Qualitätskontrollsystem des ER den Rezeptor nicht mehr passieren lässt und der Transport zur Oberfläche unterbrochen wird.

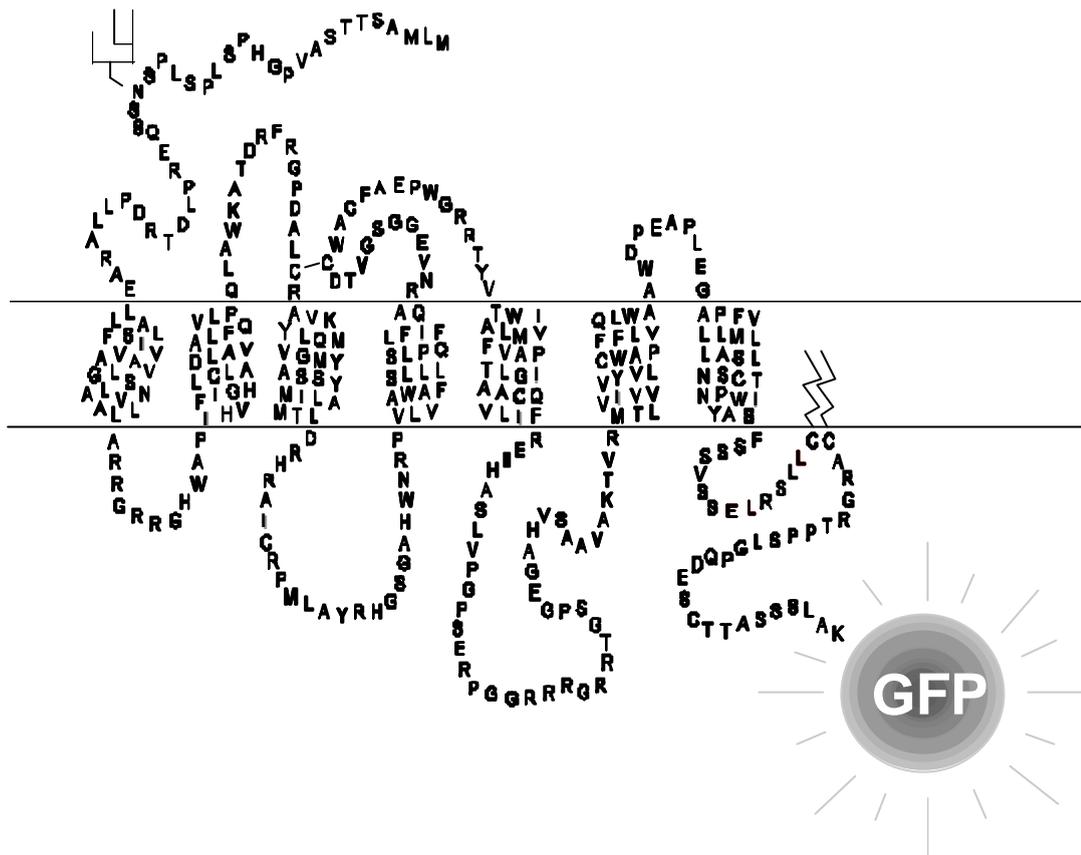
Um heraus zu finden, welche der beiden Möglichkeiten für die in dieser Arbeit hergestellten

Mutanten zutrifft, wurde der intrazelluläre Transport der Proteine mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen untersucht.

#### 4.1.4 Fusion der V2-Rezeptor-Mutanten mit GFP

Für die Konstruktion der entsprechenden GFP-Fusionen wurden die *Srf1/PflMI*-Fragmente der Plasmide pRCDN2, pC112S, pC112A, pC192S, pC192A, pG185C und pR202C (s. 3.1.3.2) in den GFP-Expressionsvektor pEGFP-N1 kloniert (s. 3.2.1). Dieser Vektor kodiert für eine 27 kDa Variante des „Green Fluorescence Proteins“ (EGFP = red shifted GFP). Dabei entstanden folgende rekombinante Plasmide: WT.GFP, pC112S.GFP, pC112A.GFP, pC192S.GFP, pC192A.GFP, pG185C.GFP und pR202C.GFP. Die GFP-Anteile wurden dabei mit dem Rest K367 im C-Terminus fusioniert (s. Abb. 5).

Wir sind davon ausgegangen, daß der GFP-Anteil die V2-Rezeptorfunktion nicht beeinträchtigt (Schülein et al., 1998; Oksche et al., 1998).



**Abb. 5 : Zweidimensionales Topologiemodell der V2-Rezeptor-GFP-Fusionsproteine.**

GFP ist mit K367 fusioniert. Als Beispiel ist der wildtypische V2-Rezeptor (pEU367.GFP) dargestellt.

#### 4.1.5 Lokalisation der GFP-markierten V2-Rezeptor-Mutanten in HEK293-Zellen

Um die mutierten Rezeptoren in der Zelle lokalisieren zu können, wurden HEK293-Zellen mit den Plasmiden C112S.GFP, C112A.GFP, C192S.GFP, C192A.GFP, G185C.GFP, und R202C.GFP transient transfiziert (s. 3.2.13) Die GFP-Fluoreszenzen der Zellen wurden mit Hilfe des Laser-Scanning-Mikroskops (LSM) analysiert (s. Abb. 6, links, grün).

Die Plasmamembranen der gleichen Zellen wurden mit dem eigenfluoreszierenden Farbstoff Trypanblau gefärbt, was in den Abbildungen aufgrund der besseren Auswertbarkeit als rot dargestellt wird (s. Abb. 6, Mitte, rot).

Eine computergestützte Überlagerung der grünen GFP- und der roten Trypanblau-

Fluoreszenzsignale zeigt der rechte Teil der Abb. 6. Gelbe Bereiche weisen auf Kollokalisierung hin, also auf Rezeptoren, die zur Plasmamembran transportiert wurden.

Für den wildtypischen, GFP-markierten V2-Rezeptor wurde eine Überlappung der GFP-Signale mit den Trypanblau-Signalen der Plasmamembran gefunden (s. Abb. 6, WT, rechts, gelb). Dies zeigt, daß der wildtypische Rezeptor erwartungsgemäß zur Zelloberfläche transportiert worden ist. Bei den GFP-Signale im Zellinneren könnte es sich um V2-Rezeptoren handeln, die auf dem Weg zur Plasmamembran sind. Es könnte sich bei den intrazellulären Signalen jedoch auch um Rezeptoren handeln, die aufgrund der Überexpression retiniert werden.

Im Gegensatz zu WT.GFP wurden bei Alanin-Substitutionen der beiden konservierten extrazellulären Cysteinen (C112A.GFP, C192A.GFP) hauptsächlich intrazelluläre GFP Signale gefunden. Hier konnte durch die Überlagerung mit Trypanblau nur eine geringe Menge an der Zelloberfläche lokalisiert werden. Diese Ergebnisse wurden mit den hier nicht gezeigten Serinsubstitutionen (C112S.GFP, C192S.GFP) bestätigt.

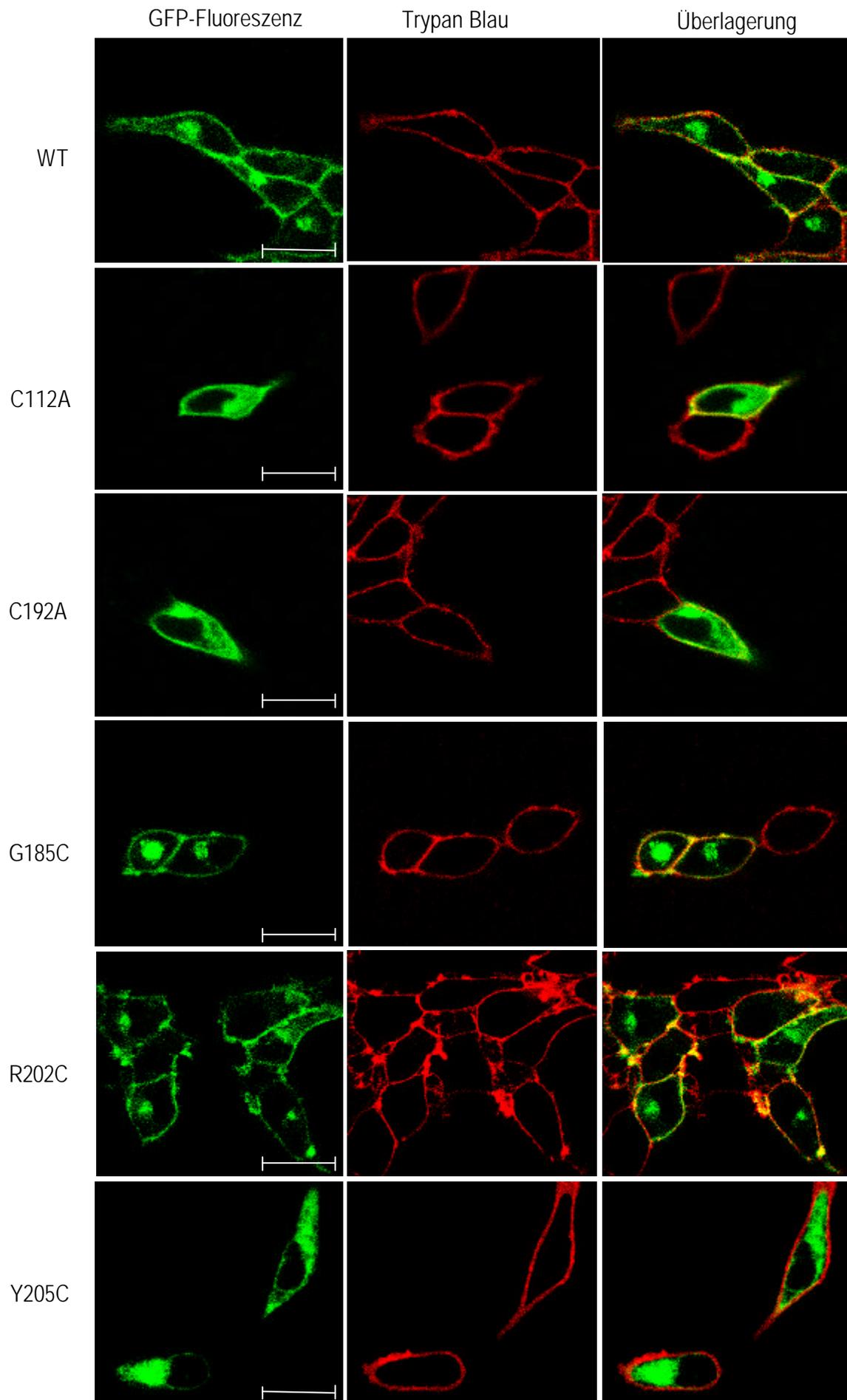
Aus diesen Befunden kann man schlußfolgern, daß die zwischen den beiden konservierten Cysteinen gebildete Disulfidbrücke für den korrekten, intrazellulären Transport notwendig ist. Da die wenigen, an die Oberfläche gelangten mutierten Rezeptoren aber nicht binden können (siehe Abb. 3), kann man auch folgern, daß die konservierten Cysteine zusätzlich für die Ligandenbindung wichtig sind.

Für die beiden NDI-Mutanten G185C.GFP und R202C.GFP wurden GFP-Fluoreszenzen detektiert, die mit denen des WT.GFP vergleichbar waren. Diese beiden Rezeptoren können daher als bindungsdefekt, aber transportkompetent beschrieben werden.

Der Transportdefekt der Mutanten C112.GFP und C192.GFP, bei denen die konservierte Disulfidbrücke nicht mehr ausgebildet werden kann, deutet an, daß hier die Faltung des Rezeptors so stark beeinflusst ist, daß das Qualitäts-Kontrollsystem des ER die Fehlfaltung erkennt und den Rezeptor im Zellinneren zurückhält. Die NDI-Mutanten G185C.GFP und R202C.GFP sind dagegen nur bindungs-, nicht aber transportdefekt. Man kann daraus schlußfolgern, daß diese beiden Mutanten höchstwahrscheinlich die konservierte Disulfidbrücke nicht beeinflussen.

**Abb. 6 (siehe nächste Seite) : Lokalisation von GFP-markierten V2-Rezeptoren in der Plasmamembran von lebenden, transient transfizierten HEK293-Zellen.**

Auf Deckgläsern gewachsene Zellen wurden mit den Plasmiden pC112A.GFP, pC192A.GFP, pG185C.GFP, und pR202C.GFP transient transfiziert. Die Bilder zeigen x/y-Scans der Zellen. Die GFP-Fluoreszenzen der Rezeptoren sind in grün dargestellt (linke Seite). Mitte: Nach Aufnahme der GFP-Fluoreszenz wurde die Plasmamembran derselben Zellen mit Trypanblau gefärbt und diese Fluoreszenz auf einem zweiten Kanal aufgenommen (Mitte in rot). Die Überlagerung der linken und mittleren Bilder zeigt in Gelb Kolokalisation an, d.h. die Rezeptoren die zur Plasmamembran transportiert worden sind (rechte Seite). Die GFP-Fluoreszenz ist nur bei erfolgreich transfizierten Zellen sichtbar, während die Trypanblau-Fluoreszenz der Zelloberfläche an jeder Zelle im Blickfeld zu sehen ist. Maßstab: 25 µm.



## 4.2 Entwicklung eines dreidimensionalen Rezeptormodells

Die hohe Anzahl bekannter NDI-Mutationen mit zusätzlichen extrazellulären Cysteinen legt nahe, daß die Defekte durch die eingefügten Cysteine und nicht etwa durch die eliminierten Reste hervorgerufen werden. Wenn die zusätzlichen Cysteine der Mutanten G185C und R202C die konservierte Disulfidbrücke nicht auflösen, stellt sich die Frage nach weiteren Möglichkeiten für einen cysteinspezifischen Effekt. Um dieser Frage nachzugehen, wurde in Zusammenarbeit mit Gerd Krause (FMP, Berlin) ein dreidimensionales (3D) Rezeptormodell (Abb. 8) entworfen, bei dem vor allem die extrazellulären Regionen berücksichtigt wurden. Die Berechnungen basieren auf Konformationen identischer oder ähnlicher Fragmente anderer Proteine, die in der Brookhaven 3D Protein Datenbank zu finden waren (Abb. 7).

	Peptid-Sequenzen	Datenbank-Identifikationsnummern
<b>Ntt</b>	<b>..LDTRDPLLA.</b> LryRDP RDPL DPLLv	1SRY, 1ASZ, 1CAU 1MMO, 1MMO, 1XND 1PMY
<b>ECL1</b>	<b>PQLAWKATDRFRGPDALC</b> PQLsfr WryTDRF WmvdDRvaGP FmGPegv GPDAL	1ERI 1MTY, 1MMO 1SHV 2LIV 1EDE, 1BVP, 1OMP, 1PKN, 1XIM, 2CCY
<b>ECL2</b>	<b>AQRNVEGGSGVTDCWACFAEPWGRRTY</b> AQRNV VnaGSYV VarGSGV GelDCW fDCW WAedidP yFAEP FAgP PWGtrvY	1BVP 2EBN 1QB2, 1HKS, 1QOR, 1ST3, 2PGD, 4PFK 1BDG 1GMF, 2AAA, 6TAA 1QSO 2ASR, 2LIG 1BXS 1ANS, 1A2V
<b>ECL3</b>	<b>WDPEAPLEGAP</b> WDP PEAP DPTAPiEdqP EGAP EGpP ErpP	1CDG, 1GOF, 1LOE, 1LTE, 1PRC, 1RIN, 1SBA, 2CP4 3MDD, 1HME 1VNC, 1VNE 1BBT 1PRC 1MG1

---

**Abb. 7 (siehe vorherige Seite) : Zuordnung von Proteinfragmenten aus der der Brookhaven 3D Protein Datenbank zu den extrazellulären Domänen des V<sub>2</sub>-Rezeptors.**

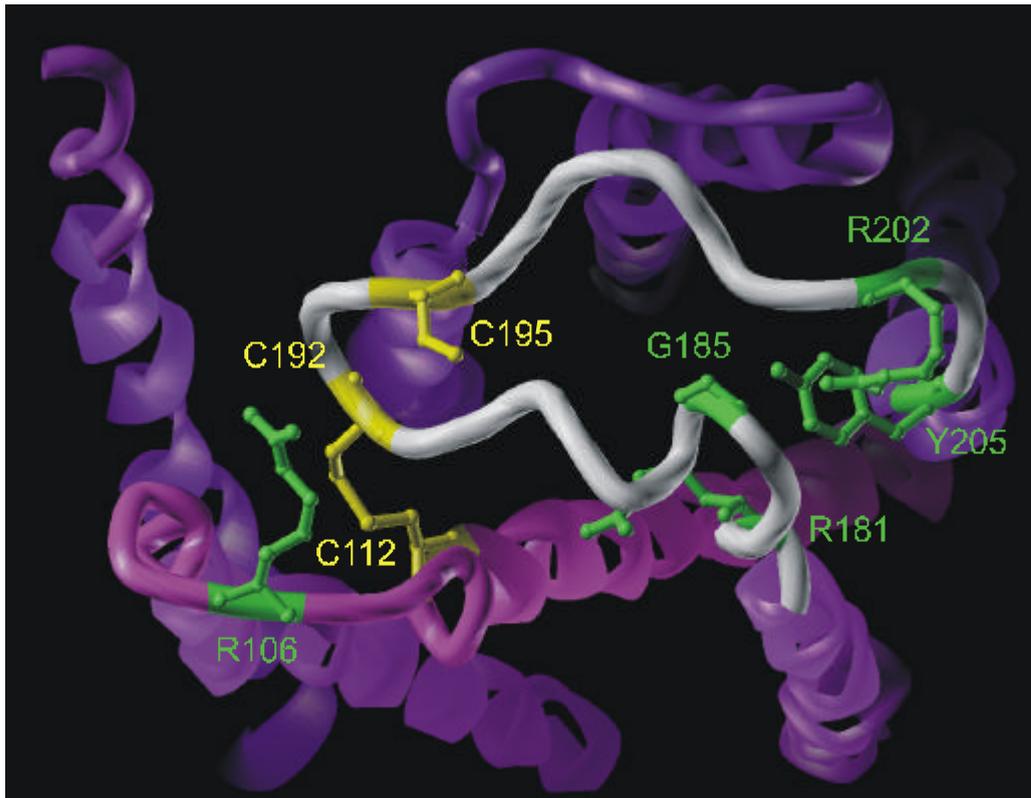
Überlappende Fragmente sind den entsprechenden extrazellulären Schleifen (ECL1, ECL2 and ECL3) und einer Region des N-Terminus des V<sub>2</sub>-Rezeptors zugewiesen. Die V<sub>2</sub>-Rezeptor Sequenz ist in schwarz dargestellt. Große Buchstaben stehen für identische Reste, kleine Buchstaben für ähnliche Reste. Die Datenbank-Identifikationsnummern der Proteine sind auf der rechten Seite gezeigt. Das Vorhandensein von mehr als einer Identifikationsnummer weist auf identische oder ähnliche Fragmente bei verschiedenen Proteinen hin. Für die spätere Berechnung des Modells wurden in diesem Fall ausschließlich die ersten angegebenen Fragmente verwendet.

Das Strukturmodell der extrazellulären Schleifen des V<sub>2</sub>-Rezeptors wurde auf der Basis eines früher veröffentlichten Modells der intrazellulären und transmembranären Domänen (Krause et al., 2000) schrittweise durch Zusammenfügen der Konformation der Proteinfragmente entwickelt. Die Stabilität des entstandenen Modells wurde durch Moleküldynamik-Simulationen überprüft.

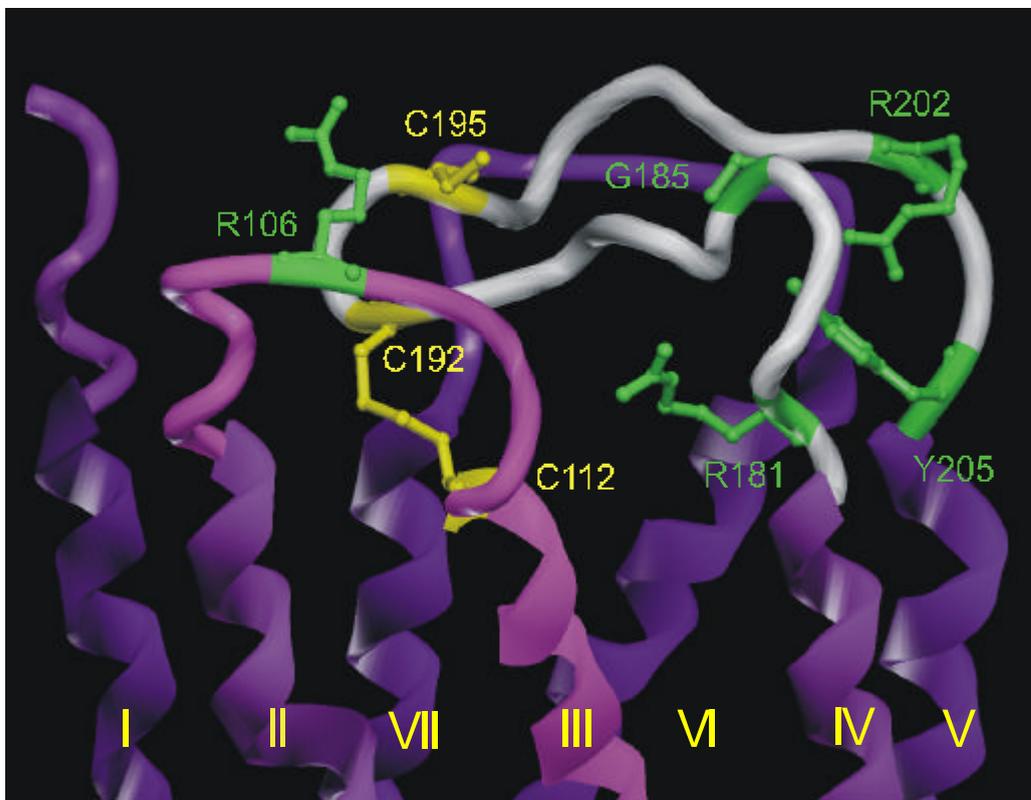
**Abb. 8 (siehe nächste Seite) : Strukturmodell der extrazellulären Domänen des Vasopressin-V<sub>2</sub>-Rezeptors.**

(A) Aufsicht des Modells (extrazellulär). Die konservierte Disulfidbrücke ist zwischen den extrazellulären Cysteinen C112 und C192 ausgebildet. Das freie, nicht konservierte Cystein C195 des Rezeptors ist gelb dargestellt. Grün gekennzeichnet sind die Positionen, an denen bei NDI-Mutationen zusätzliche Cysteine eingeführt werden (R106, R181, G185, R202 und Y205). Der ECL2 (grau) bildet eine U-förmige Schleife, die den Eingang zum größeren Teil der Ligandenbindungstasche umschließt. C195 befindet sich an der Oberfläche des Rezeptors (ungefähr in der Mitte des Moleküls) und ist für die bei NDI-Mutationen eingeführten Cysteine gut erreichbar. (B) Seitenansicht des Rezeptormodells. Die Transmembrandomänen (TM) sind nummeriert.

A



B



Für den Vasopressin-V2-Rezeptor wird vermutet, daß AVP mit seinem zyklischen Teil in eine größere Tasche bindet, die von den oberen Teilen der Transmembrandomäne 3 (TM3), TM4, TM5, TM6 und dem extrazellulären Loop 2 (ECL2) gebildet wird. Das C-terminale Ende bindet dagegen in eine von den TM2, TM3, TM7 und Teilen der ECL1, ECL2, ECL3 gebildeten, kleinere Mulde.

In der Auf- und Seitenansicht des Rezeptormodells (Abb. 8) sind alle relevanten Aminosäurereste gekennzeichnet (extrazelluläre Cysteine C112, C192, C195 und die NDI-Mutationen). Das Modell zeigt, daß der Eingang zur größeren Bindungstasche von einer U-ähnlichen Schleife umgeben ist, die vom zweiten extrazellulären Loop gebildet wird.

Zusätzlich zu den konservierten Cysteinen C112 und C192 enthält der V2-Rezeptor noch einen freien, nicht konservierten extrazellulären Cysteinrest (C195). Dieses C195 liegt in der Mitte der extrazellulären Region des V2-Rezeptors, genau an der Spitze der U-ähnlichen Schleife, in der Nähe der NDI bewirkenden, zusätzlichen Cysteine. Es besteht also die Möglichkeit, daß die zusätzlichen Cysteine der NDI-Mutanten mit C195 eine zweite Disulfidbrücke bilden könnten und dadurch die Ligandenbindungsfähigkeiten beeinträchtigen würden. Die Ausbildung einer zweiten Disulfidbrücke wäre auch aus energetischen Gründen möglich, da die Sulfhydrylgruppe (SH-Gruppe) des freien Cysteins hoch reaktiv ist.

### **4.3 Einfluß von C195 auf die Rezeptorfunktion**

Für die beiden bereits untersuchten mutierten Rezeptoren (G185C und R202C) ist die Bildung einer zweiten Disulfidbrücke unter Beteiligung des C195 sehr gut denkbar. Der einfachste Nachweis einer zweiten Disulfidbrücke wäre die Wiederherstellung der Rezeptorfunktion durch die Mutation von C195 bei den NDI-Mutanten. Bei den entstehenden Doppelmutanten (G185C/C195A, R202C/C195A) könnte unter diesen Bedingungen keine zweite Disulfidbrücke ausgebildet werden. Im günstigsten Fall sollte dadurch die Bindungsfähigkeit bzw. die Transportfähigkeit der NDI-Mutanten wiederhergestellt werden.

Für die Untersuchung solcher Doppelmutanten mußte zuerst sichergestellt werden, daß C195 selbst keinen Einfluß auf die Rezeptorfunktion hat.



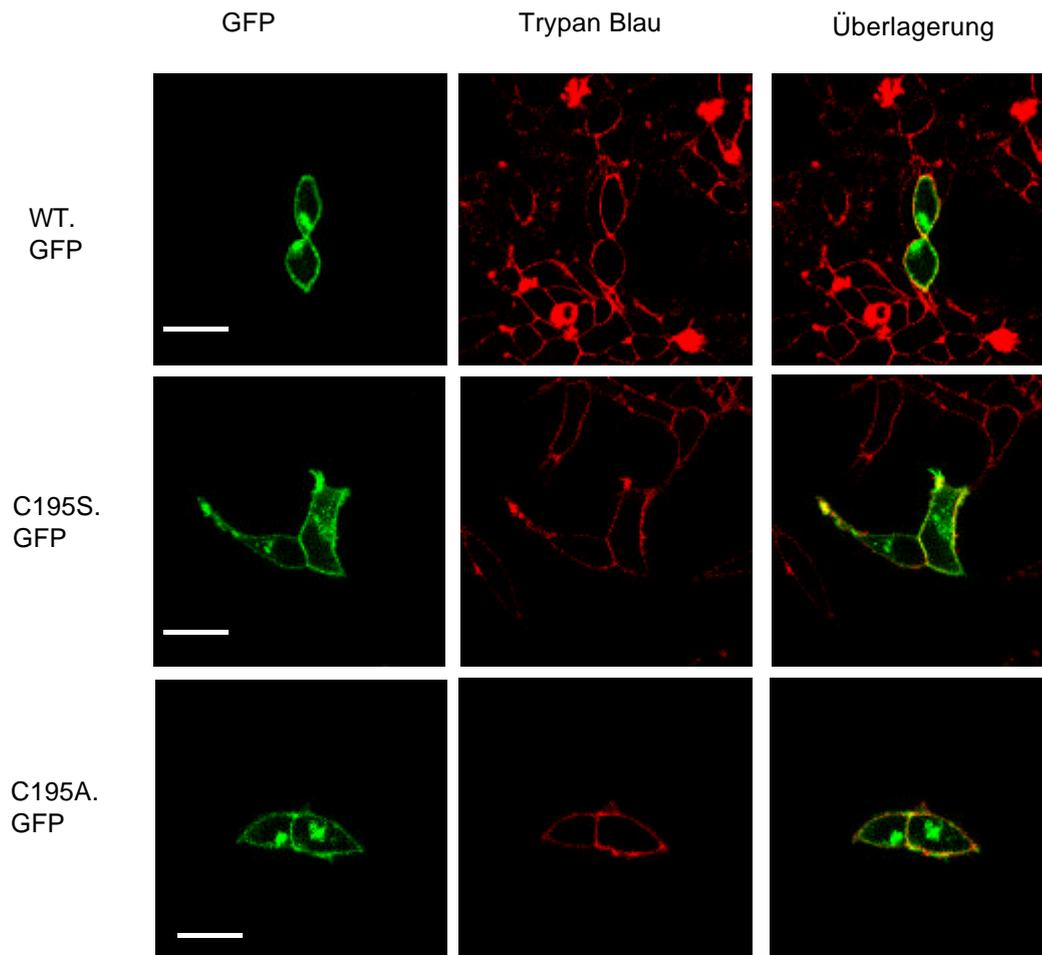
Mit den GFP-Fusionsproteinen der oben genannten Rezeptormutanten C195S und C195A wurden [<sup>3</sup>H]AVP Bindungsstudien und Adenylylzyklaseassays durchgeführt. Alle Rezeptoren waren an der Plasmamembran lokalisiert und funktionell (graphische Ergebnisse nicht gezeigt). Sie unterschieden sich in ihren Eigenschaften unwesentlich vom wildtypischen Rezeptor (WT.GFP  $K_D = 3,4$  nM gegen  $K_D = 3,6$  nM für C195S.GFP und  $K_D = 5,8$  nM für C195A.GFP; WT  $EC_{50} = 1.3$  nM gegen 2.9 nM für C195A.GFP und 3.2 nM für C195S.GFP). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen von Schulz et al. (2000), die für eine C195A Mutante des V2-Rezeptors ebenfalls wildtypische Eigenschaften fanden.

### 4.3.2 Lokalisation der GFP-markierten V2-Rezeptor-Mutanten in HEK293-Zellen

Die GFP-Fluoreszenzen der Rezeptor-Mutanten (195S.GFP und C195A.GFP) wurden in lebenden, transient transfizierten HEK293-Zellen (s. 3.2.13) mit Hilfe des Laser-Scanning-Mikroskops (LSM) lokalisiert (s. Abb. 10, links, grün). Die Zelloberfläche wurde mit Trypanblau gefärbt (s. Abb. 10, Mitte, rot). Eine computergestützte Überlagerung der grünen GFP- und der roten Trypanblau-Fluoreszenzsignale zeigt in gelb Kolokalisation an (s. Abb. 10, rechts, gelb).

Für die C195-Mutanten wurden ähnliche Bilder wie beim Wildtyp erhalten, d.h. die Fluoreszenz war vorwiegend an der Plasmamembran lokalisiert. Die Rezeptoren C195S.GFP und C195A.GFP werden also, wie der wildtypische Rezeptor, an die Zelloberfläche transportiert.

Zusammengefaßt konnte bei den C195S/A-Mutationen kein Einfluß auf die Rezeptorfunktion festgestellt werden. Die Aminosäure Cystein in der Position 195 ist an sich weder für den Transport noch für die AVP-Bindung von Bedeutung. Beide Mutanten sollten also zur Überprüfung der Hypothese der Ausbildung einer zweiten Disulfidbrücke bei den NDI-auslösenden Mutanten geeignet sein.



**Abb. 10 : Lokalisation von GFP-markierten V2-Rezeptoren in der Plasmamembran von lebenden, transient transfizierten HEK293-Zellen.**

Auf Deckgläsern gewachsene Zellen wurden mit den Plasmiden pC195A.GFP und pC195S.GFP transient transfiziert. Die Bilder zeigen x/y-Scans der Zellen. Links: GFP-Fluoreszenzen der Rezeptoren in grün. Mitte: Nach Aufnahme der GFP-Fluoreszenz wurde die Plasmamembran derselben Zellen mit Trypanblau gefärbt und die Fluoreszenz auf einem zweiten Kanal aufgenommen. Die Trypanblau-Fluoreszenzen sind in rot dargestellt. Rechts: Die computergestützte Überlagerung der linken und mittleren Bilder. Eine gelbe Färbung zeigt Kolo-kalisation an, d.h. die Rezeptoren die zur Plasmamembran transportiert werden. Maßstab: 25  $\mu$ m.

## **4.4 Die Substitution von C195 führt zur Wiederherstellung eines funktionellen Phänotyps bei den Rezeptormutanten G185C und R202C**

Um zu überprüfen, ob durch die gleichzeitige Mutation von C195 der Defekt bei den NDI-Mutanten aufgehoben werden kann, wurde die C195A Mutation mit Hilfe gerichteter Mutagenese in die Rezeptormutanten G185C und R202C eingeführt.

### **4.4.1 Gerichtete Mutagenesen für die Doppelmutationen**

Die hierfür benutzten Oligonukleotide sind unter 3.1.3.3 beschrieben. Es entstanden folgende rekombinante Plasmide: pG185C/C195S.GFP, pG185C/C195A.GFP, pR202C/C195S.GFP, pR202C/C195A.GFP (s. 3.1.3.2). Alle Mutationen wurden durch DNA-Sequenzierungen bestätigt.

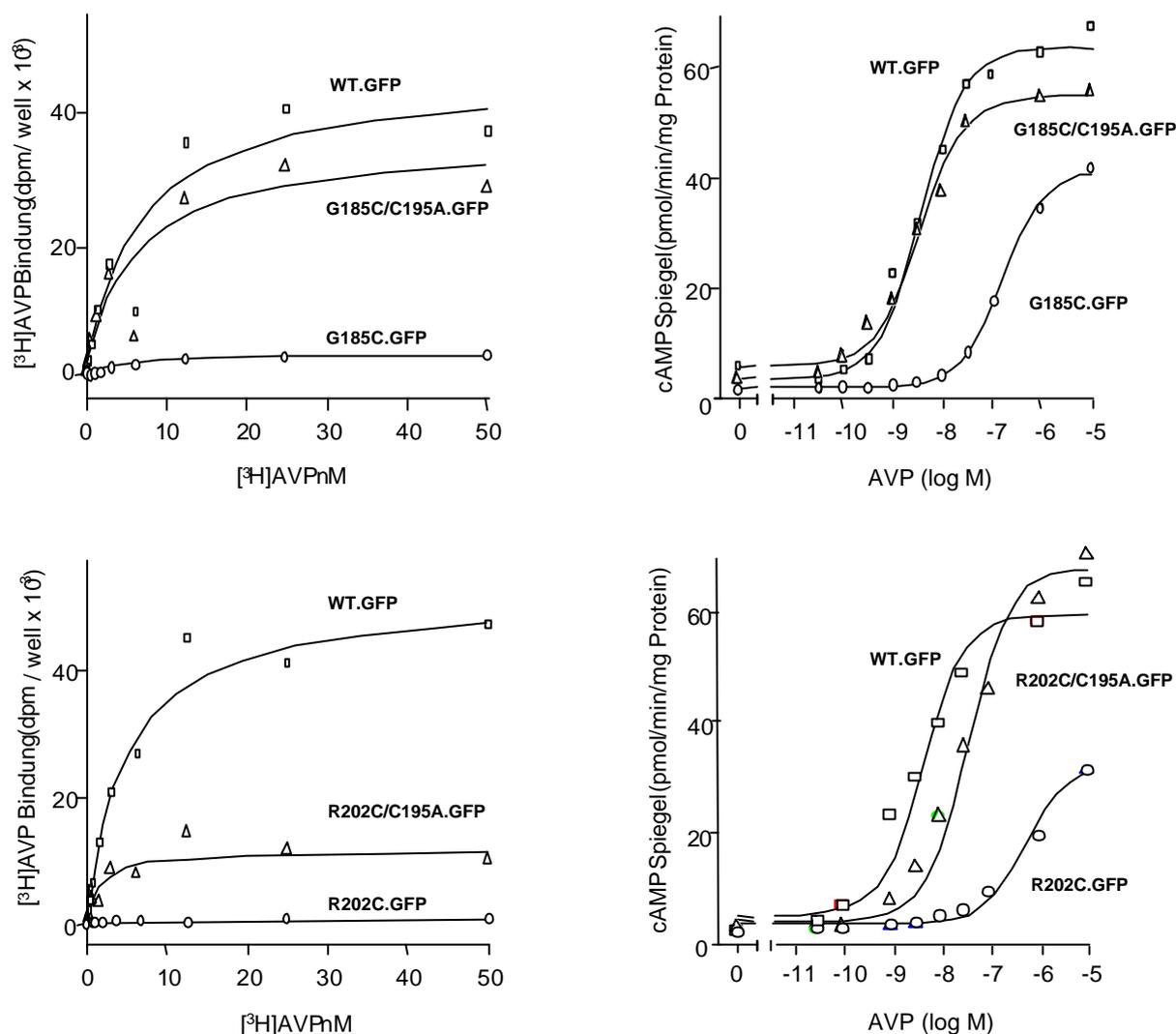
### **4.4.2 Pharmakologische Charakterisierung der Doppelmutanten in transient transfizierten HEK293-Zellen mit Hilfe von [<sup>3</sup>H]AVP-Bindungsstudien und Aktivitätsmessungen der Adenylylzyklase**

Die Plasmide der Doppelmutanten wurden in HEK293-Zellen transient transfiziert (s. 3.2.13). [<sup>3</sup>H]AVP-Bindungskurven (s. 3.2.15.1) wurden an intakten Zellen aufgenommen (Abb. 11, links). Adenylylzyklase-Assays (s. 3.2.16) wurden mit den Gesamtmembranen der Zellen durchgeführt (Abb. 11, rechts). Als Kontrollen diente der WT.GFP und die entsprechenden NDI-Einzelmutanten.

Für beide Doppelmutanten wurden Bindungskurven mit wildtypischen  $K_D$ -Werten erhalten (5.2 nM für G185C/C195A.GFP vs. 5.4 nM für WT.GFP; 2.1 nM für R202C/C195A.GFP vs. 4.7

nM für WT.GFP). Die  $B_{\max}$ -Werte waren dagegen unterschiedlich. Während sich der Wert von G185C/C195A.GFP nur unwesentlich vom Wildtyp unterschied (0.62 pmol/mg vs. 0.93 pmol/mg), war der  $B_{\max}$ -Wert von R202C/C195A.GFP deutlich reduziert (0.24 pmol/mg vs. 0.98 pmol/mg).

Durch die zusätzliche C195A Mutation konnten bei allen NDI-Mutanten wieder wildtypische  $EC_{\max}$ -Werte erreicht werden. Die  $EC_{50}$ -Werte der Doppelmutanten lagen im wildtypischen Bereich oder waren geringfügig nach rechts verschoben (3.4 nM für G185C/C195A.GFP vs. 3.4 nM für WT.GFP vs. 159 nM für die Einzelmutante G185C.GFP; 33,20 nM für R202C/C195A.GFP vs. 3.8 nM für WT.GFP vs. 503 nM für die Einzelmutante R202C.GFP). cAMP wurde beim Nachweis im Adenylylzyklase-Assay auch bei den mit GFP-gekoppelten Einzelmutanten gebildet, was wir, wie in Abb. 4 sichtbar, für die Mutante R202C schon zeigten, nicht aber für die ungekoppelte G185C-Mutante. Trotzdem zeigen diese Ergebnisse, im Einklang mit den Bindungsexperimenten, daß die Funktion der NDI-Rezeptormutanten durch eine zusätzliche C195A-Mutation wiederhergestellt werden kann.



**Abb. 11 : Charakterisierung der Doppelmutanten in transient transfizierten HEK293-Zellen.**

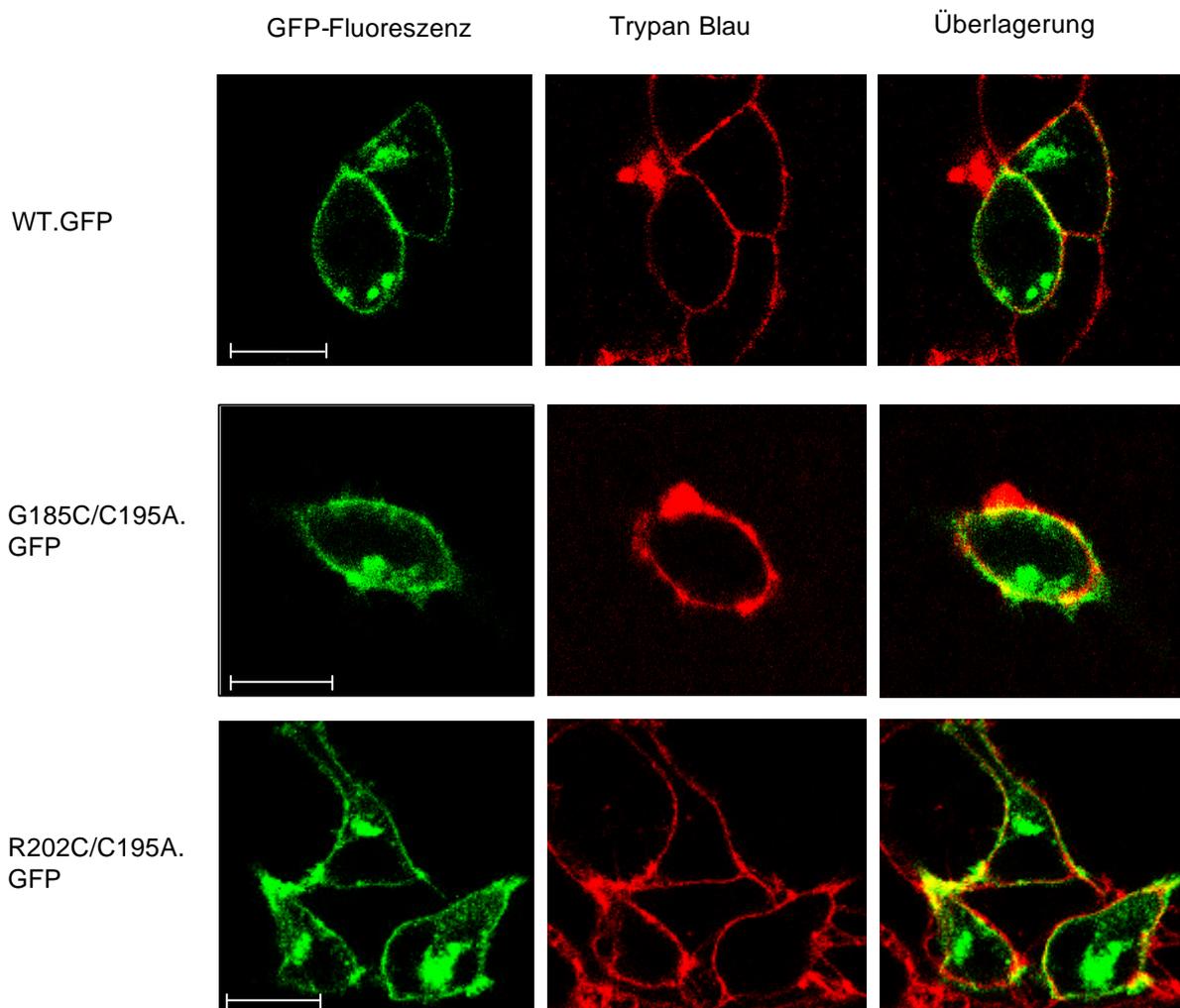
(Links) Spezifische  $[^3\text{H}]\text{AVP}$ -Bindung intakter HEK293-Zellen, die G185C/C195A.GFP und R202C/C195A.GFP exprimierten. Als Kontrolle dient der wildtypische, GFP-markierte Rezeptor und die entsprechenden NDI-bewirkenden Einzelmutante (G185C.GFP, R202C.GFP). Allen Werten liegen Duplikate zugrunde, die sich in weniger als 10% voneinander unterscheiden. Die unspezifische Bindung betrug in keinem Experiment mehr als 30% der totalen Bindung. (Rechts) AVP-Dosis-Wirkungs-Kurve zur Aktivitätsmessung der Adenylylzyklase mit Membranen von HEK293-Zellen, die G185C/C195A.GFP und R202C/C195A.GFP exprimierten. Als Kontrollen dienten Membranen, die den wildtypischen GFP-markierten Rezeptor und die NDI-Einzelmutanten exprimierten (G185C.GFP, R202C.GFP). Allen Werten liegen Duplikate zugrunde, die sich in weniger als 10% voneinander unterscheiden.

#### 4.4.3 Lokalisation der GFP-markierten V2-Rezeptor-Doppelmutanten G185C/C195A.GFP und R202C/C195A.GFP in HEK293-Zellen

In den [<sup>3</sup>H]AVP Bindungsexperimenten wurde gefunden, daß die B<sub>max</sub> der Doppelmutante R202C/C195A.GFP signifikant niedriger liegt als die des WT.GFP. Dies kann entweder auf die verminderte Expression des Proteins und /oder auf den verringerten Transport an die Zelloberfläche zurückzuführen sein, was auf der Freisetzung des Cysteins an der Position 202 beruhen könnte.

Um die Expression und die zelluläre Verteilung der Doppelmutanten zu untersuchen, wurden ihre GFP-Fluoreszenz-Signale in transient transfizierten HEK293-Zellen mit Hilfe des LSM analysiert (s. 3.2.17).

Die Oberfläche der Zellen wurde mit Trypnablau angefärbt (s. 3.2.17). Die Überlagerung beider Fluoreszenzen (s. 3.2.17) zeigt die Rezeptoren an, die in der Plasmamembran lokalisiert sind (siehe Abb. 12).



**Abb. 12 : Lokalisation der GFP-markierten Doppelmutanten in der Plasmamembran von lebenden, transient transfizierten HEK293-Zellen.**

Auf Deckgläsern gewachsene Zellen wurden mit den Plasmiden pG185C/C195A.GFP und pR202C/C195A.GFP transient transfiziert. Die Bilder zeigen x/y-Scans der Zellen. Links: GFP-Fluoreszenzen der Rezeptoren in grün. Mitte: Nach Aufnahme der GFP-Fluoreszenz wurde die Plasmamembran derselben Zellen mit Trypanblau gefärbt und die Fluoreszenz auf einem zweiten Kanal rot aufgenommen. Rechts: Die computergestützte Überlagerung beider Bilder. Eine gelbe Färbung zeigt Kollokalisierung an, d.h. Rezeptoren, die an die Plasmamembran transportiert wurden. Maßstab: 25 µm. Die Ergebnisse wurden in vier unabhängigen Experimenten verifiziert.

Wie in Abb. 12 zu sehen, sind die Fluoreszenzsignale beider Doppelmutanten G185C/C195A.GFP und R202C/C195A.GFP denen des WT sehr ähnlich. Diese Bilder zeigen, daß beide Mutanten in, untereinander und mit dem Wildtyp, vergleichbaren Mengen zur Zelloberfläche transportiert werden.

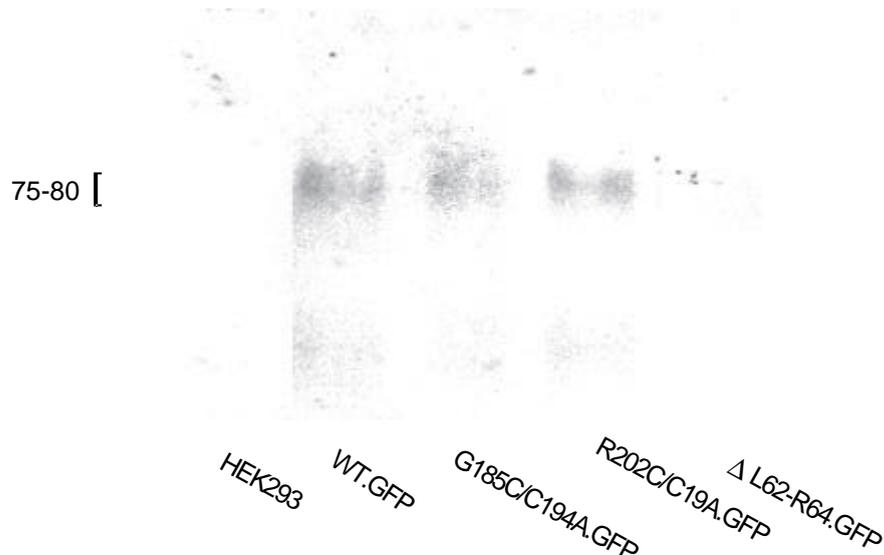
Diese Ergebnisse legen nahe, daß die bei den Bindungsversuchen gefundene verringerte  $B_{\max}$  des Rezeptores R202C/C195A.GFP nicht durch einen Transport- oder Expressionsdefizit zustand kommt.

#### 4.4.4 Nachweis der GFP-markierten V2-Rezeptor-Doppelmutanten G185C/C195A.GFP und R202C/C195A.GFP auf HEK293-Zellen mit Hilfe der Biotinylierung

Um den in den LSM-Experimenten gefundenen Transport der Doppelmutanten zu bestätigen, wurden Biotinylierungsexperimente mit intakten, transient transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt.

Dabei wurden die mit Sulfo-NHS-Biotin markieren Oberflächenproteine intakter Zellen mit Neutravidin präzipitiert und auf eine SDS-PAGE aufgetragen. Die Detektion der Rezeptoren erfolgte im Immunoblot mit polyklonalem anti-GFP Antiserum und anti-Kaninchen  $^{125}$ I-IgG.

Als Positivkontrolle für den Transport diente WT.GFP, als Negativkontrolle die transportdefekte, NDI-bewirkende Deletionsmutante  $\Delta$ L62-R64.GFP (Krause et al., 2000) des V2-Rezeptors.



**Abb. 13 : Nachweis der GFP-markierten Doppelmутanten G185C/C195A.GFP und R202C/C195A.GFP an der Zelloberfläche von transient transfizierten HEK293 Zellen.**

Membranproteine intakter Zellen werden mit Sulfo-NHS-Biotin markiert, mit Neutravidin isoliert und auf eine SDS-PAGE aufgetragen. Die Rezeptoren wurden im Immunoblot mit polyklonalem anti-GFP Antiserum und anti-Kaninchen  $^{125}\text{I}$ -IgG detektiert. Als Positivkontrolle für den Transport an die Oberfläche diente WT.GFP, als Negativkontrolle die transportdefekte NDI-bewirkende Deletionsmutante  $\Delta\text{L62-R64.GFP}$  (Krause et al., 2000).

In Übereinstimmung mit den LSM-Experimenten konnte für den Wildtyp und die beiden Supressormutanten G185C/C195A.GFP und R202C/C195A.GFP in der Plasmamembran die gleichen Mengen der 75-80 kDa komplex-glykosylierten Form gefunden werden. Diese Ergebnisse bestätigen, daß die reduzierte  $B_{\text{max}}$  von R202C/C195A.GFP nicht auf einen verringerten Transport des Rezeptors an die Oberfläche zurückzuführen ist.

## 4.6 C195 in der Evolution des V2-Rezeptors

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß C195 des V2-Rezeptors für die Ausbildung der Krankheit nephrogener Diabetes insipidus eine wichtige Rolle spielt. Diese Aminosäure macht den Rezeptor sensitiv für Mutationen, die zusätzliche, extrazelluläre Cysteine einfügen. Bemerkenswerterweise zeigt ein Alignment aller bekannten Vasopressin-V2-Rezeptoren (Abb. 14), daß bei den Rezeptoren von Schwein, Ratte, Maus, Rind und Hund in der Position 195 kein Cystein vorhanden ist. Dies wirft die Frage auf, wann dieser „ungünstige“ Rest in der Evolution eingeführt wurde.

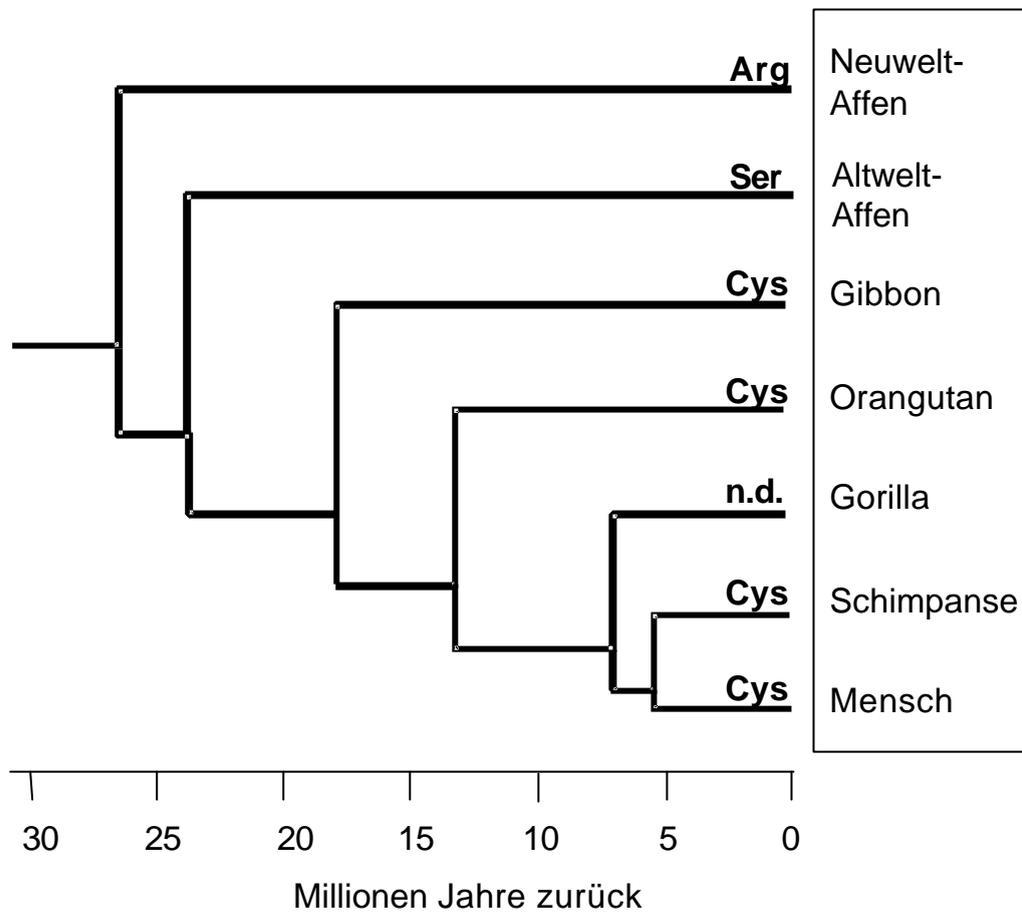
	192	195	
Mensch	RNVEGGSGVTD	CWAC	FAEPWGRRTYV
Schwein	RDVGDGSGVLD	CWAS	FAEPWGLRAYV
Rind	RDV • DGSGVLD	CWAR	FAEPWGLRAYV
Hund	RDVGNGSGVLD	CWAH	FAEPWGLRAYV
Ratte	RDVGNGSGVFD	CWAR	FAEPWGLRAYV
Maus	RDVGNGSGVFD	CWAR	FAEPWGLRAYV

**Abb. 14 : Vorkommen von C195 bei verschiedenen Säugerspezies.**

Dargestellt ist die zweite extrazelluläre Schleife der V2-Rezeptoren verschiedener Wirbeltiere. Das Alignment wurde mit der SWISS-PROT und der EMBL Datenbank durchgeführt. Das konservierte Cystein C192 und das nichtkonservierte C195 sind in Schwarz dargestellt.

Dieser Frage nachgehend, wurden die Sequenzen für die zweite extrazelluläre Schleife des Rezeptors von verschiedenen Primaten DNA's amplifiziert und sequenziert. Überraschenderweise findet sich C195 nicht bei allen Primaten. Neuwelt- und Altwelt-Affen weisen an dieser Stelle ein Serin bzw. Arginin auf. Erst bei den Gibbons ist an der Stelle 195 ein Cystein vorhanden. C195

wurde damit erst vor 20-30 Millionen Jahren bei Primaten eingeführt.



**Abb. 15 : Konservierung von C195 bei Primaten.**

Rezeptorsequenzen für die zweite extrazelluläre Schleife wurden bei den angegebenen Primaten von der genomischen DNA amplifiziert und anschließend sequenziert. Der phylogenetische Stammbaum der Primaten wurde von Goodman (1996) übernommen.

Die Sensitivität des V2-Rezeptors für Mutationen, die zusätzliche Cysteine einführen, beruht auf dem freien Cysteinrest C195. Deshalb wurde auch der Frage nachgegangen, wie viele G-Protein gekoppelte Rezeptoren der Klasse 1 mit konservierter Disulfidbrücke eine ungerade Anzahl extrazellulär vorkommender Cysteine aufweisen. Bei diesen Rezeptoren könnten, durch die Einführung eines zusätzlichen Sulfhydrylrestes, ebenfalls veränderte Eigenschaften auftreten.

Wie Abb.16 zeigt, gibt es unter 397 Rezeptoren nur 18 (4,5%) Rezeptoren mit einer ungeraden Anzahl von Cysteinen. Wenn man die Rezeptoren an sich bewertet und die Aufteilung auf

verschiedene Spezies ignoriert, sind es sogar nur 12. Das Vorhandensein einer ungeraden Anzahl extrazellulärer Cysteine ist damit in dieser Proteinfamilie sehr selten.

		Ntt	T1
V2r_hum	5	.....MLMASTTSAVPGHPSLPSLPSNSSQERPLDTRDPLLARAE	
Opsd_hum	3	.....MNGTEGPNFYVPPFSNATGVVRSPPFEYPQYYLAEPWQFSML	
Opsd_bov	3	.....MNGTEGPNFYVPPFSNKTGVVRSPPFEAPQYYLAEPWQFSML	
Opsd_rat	3	.....MNGTEGPNFYVPPFSNITGVVRSPPFEQPQYYLAEPWQFSML	
D4dr_mou	5	.....MGNSSATEDGGLLAGRGPESLGTGAGLGGAGAAA	
D4dr_rat	5	.....MGNSSATGDGGLLAGRGPESLGTGTGLGGAGAAA	
Rgr_bov	3	.....MAESGTLPTGFGELEVLAV	
Rgr_hum	3	.....MAETSALPTGFGELEVLAV	
B1ar_mou	5	.....MGAGALALGASEP[ <b>C</b> ]NLSSAAPLPDGAATAARLLVLASPPASLLPPASEGSAPLSQQWTAGM	
B1ar_rat	5	.....MGAGALALGASEP[ <b>C</b> ]NLSSAAPLPDGAATAARLLVLASPPASLLPPASEGSAPLSQQWTAGM	
Hh2r_hum	5	.....MAPNGTASSF[ <b>C</b> ]LDSTAK[ <b>C</b> ]KITI	
5h2a_rat	7	MEIL[ <b>C</b> ]EDNISLSSIPNSLMQLGDGPRLYHNDNFSRDANTSEASNWTIDAENR[ <b>C</b> ]T[ <b>C</b> ]L[ <b>C</b> ]S[ <b>C</b> ]I[ <b>C</b> ]L[ <b>C</b> ]H[ <b>C</b> ]L[ <b>C</b> ]Q[ <b>C</b> ]E[ <b>C</b> ]KNWS	
5h2b_rat	5	.....MASSYKMQSEQSTISEHILQK[ <b>C</b> ]DHLILTD[ <b>C</b> ]RSGLKAESAAEEMKQTAENQNTVHWA	
5h2c_hum	5	.....MVNLRNAVH[ <b>C</b> ]SFLVHLIGLLVWQ[ <b>C</b> ]DISVSPVAAIVTDIFNTSDGGRFKFPDGVQ[NW]	
5h5b_mou	5	.....MEVSNLSGATPGLAFPPGPES[ <b>C</b> ]SDSPSSGRSMGSTPGGLILPGREPP[ <b>C</b> ]SAFTVLV	
5h5b_rat	5	.....MEVSNLSGATPGIAFP[ <b>C</b> ]GPES[ <b>C</b> ]SDSPSSGRSMGSTPGGLILSGREPP[ <b>C</b> ]SAFTVLV	
Ssr1_hum	3	.....MFPNGTASSPSSPSPSPGS[ <b>C</b> ]GEGGSRGPGAGAADGMEEPGRNASQNGT[ <b>C</b> ]LESEQGSAILI	
Grhr_pig	3	.....MANSASPEQNQNH[ <b>C</b> ]SAINSSILLTQGNLPTLTLSPNIR	

	T2	ECL1	T3	T4	ECL2	T5	T6	ECL3	T7
V2r_hum	5	WKATDR..FRGPDALCRA	AQRNVE....GGSGVTD[ <b>C</b> ]WAC[ <b>C</b> ]FAE....PWGRRTY	AWDPEAP...LEGAPFV~~~					
Opsd_hum	3	TSLHG..YFVFGPTGCNL	SRYI.....PEGLQ[ <b>C</b> ]SCGIDY..YTLKPEVNNESF	FTHQG...SNFGPIFMT~~~					
Opsd_bov	3	TSLHG..YFVFGPTGCNL	SRYI.....PEGMQ[ <b>C</b> ]SCGIDY..YTPHEETNNESEF	FTHQG...SDFGPIFMT~~~					
Opsd_rat	3	TSLHG..YFVFGPTGCNL	SRYI.....PEGMQ[ <b>C</b> ]SCGIDY..YTLKPEVNNESF	FTHQG...SNFGPIFMT~~~					
D4dr_mou	5	SEVQGG.VWLLSPRICDT	NDVP.....GRDPAV[ <b>C</b> ]CL.....ENRDY	ALCPACF...VSPRLVS~~~					
D4dr_rat	5	SEGGV...WLLSPRICDT	NDVP.....GRDPTV[ <b>C</b> ]CL.....EDRDY	ALCPACF...VSPRLVS~~~					
Rgr_bov	3	SLLRR...WPYGSDGCA	GHYD.....YEPLGT[ <b>C</b> ]CTLDY...SRGDRNFTSF	TIADA...TSISPKLQM~~~					
Rgr_hum	3	SLLRR...WPYGSDGCA	GHYD.....YEPLGT[ <b>C</b> ]CTLDY...SKGDRNFTSF	VIADV...TSISPKLQM~~~					
B1ar_mou	5	IVVWGR..WEYGSF[ <b>C</b> ]CEL	WWRAESDEARRCYNDPK[ <b>C</b> ]CDF.....VTNRA	AFHRDL...VPDRLFV~~~					
B1ar_rat	5	IVVWGR..WEYGSF[ <b>C</b> ]CEL	WWRAESDEARRCYNDPK[ <b>C</b> ]CDF.....VTNRA	AFHRDL...VPDRLFV~~~					
Hh2r_hum	5	YQLS[ <b>C</b> ]K..WSFGKVFCNI	WNSRNETSKG..NHTTSK[ <b>C</b> ]KV.....QVNEVY	GLRGD...DAINEVLEA~~~					
5h2a_rat	7	TILYGYR.WPLPSKICAI	LQDDSK....VFKEGS[ <b>C</b> ]CL.....ADDNF	VICKES[ <b>C</b> ]NENVIGALLN~~~					
5h2b_rat	5	TIMFEAT.WPLPLALCPA	IEADV...NAHNIT[ <b>C</b> ]CEL.....TKDRFGSF	ALCDS[ <b>C</b> ]NQ.TTLKTL[ <b>C</b> ]LQ~~~					
5h2c_hum	5	AILYDYV.WPLPRYLCPV	LRDEEK....VFVNNT[ <b>C</b> ]VL.....NDPNF	VLCEKS[ <b>C</b> ]NQKLMKLLN~~~					
5h5b_mou	5	SELSAGRRWQLGRSICHV	WGEAYD....ARLQR[ <b>C</b> ]QV.....SQEPSY	PLCACS...LPPIWKS~~~					
5h5b_rat	5	SELSAGRRWQLGRSICHV	WGEAYD....ARLQR[ <b>C</b> ]QV.....SQEPSY	PLCACS...LPPIWKS~~~					
Ssr1_hum	3	TLLRH...WPFGALLCRL	RTAANS....DGTVA[ <b>C</b> ]NMLMP..EPAQRWL[ <b>C</b> ]VGF	VFAEQ...DDATVSQ~~~					
Grhr_pig	3	WNITVQ..WYAGEFICKV	RMIHLDADSSGQ.TEGFSQ[ <b>C</b> ]VTHGS...FPQWWH[ <b>C</b> ]QAFY	WFDPEMVN.RVSDPVNH~~~					

**Abb. 16 : Extrazelluläre Domänen von Klasse I GPCR, die eine ungerade Anzahl von Cysteinen aufweisen.**

Die Sequenzen wurden den SWISS-PROT und EMBL Datenbanken entnommen. Das Alignment zeigt nur die Sequenzen des N-Terminus (Ntt) und der extrazellulären Schleifen (ECL1, ECL2 und ECL3); die Übergänge zu den Transmembranregionen sind angegeben (T1-T7). Konservierte Cysteine sind schwarz, nicht konservierte grau markiert. Die Zahlen hinter der Rezeptorbezeichnung stellen die gesamte Anzahl der extrazellulären Cysteine des entsprechenden Rezeptors dar. Die Rezeptorabkürzungen wurden direkt aus den oben genannten Datenbanken übernommen: v2r\_hum, humaner Vasopressin-V<sub>2</sub>-Rezeptor; opsd\_hum, humanes Rhodopsin; opsd\_bov, bovines Rhodopsin; opsd\_rat, Rhodopsin der Ratte; d4dr\_mou, D4-Dopamin-Rezeptor der Maus; d4dr\_rat, D4-Dopamin-Rezeptor der Ratte; rgr\_bov, boviner RPE-retinal G Protein-gekoppelter Rezeptor; rgr\_hum, humaner RPE-retinal G Protein-gekoppelter Rezeptor; b1ar\_mou, beta-1-adrenerger-Rezeptor der Maus; b1ar\_rat, beta-1-adrenerger-Rezeptor der Ratte; hh2r\_hum, humaner histamin-2-Rezeptor; 5h2a\_hum, humaner 5hydroxytryptamine-2a-Rezeptor; 5h2b\_rat, 5hydroxytryptamine-2b-Rezeptor der Ratte; 5h2c\_hum, humaner 5hydroxytryptamine-2c-Rezeptor; 5h5b\_mou, 5hydroxytryptamine-5b-Rezeptor der Maus; 5h5b\_rat, 5hydroxytryptamine-5b-Rezeptor der Ratte; ssr1\_hum, humaner somatostatin-1-Rezeptor; grhr\_pig, gonadotropin-releasing-Hormon-Rezeptor vom Schwein.