

Aus dem Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie und dem Bereich  
Molekulare Pharmakologie und Zellbiologie der  
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Analyse des intrazellulären Transports von fehlgefalteten  
Varianten des Vasopressin-V<sub>2</sub>-Rezeptors

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ingrid Ridelis

aus Mérida, Venezuela

Gutachter: 1. Prof. Dr. W. Rosenthal

2. Prof. Dr. G. P. Püschel

3. Priv.-Doz. Dr. H. Biebermann

Datum der Promotion: 07.09.2012

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b> .....	5
<b>2. Einleitung</b> .....	6
2.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren .....	6
2.2 Targeting von GPCR zum endoplasmatischen Retikulum und die Bedeutung von Signalpeptiden.....	6
2.3 Transport, Faltung und Qualitätskontrolle von Membranproteinen .....	7
2.4 Der Vasopressin-V <sub>2</sub> -Rezeptor und seine physiologische Bedeutung .....	9
2.5 Erkrankungen durch faltungs- und transportdefekte GPCR .....	10
2.6 Pharmakologische Chaperone.....	10
2.7 Photokonvertierbare Fluoreszenzproteine .....	11
<b>3. Zielstellung</b> .....	13
<b>4. Methoden</b> .....	14
4.1 High Throughput Screening-Assay .....	14
4.2 Zelloberflächenbiotinylierung und Immunpräzipitation.....	15
4.3 Laser Scanning Mikroskopie und zellbasierter mKikGR Assay .....	16
4.4 AVP-Bindungs- und cAMP-Akkumulationsstudien .....	16
4.5 Durchflusszytometrie .....	18
4.6 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie .....	18
<b>5. Ergebnisse</b> .....	19
5.1 Entwicklung eines High Throughput Screening-Assays für die Identifizierung von Substanzen, die Faltung und/oder Transport von Membranproteinen beeinflussen .....	19
5.1.1 Etablierung des High Throughput Screening-Assays .....	19
5.1.2 Charakterisierung der für das HTS verwendeten V <sub>2</sub> R-L336T-Mutante .....	21
5.1.3 Screening der Substanzbibliothek und Validierung der Hitsubstanzen.....	22
5.1.4 Substanz 23933 verbessert den Transport der V <sub>2</sub> R-L336T-Mutante zur Zellmembran .....	23
5.1.4.1 Kolokalisation der V <sub>2</sub> R-L336T-Mutante mit dem Zellmembranmarker Trypanblau.....	23
5.1.4.2 Expressionsanalyse der V <sub>2</sub> R-L336T-Mutante mit Hilfe eines Biotinylierungsassays .....	24
5.1.4.3 Analyse der Internalisierung des V <sub>2</sub> R nach Behandlung mit 23933.....	25
5.2 Anwendung verschiedener Methoden zur Quantifizierung der GPCR-Expression .....	26
5.2.1 Quantifizierung der GPCR-Expression mit Hilfe der automatischen Mikroskopie .....	26

5.2.2 Anwendung der Durchflusszytometrie zur Quantifizierung der GPCR-Expression.....	27
5.3 Untersuchung der co- und post-translationalen Wirkung von SR121463B auf den wildtypischen V <sub>2</sub> R und dessen Mutanten S167T und R337X.....	28
5.3.1 mKikGR ist ein monomeres Protein .....	29
5.3.2 Die Stabilität des mKikGR Proteins wird nicht durch Photokonversion beeinflusst.....	30
5.3.3 Analyse der Eigenschaften von V <sub>2</sub> R-mKikGR-Fusionsproteinen.....	31
5.3.3.1 mKikGR-Fusionen haben keinen Einfluss auf das Trafficking wildtypischer und mutierter V <sub>2</sub> R .....	31
5.3.3.2 Pharmakologische Eigenschaften des V <sub>2</sub> R werden nicht durch mKikGR-Fusionen beeinflusst.....	32
5.3.4 Das pharmakologische Chaperon SR121463B kann sowohl co- als auch post-translational wirken.....	33
<b>6. Diskussion</b> .....	<b>34</b>
6.1 Verwendung von HTS-Assays zur Identifizierung pharmakologischer Wirkstoffe.....	34
6.2 Einfluss der Substanz 23933 auf den Transport der V <sub>2</sub> R-L336T-Mutante.....	35
6.3 mKikGR als Fusionsprotein und die Wirkung von SR121463B auf den Transport von V <sub>2</sub> R-Mutanten.....	36
<b>7. Ausblick</b> .....	<b>39</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>40</b>
<b>9. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>42</b>
<b>Anteilerklärung</b> .....	<b>49</b>
<b>Druckexemplare der ausgewählten Publikationen</b> .....	<b>50</b>
<b>Lebenslauf</b> .....	<b>53</b>
<b>Publikationsliste</b> .....	<b>54</b>
<b>Selbständigkeitserklärung</b> .....	<b>55</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>56</b>

## 1. Zusammenfassung

Die Mutationen in den Genen von Membranproteinen führen häufig zu fehlgefalteten Proteinvarianten, die von einem Qualitätskontrollsystem im frühen sekretorischen Weg erkannt und retiniert werden. Resultate solcher Mutationen sind oft Ursache für vererbte Krankheiten. Defekte Vasopressin- $V_2$ -Rezeptoren ( $V_2R$ ) können beispielsweise zu nephrogenem Diabetes Insipidus führen. Einen Ansatzpunkt für die Behandlung dieser Krankheiten stellen pharmakologische Chaperone dar, die den Faltungsprozess verbessern und dadurch den Transport der Rezeptormutanten zur Zellmembran unterstützen. Im Fall des  $V_2R$  wurde der Antagonist SR121463B als pharmakologisches Chaperon beschrieben. SR121463B bindet mit hoher Affinität an den Rezeptor und blockiert die Bindungsstelle des natürlichen Agonisten 8-Arginin-Vasopressin (AVP). Dadurch wird die Faltung erleichtert und die Rezeptoren können besser zur Zellmembran transportiert werden. Aufgrund der hohen Affinität von SR121463B und dessen nahezu irreversible Bindung können die mutierten Rezeptoren an der Zellmembran nicht mehr durch AVP aktiviert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein High Throughput Screening (HTS) Verfahren entwickelt, mit dem Ziel, neue Substanzen zu identifizieren, die den Transport von faltungs- und transportdefekten  $V_2R$ -Mutanten an die Zellmembran verbessern. Mittels dieses HTS wurde eine Bibliothek von über 17.500 Substanzen analysiert. Eine identifizierte Hitsubstanz war in der Lage, den Transport der L336T-Mutante des  $V_2R$  an die Zellmembran stark zu steigern. Die im Rahmen der Entwicklung des HTS-Assays etablierte automatische Mikroskopie wurde auch dazu genutzt, Transportstudien an anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren durchzuführen, beispielsweise an *Corticotropin-Releasing-Factor*-Rezeptoren.

Bisher war ungeklärt, ob pharmakologische Chaperone co- und/oder post-translational wirken. Um dieses zu untersuchen, wurden im zweiten Teil der Arbeit Fusionen des wildtypischen  $V_2R$  und der fehlgefalteten Rezeptormutanten S167T und R337X mit dem photokonvertierbaren Fluoreszenzprotein mKikGR hergestellt. Mit Hilfe eines neu etablierten zellbasierten Assays wurde nachgewiesen, dass SR121463B sowohl co- als auch post-translational wirken kann.

## 2. Einleitung

### 2.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) stellen in Säugerzellen die größte Familie von Zelloberflächenrezeptoren dar. Sie vermitteln den Großteil zellulärer Antworten über Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine). GPCR sind nicht nur Zielmoleküle für Hormone sondern auch an der Verarbeitung von Licht-, Geruchs- und Geschmacksreizen beteiligt (Haga T. und Takeda S., 2006; Rosenbaum *et al.*, 2011). Sie besitzen einen charakteristischen strukturellen Aufbau: Einen extrazellulären N-Terminus, einen intrazellulären C-Terminus und sieben transmembranäre  $\alpha$ -helikale Domänen, welche durch jeweils drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen verbunden sind. Durch die strukturelle Homologie lassen sich GPCR in fünf Gruppen einteilen: die Rhodopsin-, Sekretin- und Glutamat-Familie (Familie A, B und C) und die Adhäsions- und die Frizzled/Taste(2)-ähnlichen GPCR. Die Rhodopsinfamilie stellt zugleich die größte und vielfältigste Familie dar (Fredriksson *et al.*, 2003). GPCR können durch viele verschiedene Liganden aktiviert werden wie z.B. Amine, Ionen, Peptide, Proteine, Lipide und Nukleotide. Auf die Ligandenbindung folgt eine Konformationsänderung, die intrazellulär die Interaktion mit einem G-Protein ermöglicht. G-Proteine bestehen aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta/\gamma$ -Untereinheit. Die Aktivierung der G-Proteine katalysiert die Phosphorylierung von Guanosindiphosphat GDP zu GTP, wodurch die  $\alpha$ -Untereinheit von der  $\beta/\gamma$ -Untereinheit dissoziiert. Je nach Art der G-Protein-Untereinheiten und deren Kombinationen können verschiedene Signalkaskaden aktiviert werden. Die GPCR bilden auch die wichtigsten Zielstrukturen für Arzneimittel. Etwa 60% der zugelassenen Arzneimittel wirken selektiv auf diese Rezeptorfamilie (Heilker *et al.*, 2009; Landry und Gies, 2008).

### 2.2 Targeting von GPCR zum endoplasmatischen Retikulum und die Bedeutung von Signalpeptiden

Der erste Schritt des intrazellulären Transports von Membranproteinen und GPCR ist die Translokation-vermittelte Rezeptorinsertion in die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) (Brodsky, 1998). Während der Biogenese und des Transports von Membranproteinen und sekretorischen Proteinen spielen sog. Signalsequenzen eine wichtige Rolle (Higy *et al.*, 2004; von Heijne, 1985; von Heijne, 1990). Diese Sequenzen werden kurz nach der Synthese an cytosolischen Ribosomen durch den *Signal Recognition Particle* (SRP) erkannt (von Heijne, 1985) und vermitteln den Transfer des Komplexes aus naszierender Kette, SRP und Ribosom an die ER-Membran (Shan und Walter, 2005; Walter und Johnson, 1994). Darüber hinaus werden durch die Signalsequenzen die proteinleitenden Sec-61-Kanäle des Translokons geöffnet, wodurch der Transfer von Proteinketten (Membranproteine oder sekretorische Proteine) in die ER-Membran ermöglicht wird (Belin *et al.*, 1996; Jungnickel und Rapoport,

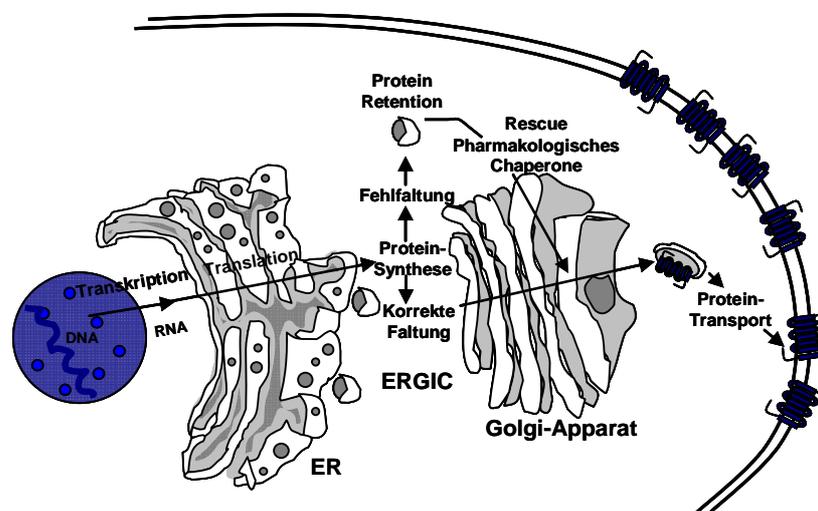
1995; Osborne *et al.*, 2005). Etwa 5 bis 10% der GPCR besitzen als Signalsequenz ein N-terminales Signalpeptid, das durch Signalpeptidasen des ER nach ER-Insertion des Rezeptors abgespalten wird (Higy *et al.*, 2004; Wallin und von Heijne, 1995). Die Mehrheit (90 - 95%) der GPCR verfügen dagegen über Signalankersequenzen (Wallin und von Heijne., 1995). Letztere werden häufig von der ersten Transmembranhelix gebildet, aber auch andere Transmembrandomänen können diese Funktion übernehmen (Audigier *et al.*, 1987). Eine Besonderheit innerhalb der GPCR-Familie stellt bisher der CRF<sub>2a</sub>R dar, der zur Familie der *Corticotropin-Releasing-Factor*-Rezeptoren (CRFR) gehört. Der CRF<sub>2a</sub>R besitzt ein nicht abspaltbares Pseudosignalpeptid, welches eine zusätzliche hydrophobe Domäne am N-Terminus des Rezeptors bildet, dessen Funktion noch nicht vollständig bekannt ist. Das Pseudosignalpeptid ist nicht in der Lage, das Targeting der naszierenden Proteinkette zum ER während der Biogenese zu ermöglichen. Seine Anwesenheit führt zur Verringerung der Expression des Rezeptors und zu einer Unterdrückung der Kopplung des G<sub>i</sub>-Proteins (Schulz *et al.*, 2010).

Da die Signalpeptide von GPCR und anderen Proteinen keine Sequenzhomologie aufweisen (von Heijne, 1985; von Heijne, 1990), stellen sie im Prinzip geeignete Targets dar, um die Synthese von spezifischen Rezeptoren zu regulieren. Bezüglich dieser Targets wurden bereits die ersten peptidischen Inhibitoren des Sec-61-Translokation-Komplexes beschrieben: HUN7293 (Besemer *et al.*, 2005; Garrison *et al.*, 2005) und sein Derivat CAM741 hemmen signalpeptid-selektiv die Translokation des vaskulären Zelladhäsionsmoleküls (VCAM1) am Sec-61-Protein (Besemer *et al.*, 2005; Garrison *et al.*, 2005). Ein weiteres HUN7293 Derivat, Cotransin, inhibiert signalpeptid-selektiv die Translokation von VCAM1, P-Selektin, Angiotensinogen, der  $\beta$ -Lactamase und des CRF<sub>1</sub>R (Garrison *et al.*, 2005). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch die Biosynthese des Endothelin-B-Rezeptors (ET<sub>B</sub>R) durch Cotransin inhibiert werden kann (Westendorf *et al.*, 2011).

### **2.3 Transport, Faltung und Qualitätskontrolle von Membranproteinen**

Nach Synthese und Translokation in die ER-Membran werden Membranproteine über den sekretorischen Weg zur Zellmembran transportiert. Im N-Terminus und/oder den extrazellulären Schleifen erfolgt im ER die Kopplung mannosereicher Glykosylierungen an freie Aminogruppen von Asparaginresten, die später ab dem medialen Golgi-Apparat durch eine komplexe Glykosylierung ersetzt werden (Ruddock und Molinari, 2006). Zusätzlich zu N-Glykosylierungen können im Golgi-Apparat O-Glykosylierungen an die Hydroxylgruppen von Lysinen, Prolinen, Serinen oder Threoninen geknüpft werden (Abeijon *et al.*, 1997). Darüber hinaus finden im ER während und nach der Proteinsynthese Faltungsprozesse statt, welche die Proteine in verschiedene Konformationen überführen können. Eine Gruppe weiterer Proteine, die sog. molekularen Chaperone, unterstützen diesen Faltungsprozess, indem sie das Erreichen eines

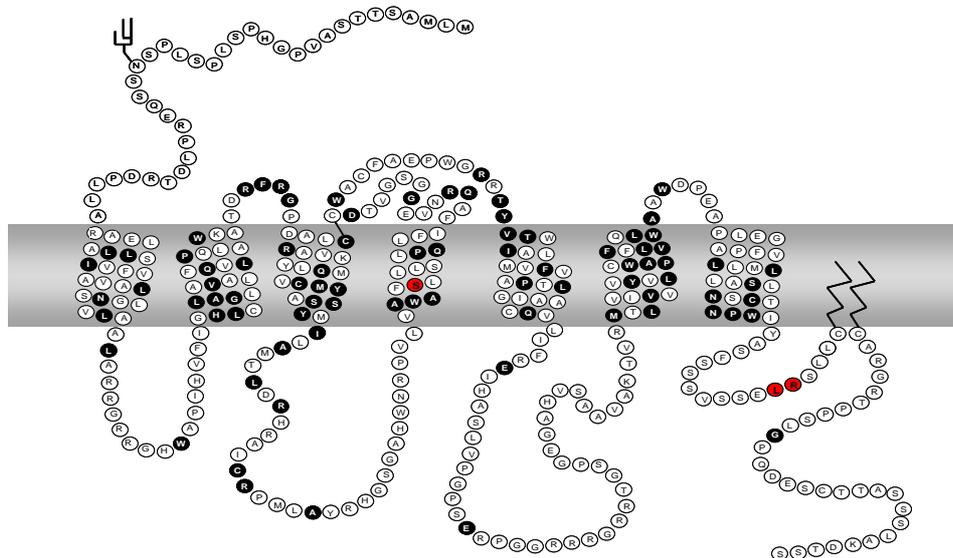
korrekten Faltungszustands erleichtern. Sie interagieren mit noch ungefalteten Proteinen über hydrophobe Sequenzen oder spezifische Glykosylierungen und verhindern so deren Aggregationen (Parodi, 2000; Trombetta und Helenius, 1998). Molekulare Chaperone spielen auch eine wichtige Rolle bei der Qualitätskontrolle von Proteinen im ER durch die Vermittlung der Retention fehlgefalteter Formen (Ellgaard und Helenius, 2003). Das Qualitätskontrollsystem (QCS) lässt in der Folge lediglich den Export korrekt gefalteter Proteine zu. Fehlgefaltete Proteine werden nach ihrer Retention mittels ER-assoziiierter Degradierungsprozesse (ERAD) abgebaut. Nach Retranslokation der Proteine ins Cytosol werden diese ubiquitiniert und schließlich dem proteasomalen Abbau zugeführt (Bonifacino und Weissman, 1998). Alternativ können fehlgefaltete Membranproteine auch intrazelluläre Aggregate bilden (Forloni *et al.*, 2002). Die Qualitätskontrolle von Membranproteinen ist nicht nur auf das ER beschränkt. So erreichen Proteine z.B. teilweise trotz einer Fehlfaltung auch das ER-Golgi-Intermediärkompartiment (ERGIC). In diesem Fall vermittelt das ERGIC den retrograden Transport zum ER über bestimmte Rückführungssignale, die bei Fehlfaltungen exponiert werden (Hermosilla *et al.*, 2004). Im Fall von GPCR umfasst der Transport korrekt gefalteter Proteine den Export aus dem ER über das ERGIC und verläuft über die einzelnen Elemente des Golgi-Apparats zur Zellmembran, wo die Proteine integriert werden (*Secretory Pathway*). Der intrazelluläre Transport von Membranproteinen ist zusammenfassend in Abb. 1 dargestellt.



**Abb. 1: Schematische Darstellung des intrazellulären Transports von Membranproteinen (*Secretory Pathway*).** Die Synthese der Membranproteine findet an der ER-Membran statt, wo sie mit Hilfe von molekularen Chaperonen gefaltet werden. Im ERGIC und im Golgi-Apparat werden die Proteine weiter prozessiert und erreichen nur bei korrekter Faltung die Zellmembran. Die Faltung wird von einem QCS kontrolliert und fehlgefaltete Proteine werden zum ER zurücktransportiert. Nach Retranslokation in das Cytoplasma werden die retinierten Proteinformen durch das Proteasom abgebaut. Pharmakologische Chaperone unterstützen den Transport von fehlgefalteten Proteinen zur Zellmembran, indem sie deren korrekte Faltung im frühen sekretorischen Weg stabilisieren. Abb. entnommen und verändert aus Conn *et al.*, 2007.

## 2.4 Der Vasopressin-V<sub>2</sub>-Rezeptor und seine physiologische Bedeutung

In dieser Arbeit wurde die Faltung und der Transport des Vasopressin-V<sub>2</sub>-Rezeptors (V<sub>2</sub>R) untersucht. Der V<sub>2</sub>R gehört zur Familie A der GPCR, d.h. zu den Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren. Er besteht aus 371 Aminosäureresten und besitzt im N-Terminus am Rest N22 eine N-Glykosylierung sowie O-Glykosylierungen an Serinen und/oder Threoninen (Sadeghi und Birnbaumer, 1999; Sadeghi *et al.*, 1997). Als weitere post-translationale Modifikationen wurden eine Disulfidbrücke zwischen den Resten C112 und C192 und eine Palmitoylierung an den benachbarten Cysteinen C341 und C342 im C-Terminus beschrieben (Abb. 2) (Schülein *et al.*, 1996; Schülein *et al.*, 2000). Der V<sub>2</sub>R wird hauptsächlich in epithelialen Prinzipalzellen des Sammelrohrs der Niere exprimiert. Agonisten und Antagonisten des Rezeptors scheinen mit der gleichen Bindungsstelle zu interagieren (Czaplewski *et al.*, 1998). Einen selektiven Antagonisten des V<sub>2</sub>R stellt z.B. Satavaptan (SR121463B) dar (Serradeil-Le Gal, 2001). Die Bindung des Agonisten 8-Arginin-Vasopressin (AVP) verursacht eine Konformationsänderung des Rezeptors und führt zur Aktivierung des G<sub>αs</sub>-Proteins. Danach wird durch die α-Untereinheit des G-Proteins die membranständige Adenylylcyclase stimuliert und cAMP gebildet, welches wiederum die Proteinkinase A aktiviert. Dies führt zu einer Phosphorylierung des in der Membran von Vesikeln vorliegenden Wasserkanalproteins Aquaporin 2 (AQP2) und die Vesikel fusionieren mit der apikalen Membran der Sammelrohrzelle. Die resultierende erhöhte Wasserpermeabilität ermöglicht die Rückresorption von Wasser aus dem Primärharn der Niere (antidiuretische Wirkung) (Birnbaumer, 2000; Birnbaumer, 2002).



**Abb. 2: Schematische Darstellung des Vasopressin-V<sub>2</sub>-Rezeptors (V<sub>2</sub>R).** Der V<sub>2</sub>R besteht aus 371 Aminosäureresten (im Einbuchstaben-Code gezeigt). Als post-translationale Modifikationen finden sich eine N-Glykosylierung an N22, eine Disulfidbrücke zwischen C112 und C192 sowie zwei Palmitoylierungen an C341 und C342. Schwarz markierte Aminosäurereste stellen Positionen dar, an denen Austausch zu nephrogenem Diabetes Insidus geführt haben. Die Positionen der veränderten Aminosäurereste der in dieser Arbeit verwendeten Rezeptormutanten sind rot unterlegt (S167T, L336T und R337X)

## **2.5 Erkrankungen durch faltungs- und transportdefekte GPCR**

Mutationen bei GPCR führen häufig zu einer Proteinfehlfaltung und dadurch zur Retention durch das QCS der Zellen (Bernier *et al.*, 2004). Bei Fehlfaltungen die vom QCS erkannt werden, muss aber nicht zwangsläufig die intrinsische Funktion des Proteins verloren gegangen sein. Gelegentlich ist das QCS überprotektiv und hält Proteine mit Restfunktion zurück. Die immense Bedeutung von Transport und Faltung von GPCR spiegelt sich in der Vielzahl verschiedener Erkrankungen wider, bei denen transportdefekte GPCR eine Rolle spielen. Beispiele solcher Erkrankungen sind Retinitis Pigmentosa (RP, Mutationen im Gen des Rhodopsin-Rezeptors), Hypogonadotroper Hypogonadismus (HH, Mutationen im Gen des *Gonadotropin-Releasing-Hormon-Rezeptors* GnRHR) oder X-chromosomaler nephrogener Diabetes Insipidus (NDI, Mutationen im Gen des  $V_2R$ ). Im Fall des  $V_2R$  wurden ca. 190 verschiedene Mutationen beschrieben, welche die Erkrankung hervorrufen können (Fujiwara und Bichet, 2005). Fehlgefaltete  $V_2R$  werden im ER oder in anderen Kompartimenten des sekretorischen Weges retiniert (Bichet, 2006; Hermosilla *et al.*, 2004). Physiologisch ist aufgrund solcher Mutationen die Wasserrückresorption aus dem Primärharn der Niere nicht mehr möglich und es resultiert eine Beeinträchtigung der Wasserhomeostase im Körper. Die Krankheit NDI ist daher durch ein übermäßiges Ausscheiden (etwa 20 L/Tag bei Erwachsenen) von verdünntem Urin (<250 mmol/kg, Polyurie) charakterisiert, was zu starkem Durst und erhöhter Flüssigkeitszufuhr führt (Polydipsie). Die Krankheit kommt mit einer Häufigkeit von 1:125.000 bei männlichen Neugeborenen vor.

In dieser Arbeit wurden die beiden NDI verursachenden  $V_2R$ -Mutanten S167T (Bichet *et al.*, 1994; Oksche *et al.*, 1996; Wüller *et al.*, 2004) und R337X (Chen *et al.*, 2002; Hermosilla *et al.*, 2004; Oksche *et al.*, 1998) verwendet, um den Wirkmechanismus von pharmakologischen Chaperonen zu untersuchen. Die Basis für die Etablierung des HTS-Assays stellte die L336T-Mutante des  $V_2R$  (Thielen *et al.*, 2005) dar (Abb. 2).

## **2.6 Pharmakologische Chaperone**

Für eine mögliche Behandlung von Erkrankungen, die durch fehlgefaltete und transportdefekte Membranproteine verursacht werden, bestehen bereits verschiedene pharmakologische Strategien, die sich allerdings noch in experimentellen Stadien befinden. Eine davon basiert auf der Anwendung von sog. pharmakologischen Chaperonen. Dabei handelt es sich um kleine hydrophobe Moleküle (z.B. Agonisten oder Antagonisten eines Rezeptors), die spezifisch an ein Zielprotein binden und die Konformation der Ligandenbindungstasche und somit die korrekte Struktur des gesamten Proteins stabilisieren. Dadurch ist das Zielprotein in der Lage, das QCS zu überwinden und die Zellmembran zu erreichen. Ein Beispiel für ein pharmakologisches Chaperon ist 11-cis-7-ring-retinal, welches die Faltung einer RP-auslösenden Mutante des Opsin-Rezeptors verbessert (Noorwez *et al.*, 2003). Des Weiteren konnten z.B. Mutanten des

GnRHR Rezeptors, die HH verursachen, mit Hilfe von Indolen oder Quinolonen an die Zelloberfläche transportiert werden (Conn und Janovick, 2011). Für den V<sub>2</sub>R wurde der Antagonist SR121463B als pharmakologisches Chaperon beschrieben (Morello *et al.*, 2000). Es wurde postuliert, dass die Substanz post-translational bindet und dadurch die Faltung und den Transport des Rezeptors zur Zellmembran verbessert (Wüller *et al.*, 2004). Allerdings konnte in diesem Fall eine zusätzliche co-translationalen Wirkung nicht ausgeschlossen werden. Der Antagonist SR121463B bindet mit sehr hoher Affinität an den Rezeptor, so dass mutierte Rezeptoren zwar an die Zelloberfläche transportiert werden, die Bindungstasche jedoch blockiert bleibt und die Rezeptoren nicht mehr aktiviert werden können. Für pharmakologische Zwecke wäre es daher sinnvoll, neue Substanzen zu identifizieren, die reversibel oder allosterisch an den Rezeptor binden und somit dessen Aktivierung nach Lokalisation an die Zellmembran durch den Agonisten zulassen. Die Identifizierung neuer pharmakologischer Chaperone für den V<sub>2</sub>R war daher ein Ziel dieser Arbeit.

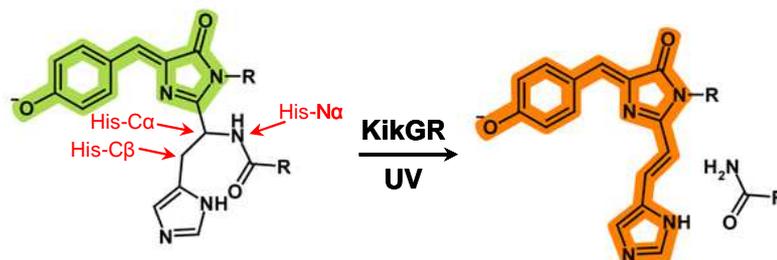
Um Rezeptoren in Zellen mikroskopisch lokalisieren zu können, werden häufig Fusionen mit Fluoreszenzproteinen eingesetzt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand in der Differenzierung der möglichen co- und/oder post-translationalen Wirkung von SR121463B auf den Rezeptortransport. Hierfür wurden photokonvertierbare Proteine als Fusionspartner für den V<sub>2</sub>R genutzt, die im folgenden Kapitel eingehender beschrieben werden.

## **2.7 Photokonvertierbare Fluoreszenzproteine**

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) und seine Derivate fanden bereits sehr erfolgreich in der Zell- und Molekularbiologie Anwendung (Chudakov *et al.*, 2005; Tsien, 1998; Zhang *et al.*, 2002). Mit Hilfe von GFP-Fusionen lassen sich die Lokalisierung von Proteinen und die Proteindynamik verfolgen (Hutter, 2006; Reits und Neefjes, 2001). Ein Nachteil bei der Verwendung von GFP als Markerprotein besteht darin, dass eine Unterscheidung zwischen neu und bereits synthetisierten Proteinen nicht möglich ist.

Kürzlich sind photokonvertierbare Fluoreszenzproteine (PCFP) beschrieben worden, deren Fluoreszenzeigenschaft durch ultraviolette (UV) Bestrahlung verändert werden kann. Beispiele hierfür sind das Kaede-Protein (Ando *et al.*, 2002) und das Kikume-Protein (KikGR und mKikGR). Die Variante mKikGR des Kikume-Proteins stellt eine monomere Form dar, die aus der tetrameren Ursprungsform mittels gerichteter Mutagenese von 21 Aminosäuren konstruiert wurde (Tsutsui *et al.*, 2005; Habuchi *et al.*, 2008). Durch UV-Bestrahlung verschiebt sich die Fluoreszenz von KikGR von grün ( $\lambda_{\text{ex/em}}$  505/517 nm, g-mKikGR) nach rot ( $\lambda_{\text{ex/em}}$  580/591 nm, r-mKikGR) (Habuchi *et al.*, 2008). Die Photokonversion von KikGR führt zu einer irreversiblen Spaltung des Polypeptidrückgrats zwischen N $\alpha$  und C $\alpha$  des Histidins 62 als Folge einer  $\beta$ -Eliminierung (Abb. 3) (Tsutsui *et al.*, 2009). Durch die Anwendung von PCFP lassen sich die beschriebenen Limitationen von GFP umgehen, da nach UV-Bestrahlung die rot

fluoreszierenden Proteine analysiert werden können, die neu synthetisierten Proteine hingegen durch ihre grüne Fluoreszenz von der Analyse ausgeschlossen bleiben (Lippincott-Schwartz *et al.*, 2003; Lukyanov *et al.*, 2005). PCFP bieten damit die einzigartige Möglichkeit, markierte Proteine in Zellen nach Photokonversion in Echtzeit zu verfolgen. Der Nachteil der Verwendung dieser Proteine liegt in deren Neigung Tetramere zu bilden (Ando *et al.*, 2002; Tsutsui *et al.*, 2005). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Kaede als Fusionsprotein geeignet ist, um GPCR-Recycling und -Biosynthese zu untersuchen (Schmidt *et al.*, 2009; Westendorf *et al.*, 2011). Bei Kaede kommt es zu keiner Tetramerbildung, wenn es mit einem Membranprotein fusioniert wird (Schmidt *et al.*, 2009). Das KikGR Protein wurde bisher nur verwendet, um einzelne Zellen oder Zellgruppen innerhalb von Embryonen zu markieren (Kulesa *et al.*, 2008; Nowotschin und Hadjantonakis, 2009; Stark und Kulesa, 2007) oder um den Transport von löslichen Proteinen in sich teilenden Zellkernen zu untersuchen (Shimozono *et al.*, 2009). In dieser Arbeit wurde am Beispiel des V<sub>2</sub>R untersucht, ob sich auch mit KikGR-Fusionen das Trafficking von GPCR analysieren lässt. Hierbei wurde die monomere Form verwendet (mKikGR) um Aggregatbildungen von Beginn an auszuschließen. Ferner wurde mit Hilfe des mKikGR-Proteins ein zellbasierter Assay etabliert, mit dem co- und post-translationale Wirkungen des pharmakologischen Chaperons SR121463B differenziert werden können (Ridelis *et al.*, 2012).



**Abb. 3: Reaktionsmechanismus der Photokonversion von grünem zu rotem mKikGR.** Die Abbildung zeigt die Struktur der KikGR-Chromophore vor (g-KikGR) und nach (r-KikGR) UV-Bestrahlung. Als Folge einer  $\beta$ -Eliminierung findet an den Strukturen von His 62 (N $\alpha$ , C $\alpha$  und C $\beta$ , gekennzeichnet durch die roten Pfeile) die Spaltung des Polypeptidrückgrats statt. Die Abbildung wurde aus Habuchi *et al.*, 2008 entnommen und modifiziert.

### 3. Zielstellung

Mutationen des V<sub>2</sub>R können zu Fehlfaltungen bzw. Transportdefekten und damit zu NDI führen. Pharmakologische Chaperone stabilisieren fehlgefaltete Rezeptoren im frühen sekretorischen Weg und verbessern den Transport zur Zellmembran. Im Fall des V<sub>2</sub>R wurde der Antagonist SR121463B als pharmakologisches Chaperon beschrieben. Die Substanz bindet mit hoher Affinität an den Rezeptor, kann aber nicht durch den Agonisten AVP verdrängt werden. Daher bestand das erste Ziel dieser Arbeit darin, ein HTS mit automatischer Mikroskopie zu etablieren, um neue Substanzen zu identifizieren, die reversibel oder allosterisch an faltungs- und transportdefekte V<sub>2</sub>R-Mutanten binden und deren Transport an die Zellmembran verbessern können. Der Rezeptor wäre dann in der Lage, den Agonisten zu binden und könnte somit aktiviert werden. Als Modell für faltungsdefekte V<sub>2</sub>R-Mutanten wurde die L336T-Mutante gewählt, die einen weitgehenden Transportdefekt zeigt. Der Effekt von Hitsubstanzen sollte zudem mit mikroskopischen und biochemischen Methoden validiert werden.

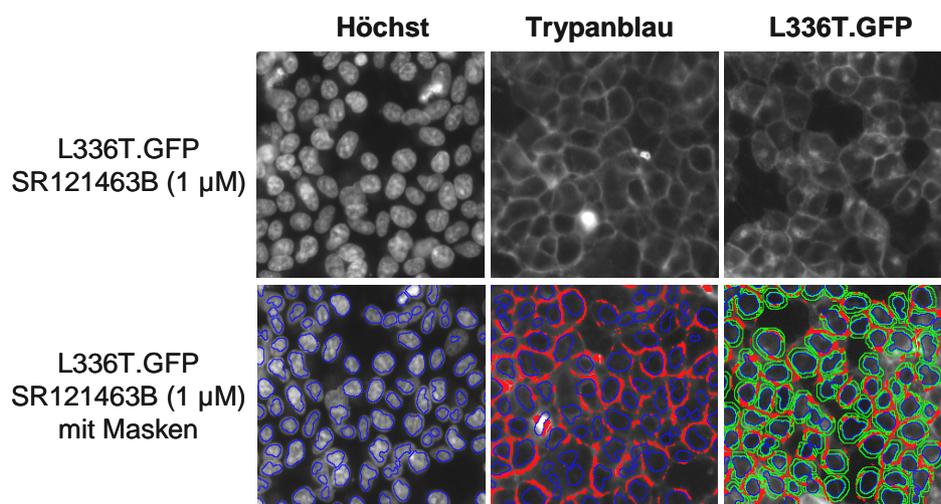
Es sollte darüber hinaus überprüft werden, ob sich die automatische Mikroskopie eignet, um den Transport von anderen GPCR zu untersuchen. Im Rahmen von Kooperationen wurde hierfür das Trafficking von CRF-Rezeptoren analysiert.

Das zweite Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Anwendbarkeit des photokonvertierbaren Fluoreszenzproteins mKikGR als Fusionspartner für GPCR zu überprüfen. Zudem sollte mit mKikGR-Fusionen untersucht werden, ob pharmakologische Chaperone wie SR121463B co- oder post-translational wirken. Als Modelle wurden der wildtypische V<sub>2</sub>R sowie die transportdefekten NDI-Mutanten S167T und R337X verwendet. Zunächst sollte mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) bestätigt werden, dass mKikGR in zellulärem Milieu ausschließlich Monomere bildet. Außerdem sollte die Stabilität des Proteins nach Photokonversion und schließlich die pharmakologischen Eigenschaften der fusionierten Rezeptoren überprüft werden. Zur Analyse des co- bzw. post-translationalen Wirkmechanismus von SR121463B sollte ein zellbasierter Assay auf Basis von mKikGR Fusionen entwickelt werden.

## 4. Methoden

### 4.1 High Throughput Screening-Assay

Für das High Throughput Screening (HTS) wurden HEK-293-Zellen verwendet, welche die transportdefekte V<sub>2</sub>R-Mutante L336T.GFP stabil exprimierten. Die Zellen (5000/Well) wurden in Kollagen-beschichtete 384-Wellplatten ausgesät und bei 37 °C für 32 h kultiviert. Danach erfolgte die Zugabe der zu testenden Substanzen in einer Endkonzentration von 25 µM für weitere 16 h (17.951 Substanzen aus der ChemBioNet Bibliothek des Leibniz-Instituts für Molekulare Pharmakologie, FMP). Insgesamt wurden 32 Wells zur Kontrolle mit DMSO (0,1%, Negativkontrolle), SR121463B (1 µM, Positivkontrolle) und nicht transfizierten Zellen versetzt (um den Signalhintergrund des Systems zu definieren). Für den Transfer der Substanzen auf die Wellplatten wurde ein Sciclone ALH-3000 & Twister II Roboter verwendet. Nach der Inkubation mit den Substanzen wurden die Zellkerne mit 1 µM Höchst 3358 für 30 min gefärbt und die Zellkernmasken (Abb. 4) mit Hilfe des ArrayScan HCS Reader Automated Fluorescence Microscopic Imaging Systems aufgezeichnet. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS-CM (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4) unter Verwendung des automatischen Mikroplatten-Washers BioTek Elx405 Select CW und des Programms CoreCell gewaschen. Die Zellmembranen wurden mit dem Farbstoff Trypanblau (0,0125% Endkonzentration in PBS-CM) gefärbt und die Membranmasken mit dem oben beschriebenen System aufgezeichnet (siehe Abb. 4). Die Berechnung der intrazellulären Masken erfolgte durch die Subtraktion der Zellkernmaske von der Zellmembranmaske.



**Abb. 4: Lokalisation von Höchst-, Trypanblau- und GFP-Rezeptor-Fluoreszenzen mit Hilfe des automatischen Mikroskops.** Oberer Teil: Abgebildet sind mit der L336T.GFP Mutante stabil transfizierte HEK-293-Zellen in 384-Wellplatten nach Behandlung mit SR121463B. In den linken Bildern sind im 1. Kanal die durch Höchstfärbung detektierten Zellkerne dargestellt. Die mittleren Bilder zeigen die im 2. Kanal mittels Trypanblaufärbung detektierten Zellmembranen. In den rechten Bildern sind die GFP-Fluoreszenzen der L336T Rezeptormutante zu erkennen (3. Kanal). Unterer Teil: Die Bilder zeigen die errechneten Masken (Ridelis *et al.*, 2012 submitted).

Die Kolokalisation des GFP Fluoreszenzsignals der Rezeptoren mit der Membranmaske ( $I_{\text{mem}}$ ) und der Intrazellulärmaske ( $I_{\text{cyt}}$ ) wurden bestimmt, um das Verhältnis  $I_{\text{mem}}/I_{\text{cyt}}$  zu berechnen. Dieses Verhältnis stellt ein Maß für die Effizienz des Rezeptortransports zur Zellmembran dar. Zur Berechnung diente das von der Arbeitsgruppe *Cellular Imaging* des FMP entwickelte Programm „384 Rescue“. Die automatische Mikroskopieanalyse wurde mit einem 20x Objektiv und folgenden XF-93 Filter Cubes durchgeführt: GFP-Rezeptorfluoreszenzsignale, 488 nm, FITS Kanal; Trypanblau, 543 nm, TRIC Kanal; Höchst 33258, 340 nm, DAPI Kanal. Es wurden mindestens 300 Zellen pro Well ausgewertet und anhand der Daten des Primärscreenings wurde eine Histogrammanalyse für die Selektion der Hit-Substanzen durchgeführt. Als Hits wurden Substanzen erkannt, deren  $I_{\text{mem}}/I_{\text{cyt}}$  Verhältnis einen Wert größer als 1,7 ergaben. Ab diesem Wert zeigten die GFP-Rezeptorsignalintensitäten, verglichen mit DMSO behandelten Zellen, einen signifikanten Effekt der jeweiligen Substanz.

#### **4.2 Zelloberflächenbiotinylierung und Immunpräzipitation**

Um die Rezeptoren an der Zellmembran zu untersuchen, wurden diese mit Biotin markiert. Biotin bindet kovalent an freie Aminogruppen, ist nicht membranpermeabel und wird daher zur Markierung von Zelloberflächenproteinen genutzt. Das Zellsystem stellten HEK-293-Zellen dar, die GFP-fusionierte Rezeptoren stabil exprimierten. Die Zellen wurden in Zellkulturschalen ausgesät und 32 h nach der Aussaat mit den Substanzen in verschiedenen Konzentrationen sowie mit DMSO (0,1%, Negativkontrolle) oder dem Antagonisten SR121463B (1  $\mu\text{M}$ , Positivkontrolle) inkubiert. Nach weiteren 16 h wurden die Zellen dreimal mit PBS-CM gewaschen, mit einer Sulfo-NHS-Biotinlösung (0,5 mg/ml PBS-CM) für 30 min behandelt und bei 4  $^{\circ}\text{C}$  geschüttelt. Mittels PBS-CM mit 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  wurde die Reaktion gestoppt (10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ ) und die Zellen danach dreimal mit PBS-CM gewaschen. Die Zellyse erfolgte für 1 h in Lysispuffer (1% Triton X-100, 0,1% SDS, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , pH 8,0). Unlösliche Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (20 min, 20.000xg) abgetrennt. Es folgte die Präzipitation der Proteine aus dem Überstand durch Inkubation (16 h) mit einem an Protein A Sepharose-Beads gekoppelten polyklonalen GFP Antikörper (Thielen *et al.*, 2005). Die Sepharose-Beads wurden nach der Inkubation abzentrifugiert (2 min, 700xg) und zweimal mit Waschpuffer 1 (0,5% Triton X-100, 0,1% SDS, 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , pH 7,4) sowie einmal mit Waschpuffer 2 (Waschpuffer 1 ohne NaCl) gewaschen. Im Anschluss wurden die Proteine in Rotiload Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95  $^{\circ}\text{C}$  denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS PAGE (10% Acrylamid) und anschließendem Blotten auf Nitrocellulosemembranen (Kyhse *et al.*, 1984). Danach wurden die Membranen für 1 h bei Raumtemperatur (RT) mit Blockpuffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5% (w/v) Magermilch, pH 8,0) behandelt. Die Proteine wurden jeweils mit einem polyklonalen Kaninchen- $\alpha$ -Biotin Antikörper (1:5.000 in Blockpuffer) und einem monoklonalen Maus  $\alpha$ -GFP-

Antikörper (1:3.000 in Blockpuffer) über Nacht inkubiert. Während der Nachweis von GFP die Bestimmung der Gesamtmenge an GFP-fusionierten Rezeptoren ermöglicht, lässt sich durch die Detektion von Biotin der Anteil der Rezeptoren ermitteln, der sich an der Zelloberfläche befindet. Nach der Inkubation über Nacht wurden die Membranen dreimal (je 5 min) mit TBST-Puffer (10 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl, 0,05% Tween 20, pH 8,0) gewaschen und zur Detektion die sekundären Antikörper DyLight680  $\alpha$ -Maus und DyLight800  $\alpha$ -Kaninchen verwendet (1 h bei RT). Die Membranen wurden danach zweimal mit TBST-Puffer (je 5 min) und einmal mit TBS-Puffer (TBST-Puffer ohne Tween) gewaschen (10 min). Immunoreaktive Proteinbanden wurden mit dem Odyssey<sup>TM</sup> Infrared imaging System und der Software 2.1 (Li-COR Biosciences, Lincoln, Ne, USA) detektiert.

### **4.3 Laser Scanning Mikroskopie und zellbasierter mKikGR Assay**

Mit Hilfe der Laser Scanning Mikroskopie (LSM) lassen sich der Transport von fluoreszenzmarkierten Rezeptoren untersuchen und Kollokalisationsstudien durchführen. In der vorliegenden Arbeit wurde die LSM angewendet, um die co- und post-translationale Wirkung von SR121463B auf den V<sub>2</sub>R und dessen Mutanten S167T und R337X zu analysieren. Hierzu wurden HEK-293-Zellen, welche die Konstrukte V<sub>2</sub>R.mKikGR, S167T.mKikGR oder R337X.mKikGR stabil exprimierten, auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser ausgesät. Für die Analyse der Rezeptoren wurden die grünen mKikGR Rezeptorfluoreszenzen nach 32 h mit einer UV-Lampe (45 s) vollständig umgeschaltet und anschließend die Zellen mit SR121463B (1  $\mu$ M, 16 h) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-CM wurden die Deckgläser in eine Kammer eingespannt und die Fluoreszenzsignale der Zellen in PBS-CM gemessen. Die Messung der Fluoreszenz der Rezeptoren erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Scanning Mikroskops (Zeiss LSM510-META, Objektiv: 100 $\times$ /1.3  $\text{Öl}$ ; Optical Section: <0.8  $\mu$ M; Multitrack mode). Neu synthetisierte grüne Rezeptoren (g-mKikGR) wurden mit einem Argonlaser bei 488 nm angeregt und mit einem BP Filter bei 500-530 nm detektiert. Die rote Fluoreszenz von r-mKikGR wurde mit einem Helium-Neonlaser bei 543 nm angeregt und über einen LP Filter bei 560 nm ermittelt. Für die Kollokalisationsexperimente mit dem Membranmarker Trypanblau fand keine Umschaltung der Zellen statt. Sämtliche Bilder wurden mit den gleichen Einstellungen aufgenommen und die Überlagerung der Bilder wurde mit Hilfe der Zeiss LSM510 Software (3.2 SP2) berechnet.

### **4.4 AVP-Bindungs- und cAMP-Akkumulationsstudien**

Um die Anzahl an Rezeptoren in der Zellmembran (maximale Bindung, B<sub>max</sub>) zu bestimmen sowie deren Inhibitionskonstante K<sub>i</sub> zu ermitteln, können Radioliganden-Bindungsstudien verwendet werden. Im Fall des V<sub>2</sub>R ist es mit Hilfe des Agonisten AVP bzw. [<sup>3</sup>H]-AVP (radioaktiv markiert) möglich, die spezifische Bindung von AVP zu berechnen. Diese ergibt sich aus der

Differenz von totaler und nicht-spezifischer Bindung. Die Berechnung ist notwendig, da Liganden auch unspezifisch an die Zellmembran binden können.

Für die AVP-Bindungsstudien wurden HEK-293-Zellen ( $7,5 \times 10^4$  Zellen/Well) verwendet, welche die Konstrukte Flag.V<sub>2</sub>R, V<sub>2</sub>R.mKikGR und V<sub>2</sub>R.Kaede stabil exprimierten. Die Aussaat der Zellen erfolgte in Poly-L-Lysin beschichtete 24-Wellplatten und 48 h danach wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS-CM gewaschen. Jeweils 12 Wells einer 24-Wellplatte wurden mit den Lösungen zur Bestimmung der totalen Bindung und die übrigen 12 Wells mit Lösungen zur Bestimmung der nicht-spezifischen Bindung versetzt (je 300 µl Lösung, Dreifachbestimmungen). Für die totale Bindung wurden aus einer 100 nM [<sup>3</sup>H]-AVP-Lösung durch serielle 1:2 Verdünnungen neun weitere Lösungen (0,39 nM – 100 nM) erzeugt. Zur Bestimmung der nicht-spezifischen Bindung wurde jede dieser Verdünnungen mit unmarkiertem AVP (Endkonzentration 1 µM) versetzt und die Platten wurden bei 4 °C für 2 h inkubiert. Anschließend erfolgte das Absaugen der Bindungslösung, die Zellen wurden dreimal mit eiskaltem PBS-CM gewaschen und in 0,5 M NaOH lysiert. Danach wurde das Lysat in ein 5 ml Szintillationsgefäß überführt und 4 ml Aquasafe 300 Plus Szintillator zugegeben. In allen Ansätzen wurden die Zerfälle pro Minute (dpm) mittels eines β-Counters gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms RADLIG Version 4.0 und es wurde eine Sättigungskurve erstellt. Die K<sub>i</sub>-Werte wurden anhand nicht linearer Regression berechnet.

Um den Einfluss von mKikGR als Fusionsprotein auf die biologische Aktivität der untersuchten Rezeptoren zu ermitteln, wurde die Konzentration des sekundären Messengers cAMP nach Agonistenstimulation bestimmt. Beim V<sub>2</sub>R wird durch G<sub>as</sub> eine membranständige Adenylylcyclase aktiviert, die ATP in cAMP umwandelt. Die cAMP-Konzentration kann daraufhin mit Hilfe eines cAMP-Radioimmunoassays (cAMP-RIA) bestimmt werden. Hierfür wurden  $7,5 \times 10^4$  HEK-293-Zellen in Poly-L-Lysin beschichtete 24-Wellplatten ausgesät, welche die Konstrukte Flag.V<sub>2</sub>R, V<sub>2</sub>R.mKikGR und V<sub>2</sub>R.Kaede stabil exprimierten. Nach 48 h wurden die Zellen mit Stimulationsmedium (10 mM HEPES, 0,5% w/v BSA, 0,25 mM 3-Isobutyl-1-Methylxanthin in DMEM) gewaschen und für 30 min bei 37 °C mit und ohne Agonist (1 fM – 10 nM AVP) inkubiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen für 30 min bei 4 °C (0,1% v/v Trifluoressigsäure, 0,005% v/v Triton X-100; 750 µL Ansatz). Das Lysat wurde für 10 min bei 95 °C erhitzt, über Nacht im Vakuum getrocknet (Rotations-Vakuum-Konzentrator α-RVC) und bis zum Versuch bei -20 °C gelagert. Für den RIA wurden die getrockneten Pellets in RIA-Puffer (100 mM Natriumacetat, 0,1% w/v BSA, 0,1% v/v Triton X-100, pH 6) resuspendiert, 20 min bei 4 °C gelagert und zentrifugiert (23.000×g, 15 min, 4 °C). Sowohl die Proben als auch die Standard-cAMP-Lösungen mit definiertem cAMP-Gehalt wurden verdünnt und dann mittels RIA gemessen. Um die Sensitivität der Messung zu erhöhen, wurden die Proben bei RT acetyliert (30 µl Probe, 470 µl RIA-Puffer, 500 µl Acetanhydrid, 1 ml Triethylamin). Der cAMP-Gehalt der Proben wurde mit Hilfe von [<sup>125</sup>I]-cAMP-Tyrosylester (10000 cpm, spezifische Aktivität 81,4

TBq/mmol) und einem polyklonalen Kaninchen- $\alpha$ -cAMP-Antiserum (1:160.000) bestimmt. Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C mit Antikörper inkubiert und anschließend an Sepharose-konjugierten Schaf- $\alpha$ -Kaninchen-Antikörpern (250  $\mu$ l) immobilisiert. Die Messung der Radioaktivität des Präzipitates erfolgte mittels eines  $\gamma$ -Counters. Die Konzentration von nicht-radioaktivem cAMP wurde durch Interpolation einer Standardkurve ermittelt, wobei der  $EC_{50}$ -Wert mit Hilfe des Programms RADLIG Version 4.0 durch nicht lineare Regression berechnet wurde.

#### **4.5 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie stellt ein Messverfahren dar, welches die Analyse von Zellen erlaubt, die mit hoher Geschwindigkeit einzeln an einer elektrischen Spannung oder einem Lichtstrahl vorbei fließen. Dabei können die Expressionen der Zelloberflächen- und intrazellulären Moleküle quantitativ bestimmt und die Fluoreszenz einer vorher mit einer bestimmten Wellenlänge angeregten fluoreszierenden Gruppe gemessen werden. Zur Bestimmung der Gesamtexpression von GFP-fusionierten Rezeptoren anhand ihrer Fluoreszenz wurden HEK-293-Zellen in 12 Wellplatten ausgesät ( $1,8 \times 10^5$ /Well). 24 h nach Aussaat wurden die Zellen mit verschiedenen DNA Konstrukten transient transfiziert und nach weiteren 5 h Inkubation mit DMSO (0,1%) oder Cotransin (10  $\mu$ M) behandelt. Nach 17 h wurden die Zellen mit PBS abgespült und auf Probenröhrchen verteilt. Die Röhrchen wurden 4 min bei 400xg und 4 °C zentrifugiert, das Zellpellet wurde zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 250  $\mu$ l PBS aufgenommen. Im Anschluss wurden die GFP-Fluoreszenzen der Zellen durchflusszytometrisch mit einem FACS Calibur Apparatus (BD Biosciences) gemessen. Für jede Probe wurde die Fluoreszenzintensität von  $1,0 \times 10^4$  Zellen bestimmt und mit Hilfe der BD CellQuest Pro Software (release 6.0; BD Biosciences) quantifiziert. Der Fluoreszenzhintergrund der mit dem pcDNA3-Vektor transfizierten Zellen wurde von den Proben abgezogen. Die Daten der Cotransin-behandelten Zellen wurden im Verhältnis zur DMSO Kontrolle (100%) dargestellt.

#### **4.6 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie**

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) stellt eine äußerst sensitive Methode dar, welche die Untersuchung der Diffusionseigenschaften von einzelnen Molekülen innerhalb eines konfokalen Volumens ermöglicht (Bacia und Schwille, 2007). Dabei kann die Fluoreszenzintensität eines Fluorophores als Funktion der Zeit gemessen werden. Mittels Kreuzkorrelation lassen sich Signale unterschiedlich fluoreszierender Moleküle untersuchen, wodurch eine Interaktion zwischen den zwei Fluorophoren bestimmt werden kann (Hwang und Wohland, 2007). Eine Einschränkung dieser Methode beruht auf einem *cross-talk* zwischen den verschiedenen Fluoreszenzmolekülen. Um diese Limitierung zu umgehen, sollten Fluorophore verwendet werden, deren Spektren lediglich minimal überlappen. Dies kann durch die

Photokonversion der PCFP Kaede oder KikGR erreicht werden, woraus die Verschiebung der Fluoreszenz des grünen Chromophors nach rot resultiert. Für die FCS-Messungen wurden je  $0,25 \times 10^6$  HEK-293-Zellen auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser ausgesät und transient mit den Vektoren mKikGR und Kaede transfiziert. Die Zellen wurden mit Hilfe eines UV-Lasers (405 nm, 2% Laserintensität) bestrahlt, bis ca. 50% der g-mKikGR und g-Kaede in r-mKikGR bzw. r-Kaede überführt waren (Schmidt *et al.*, 2009). Für beide Konstrukte erfolgte die Fokussierung des Lasers auf das Cytosol der Zellen und jede Zelle wurde zehnmal für jeweils 2 s gemessen. Die Daten wurden mit Hilfe der Software LSM710 ZEN nach folgender Gleichung für eine dreidimensionale Bewegung angefitet (ohne Offset, mit Triplettfraction einer Komponente):

$$G(\tau) = 1 + G_{\infty} + \frac{1}{N} \cdot \left(1 + \frac{T \cdot e^{-\tau/\tau_F}}{1 - T}\right) \cdot \left(\frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right) \cdot \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D \cdot S^2}\right)^{1/2}}\right)$$

$G_{\infty}$  Offset; N und T Anzahl der Partikel und der Triplettfraction;  $\tau_D$  = Diffusionszeit,  $\tau_F$  = Tripletzeit;  $S = \omega_z/\omega_{xy}$  = Strukturparameter;  $\omega_z$  und  $\omega_{xy}$  beschreiben die halbe Höhe und den Radius des konfokalen Volumens (Schmidt *et al.*, 2009).

## 5. Ergebnisse

### **5.1 Entwicklung eines High Throughput Screening-Assays für die Identifizierung von Substanzen, die Faltung und/oder Transport von Membranproteinen beeinflussen**

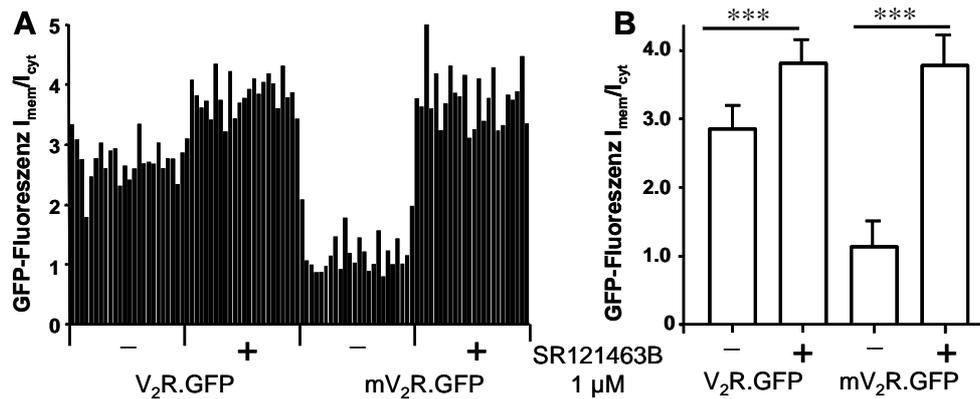
#### 5.1.1 Etablierung des High Throughput Screening-Assays

Die Wirkung des selektiven Antagonisten SR121463B als pharmakologisches Chaperon für den V<sub>2</sub>R wurde bereits publiziert (Morello *et al.*, 2000, Wüller *et al.*, 2004, Robben *et al.*, 2007). Der Antagonist ermöglicht den Transport von Rezeptoren zur Zellmembran, die aufgrund von Mutationen intrazellulär retiniert werden. Eine Interaktion mit der AVP-Bindungsstelle konnte durch [<sup>3</sup>H]-AVP Verdrängung und Messung der cAMP-Akkumulation bestätigt werden, wobei sich ein EC<sub>50</sub>-Wert ähnlich des K<sub>i</sub>-Wertes ergab (EC<sub>50</sub>-Wert = 22 nM; K<sub>i</sub>-Wert für [<sup>3</sup>H]-AVP Verdrängung = 17 nM; Wüller *et al.*, 2004).

Die angestrebte Etablierung eines Screening-Algorithmus sollte die Identifizierung von Molekülen aus einer Substanzbibliothek ermöglichen, die wie SR121463B Faltung und Transport mutierter Rezeptoren unterstützt. Vor dem Hintergrund einer möglichen

therapeutischen Anwendung sollten diese Moleküle aber erneut eine AVP-Bindung zulassen, also entweder pharmakologische Chaperone mit niedrigerer Affinität oder allosterische Modulatoren sein. Auch mögliche Inhibitoren des QCS, welches in Retentionsprozesse involviert ist, stellen interessante Substanzen dar. Darüber hinaus sollte der zu etablierende Assay leicht auf andere Membranproteinmutanten übertragbar sein, bei denen ebenfalls Transportdefekte bei der Entstehung von Krankheiten eine Rolle spielen. Der Assay sollte daher auf Basis lebender Zellen entwickelt werden und das Screening auf der Ebene eines verbesserten Transports erfolgen.

Als Rezeptorenmodell für den aufzubauenden Assay dienten der in der Zellmembran lokalisierte, mit GFP markierte wildtypische humane  $V_2R$ , und der wildtypische murine  $V_2R$  ( $mV_2R$ ). Im Gegensatz zum humanen  $V_2R$  ist der wildtypische  $mV_2R$  zum Großteil im ER retiniert (Oksche *et al.*, 2002). Für das Screening wurden mit den Konstrukten  $mV_2R.GFP$  und  $V_2R.GFP$  stabil transfizierte HEK-293-Zellen in 384 Wellplatten ausgesät und auf die Wirkung des pharmakologischen Chaperons SR121463B analysiert. Je 24 Wells pro Konstrukt wurden mit dem Lösungsmittel DMSO und SR121463B behandelt. Die mit SR121463B behandelten Zellen stellten die Positivkontrolle für ein pharmakologisches Chaperon dar. Nicht transfizierte, mit DMSO behandelte HEK-293-Zellen wurden verwendet, um den Fluoreszenzhintergrund zu definieren und zu subtrahieren (Abb. 5 A). Der Transport zur Zellmembran wurde durch Kolo-kalisation der Rezeptor-GFP-Fluoreszenzen mit dem Zellmembranmarker Trypanblau mit Hilfe eines automatischen konfokalen Mikroskops gemessen. Unter Anwendung des im Methodenteil (Abschnitt 4.1) beschriebenen Screening-Algorithmus wurde das Verhältnis  $I_{mem}/I_{cyt}$  der Fluoreszenzintensitäten der Rezeptoren in der Membran ( $I_{mem}$ ) und im intrazellulären Bereich ( $I_{cyt}$ ) nach Substanzbehandlung bestimmt. Im Fall des  $mV_2R$  konnte eine signifikante Erhöhung des Verhältnisses nach Behandlung mit SR121463B festgestellt werden (von  $1,2 \pm 0,34$  auf  $3,79 \pm 0,32$ ). Dies belegt, dass die Wirkung von SR121463B als pharmakologisches Chaperon auch mit dem neu etablierten Screening-Assay gezeigt werden kann. Beim humanen  $V_2R$  wurde ein geringerer Anstieg ermittelt (von  $2,7 \pm 0,33$  auf  $3,79 \pm 0,32$ ; als Mittelwerte dargestellt in Abb. 5 B). Die Ergebnisse belegen nicht nur die Durchführbarkeit, sondern auch die Genauigkeit des Screening-Assays.



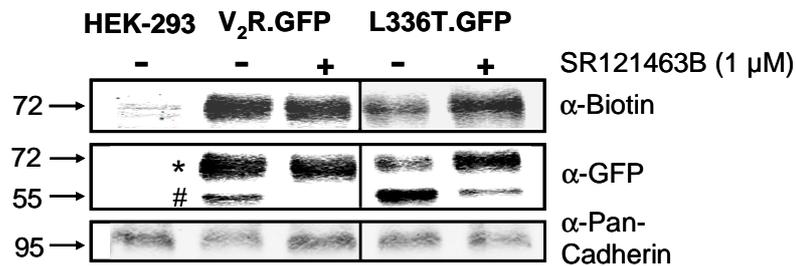
**Abb. 5: Validierung des High Throughput Screening-Assays.** A) Assay-Validierung. Die Durchführbarkeit des Assays wurde in einer 384 Wellplatte getestet. Es wurden HEK-293-Zellen verwendet, welche die Konstrukte V<sub>2</sub>R.GFP und mV<sub>2</sub>R.GFP stabil exprimierten. Jeder Balken repräsentiert ein Well. Je 24 Wells pro Konstrukt wurden mit DMSO (-, 0,1%) oder mit SR121463B (+, 1  $\mu$ M) behandelt. Unter Anwendung der in 4.1 beschriebenen Färbe-Algorithmen in lebenden Zellen wurde das Verhältnis  $I_{mem}/I_{cyt}$  der GFP-Rezeptorfluoreszenzsignale ermittelt ( $n < 300$  Zellen/Well). B) Statistische Analyse der in A) gezeigten Daten. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der  $I_{mem}/I_{cyt}$  Verhältnisse von 24 Wells für jedes Konstrukt ( $\pm$ SD). \*\*\* $p < 0,0001$  (Ridelis *et al.*, 2012 submitted).

### 5.1.2 Charakterisierung der für das HTS verwendeten V<sub>2</sub>R-L336T-Mutante

Als Modellprotein für das anschließende Screening der Substanzbibliothek wurde die faltungs- und transportdefekte V<sub>2</sub>R-Mutante L336T verwendet. Die Mutation L336T ist in der membranproximalen amphipatischen Alphahelix („Helix 8“) im intrazellulären C-Terminus des Rezeptors lokalisiert (Abb. 2). Für diese Mutante konnte bereits gezeigt werden, dass sie überwiegend im ER retiniert wird (Thielen *et al.*, 2005).

Die Eignung der L336T-Mutante sollte für das Screening überprüft werden, indem eine Zelloberflächenbiotinylierung mit HEK-293-Zellen durchgeführt wurde, welche die Konstrukte L336T.GFP und V<sub>2</sub>R.GFP stabil exprimierten. Um die Wirkung von SR121463B als pharmakologisches Chaperon zu untersuchen, wurden die Zellen mit dieser Substanz behandelt. Hierfür wurden die biotinylierten Zelloberflächenrezeptoren mit GFP-Antikörpern präzipitiert und anschließend auf einem Immunoblot detektiert. In diesem Versuch zeigte sich bei der Mutante L336T.GFP im Vergleich zum V<sub>2</sub>R.GFP eine schwächere Expression an der Zelloberfläche (Abb. 6 oberer Immunoblot). Die Expression der Mutante an der Zellmembran konnte durch die Behandlung mit SR121463B deutlich gesteigert werden. Nach Immunpräzipitation wurden ferner die Glykosylierungsmuster der jeweiligen Rezeptoren analysiert. Die L336T.GFP-Mutante zeigte im Vergleich zum wildtypischen V<sub>2</sub>R.GFP eine stärkere Expression der mannosereichen Glykosylierungsform in unbehandeltem Zustand, was die Retention der Mutante bestätigt (Abb. 6 mittlerer Immunoblot). Nach Behandlung mit SR121463B verringerte sich die Expression der mannosereichen Form der Mutante deutlich zugunsten der komplexglykosylierten Form, womit erneut die Wirkung von SR121463B als pharmakologisches Chaperon belegt werden konnte. Diese Ergebnisse stimmen mit den bereits

veröffentlichten Daten von Thielen *et al.* überein und zeigen, dass die L336T-Mutante ein geeignetes Modell für das Screening der Substanzbibliothek darstellt.



**Abb. 6: Analyse der Zelloberflächenexpression von V<sub>2</sub>R.GFP und L336T.GFP in stabil transfizierten HEK-293-Zellen.** Die Zellen wurden mit SR121463B (+, 1 μM), oder DMSO (-, 0,1%) behandelt. Als Kontrolle für die Antikörperspezifität wurden nicht transfizierte Zellen verwendet. Nach Markierung der Zelloberflächenrezeptoren mit Biotin wurden die Rezeptoren mit einem α-GFP Antiserum präzipitiert. Die Detektion der Rezeptoren erfolgte mittels SDS/PAGE und einem Immunoblot unter Anwendung eines monoklonalen α-Biotin-Antikörpers (Oberflächenrezeptoren) und eines monoklonalen α-GFP-Antikörpers (Rezeptoren im gesamten Zelllysate). Als Ladekontrolle wurde das Protein Pan-Cadherin verwendet. Die Immunoblots sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Die komplexglykosylierten (\*) und die mannosereichen Formen (#) sind gekennzeichnet (Ridelis *et al.*, 2012 submitted).

### 5.1.3 Screening der Substanzbibliothek und Validierung der Hitsubstanzen

Für das Screening der Substanzbibliothek wurden die mit der L336T.GFP-Mutante stabil transfizierten HEK-293-Zellen auf Kollagen beschichtete 384-Wellplatten ausgesät. Nach 24 h wurden die Substanzen (17.951 Substanzen, ChemBioNet Bibliothek des FMP) in einer Konzentration von 25 μM zugegeben. Als Positivkontrolle dienten mit 1 μM des pharmakologischen Chaperons SR121463B behandelte Zellen. 16 h nach Inkubation mit den Substanzen bzw. dem Antagonisten wurden die Zellen gewaschen, gefärbt und die Fluoreszenzintensitäten gemessen. Nach Validierung des primären Screenings wurden insgesamt 92 Hitsubstanzen durch ein *Hit Picking* in einer Doppelbestimmung erneut getestet. Dieses wiederholte Screening war notwendig, da im Rahmen des Screening-Assays falsch-positive Hits nicht ausgeschlossen werden konnten. Mögliche Ursachen für einen falsch-positiven Hit stellten Substanzen dar, die eine Eigenfluoreszenz im Bereich von GFP aufweisen und z.B. aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften in der Zellmembran akkumulieren. Toxische Substanzen, welche durch eine Schädigung der Zellmembran das Eindringen des Zellmembranmarkers ermöglichen und damit eine artifizielle Kolo-kalisation von GFP und Trypanblau hervorrufen, stellten eine weitere Ursache für falsch-positive Hits dar. Um beide Fälle auszuschließen, wurden die Hitsubstanzen zu nicht transfizierten Zellen gegeben. Durch diese erneute Validierung konnten 44 toxische Substanzen und 38 autofluoreszierende Substanzen identifiziert und ausgeschlossen werden. Die folgenden Experimente dieser Arbeit

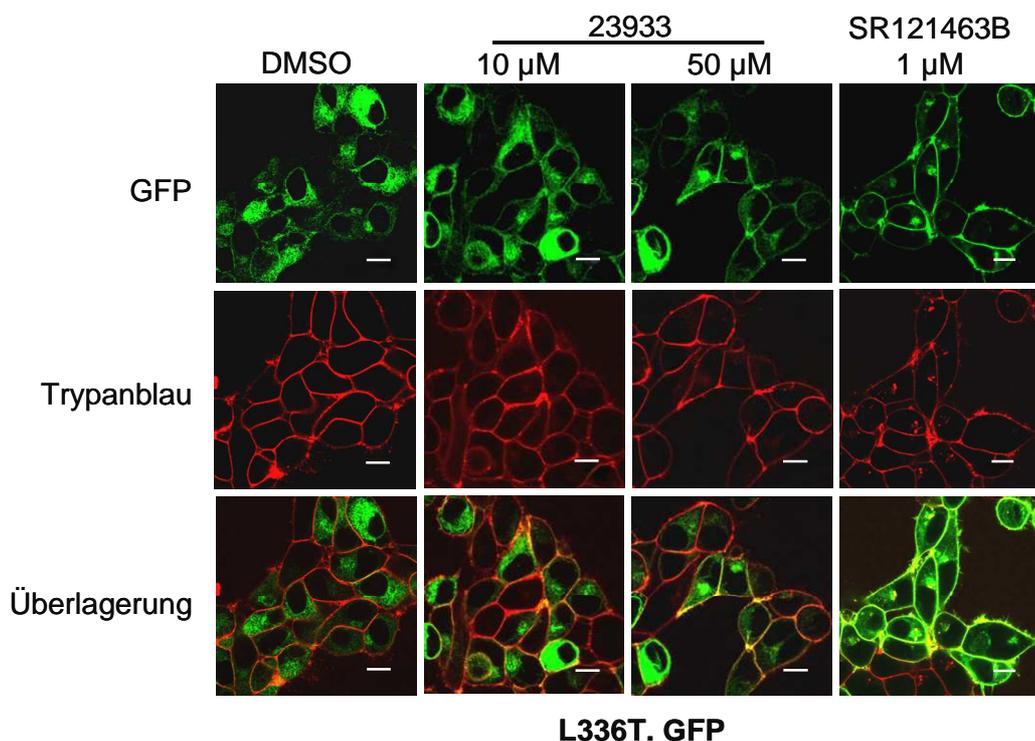
beschränken sich auf die Charakterisierung der Substanz 23933, die den deutlichsten Effekt im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen zeigte.

#### 5.1.4 Substanz 23933 verbessert den Transport der V<sub>2</sub>R-L336T-Mutante zur Zellmembran

Im Folgenden sollte der Einfluss der im HTS-Assay identifizierten Substanz 23933 auf den Transport der L336T-Mutante mit anderen Methoden validiert werden.

##### 5.1.4.1 Kolokalisation der V<sub>2</sub>R-L336T-Mutante mit dem Zellmembranmarker Trypanblau

Zunächst wurde der Einfluss der Substanz 23933 auf den L336T-Transport in stabil transfizierten HEK-293-Zellen mittels eines herkömmlichen konfokalen LSM überprüft. Kolokalisationsanalysen mit Trypanblau zeigten, dass die Zugabe der Substanz 23933, vergleichbar mit der Zugabe von SR121463B, zu einer erhöhten Rezeptorexpression an der Zellmembran führte (Abb. 7).

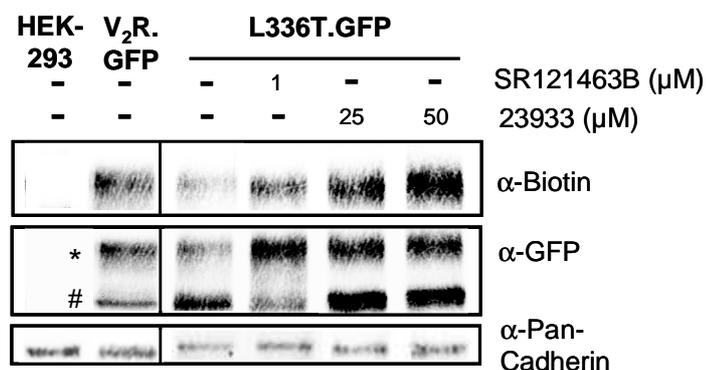


**Abb. 7: Die Substanz 23933 erhöht die Zellmembranexpression der V<sub>2</sub>R Mutante L336T.GFP in stabil transfizierten HEK-293-Zellen.** Kolokalisationsanalyse von L336T.GFP mit dem Zellmembranmarker Trypanblau nach der Behandlung mit der Substanz 23933 (10 und 50 μM), SR121463B (1 μM) oder DMSO (0,1%). Die grünen GFP Signale der Rezeptoren (oben) und die roten Signale des Zellmembranmarkers Trypanblau (Mitte) wurden mittels LSM detektiert und die Überlagerung mit dem Computer generiert (unten). Gelbe Signale zeigen die Kolokalisation beider Fluoreszenzen. Die horizontalen (xy) Scans sind repräsentativ für drei unabhängige Messungen. Größenmaßstab 5 μm (Ridelis *et al.*, 2012 submitted).

### 5.1.4.2 Expressionsanalyse der V<sub>2</sub>R-L336T-Mutante mit Hilfe eines Biotinylierungsassays

Der Einfluss der Substanz 23933 auf den Transport der L336T-Mutante wurde zusätzlich zur mikroskopischen Analyse mit einer Biotinylierung und Immunpräzipitation untersucht. Wie bereits in Abschnitt 5.1.2 beschrieben, wird die L336T-Mutante im Vergleich zum Wildtyp nur schwach an der Zelloberfläche exprimiert und die Zugabe von SR121463B (1 µM) führte zu einer Verstärkung der Zelloberflächenexpression. Durch die Zugabe der Substanz 23933 (25 und 50 µM) wurde die Expression an der Zelloberfläche ähnlich gesteigert wie bei SR121463B und es zeigte sich eine Dosisabhängigkeit (Abb. 8, oberer Immunoblot).

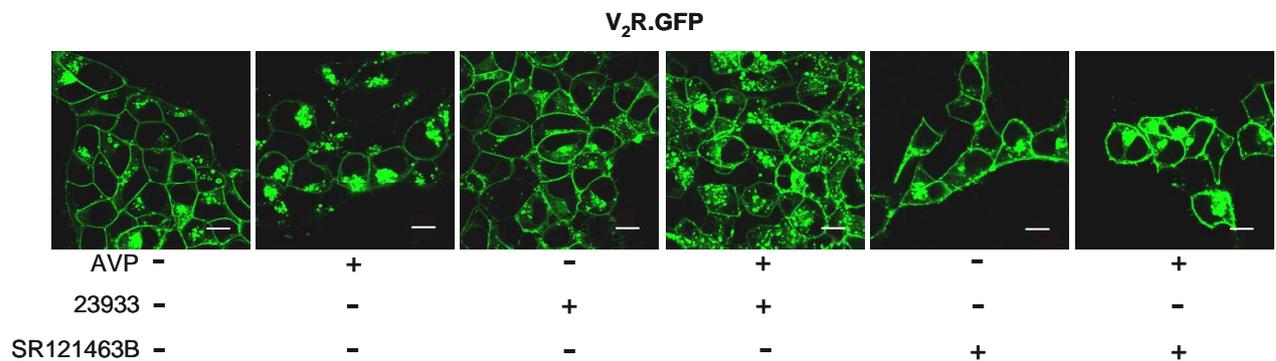
Nach der Immunpräzipitation wurden auch die verschiedenen Glykosylierungsformen der Rezeptoren (Abb. 8, mittlerer Immunoblot) analysiert. Dabei wies die L336T-Mutante im Vergleich zum V<sub>2</sub>R-Wildtyp eine verringerte komplexe Glykosylierung (\* in Abb. 8) auf. Sowohl nach Behandlung mit dem Antagonisten SR121463B als auch mit der Substanz 23933 konnte eine Verstärkung der Bande, welche dem komplex glykosylierten Rezeptor entspricht, nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde ebenfalls die Expression der mannosereichen Form durch die Behandlung mit der Substanz 23933 verstärkt (# in Abb. 8). Daraus lässt sich schließen, dass 23933 wahrscheinlich nicht wie ein klassisches pharmakologisches Chaperon wirkt, welches nur die Überführung der mannosereichen in die komplex glykosylierte Form fördern sollte (siehe Abb. 8, L336T-Mutante mit SR121463B behandelt). Einen Einfluss der Substanz 23933 auf die Transkription des V<sub>2</sub>-Rezeptorgens konnte mittels RT-PCR ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 8: Analyse der Zelloberflächenexpression von V<sub>2</sub>R.GFP und L336T.GFP in stabil transfizierten HEK-293-Zellen nach Behandlung mit 23933.** Die Zellen wurden mit SR121463B (1 µM), 23933 (25 und 50 µM) oder DMSO (0,1%) behandelt. Als Kontrolle für die Antikörperspezifität wurden nicht transfizierte Zellen verwendet. Nach Markierung der Zelloberflächenrezeptoren mit Biotin wurden die Rezeptoren mit einem α-GFP Antiserum präzipitiert. Die Detektion der Rezeptoren erfolgte mittels SDS/PAGE und Immunoblot unter Anwendung eines monoklonalen α-Biotin-Antikörpers (Oberflächenrezeptoren) und eines monoklonalen α-GFP-Antikörpers (Rezeptoren im gesamten Zelllysate). Als Ladekontrolle wurde das Protein Pan-Cadherin verwendet. Die Blots sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Die komplex glykosylierten (\*) und die mannosereichen Formen (#) sind gekennzeichnet (Ridelis *et al.*, 2012 submitted).

### 5.1.4.3 Analyse der Internalisierung des V<sub>2</sub>R nach Behandlung mit 23933

Die bisher für den V<sub>2</sub>R beschriebenen pharmakologischen Chaperone binden orthosterisch an die AVP Ligandenbindungstasche (Czaplewski *et al.*, 1998). Im Fall von SR121463B ist die Bindung irreversibel, so dass nach Inkubation der Zellen mit dem Antagonisten und Zugabe des Liganden AVP eine Internalisierung des Rezeptors verhindert wird. Vor diesem Hintergrund wurde analysiert, ob nach der Behandlung mit 23933 und der anschließenden Zugabe von AVP eine Internalisierung des Rezeptors möglich ist. Da die L336T-Mutante überwiegend intrazellulär retiniert wird und nur wenige Rezeptoren die Zellmembran erreichen können, wurden die Internalisierungsversuche mit dem wildtypischen V<sub>2</sub>R durchgeführt. Im Anschluss an die Inkubation mit dem Agonisten AVP wurden die Rezeptoren vollständig internalisiert (Abb. 9). Nach Vorinkubation mit SR121463B und anschließender AVP-Zugabe konnte wie beschrieben keine Internalisierung mehr beobachtet werden. Die Vorinkubation mit 23933 und die darauf folgende AVP-Zugabe ließ dagegen die Internalisierung der Rezeptoren unbeeinflusst. Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Substanz 23933 allosterisch an den V<sub>2</sub>R bindet. Eine weitere Möglichkeit stellt eine niedrig-affine orthosterische Bindung der Substanz 23933 an den V<sub>2</sub>R dar. In diesem Fall könnte die Substanz 23933 durch den Agonisten AVP verdrängt werden.



**Abb. 9: Untersuchung der Internalisierung von V<sub>2</sub>R.GFP nach Behandlung mit der Substanz 23933 in stabil transfizierten HEK-293-Zellen.** Die Zellen wurden nach Vorinkubation mit 23933 (10 µM, 16 h), SR121463B (1 µM, 16 h) oder DMSO (0,1%) mit AVP (100 nM) behandelt. Nach 30 minütiger Inkubation mit dem Agonisten AVP wurde die Internalisierung der Rezeptoren mittels LSM verfolgt. Die Bilder sind für mindestens drei unabhängige Messungen repräsentativ. Größenmaßstab 5 µm (Ridelis *et al.*, 2012 submitted).

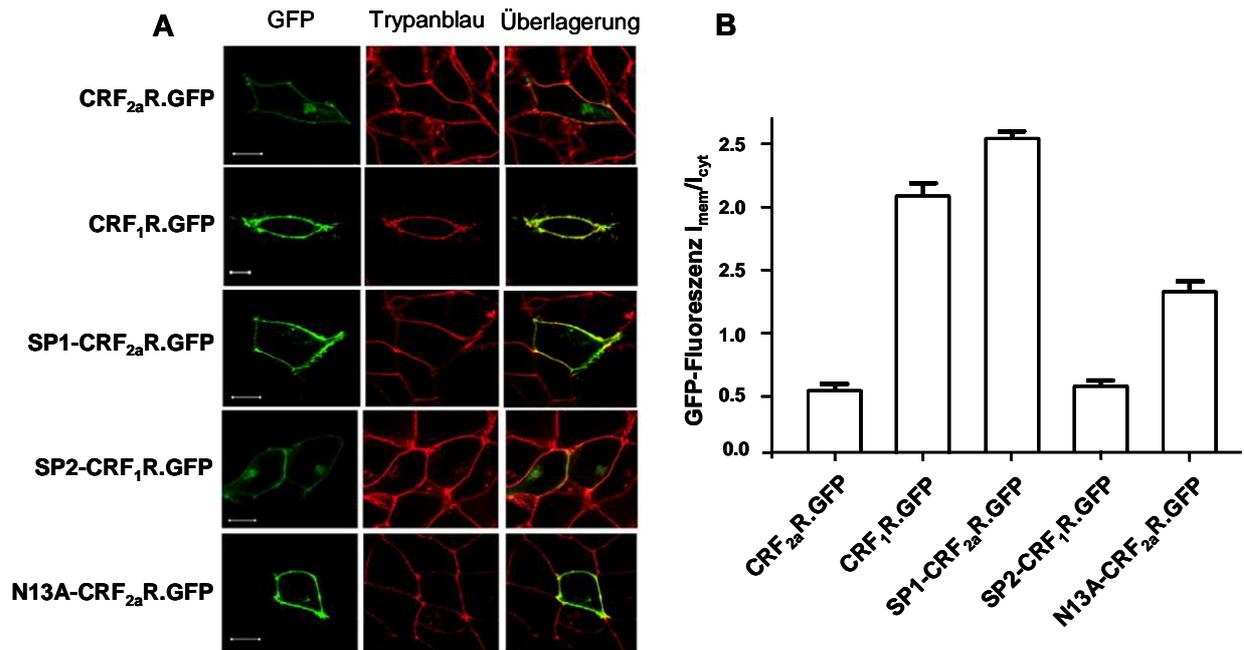
Zusammengefasst wurde mit Hilfe des HTS-Assays eine neue Substanz (23933) identifiziert, die Faltung und/oder Transport der L336T-Mutante des V<sub>2</sub>R verbessert. Der genaue Wirkmechanismus bleibt zum gegenwärtigen Zeitpunkt ungeklärt, jedoch scheint die Verbindung 23933 nicht wie ein klassisches pharmakologisches Chaperon zu wirken.

## **5.2 Anwendung verschiedener Methoden zur Quantifizierung der GPCR-Expression**

### 5.2.1 Quantifizierung der GPCR-Expression mit Hilfe der automatischen Mikroskopie

In dieser Arbeit wurde eine Methode basierend auf automatischer Mikroskopie und Färbemethoden (siehe Abschnitt 4.1) entwickelt, mit der sich der Transport von GPCR an die Zellmembran analysieren und die Rezeptorexpression quantifizieren lassen. Diese Methode wurde im Rahmen von Kooperationen mit Schulz *et al.* angewendet, um den Transport des CRF<sub>2a</sub>R zu untersuchen, welcher ein nicht abspaltbares Pseudosignalpeptid besitzt. Um die Funktion des Pseudosignalpeptids näher zu analysieren, wurden von Schulz *et al.* Austauschexperimente von Signalpeptiden durchgeführt. Als Austauschpartner wurde der CRF<sub>1</sub>R verwendet, der über ein abspaltbares Signalpeptid verfügt. Zudem diente die N13A-Mutante des CRF<sub>2a</sub>R (Konstrukt N13A-CRF<sub>2a</sub>R.GFP) als Kontrolle, da diese Mutation das Pseudosignalpeptid in ein klassisches abspaltbares Signalpeptid überführt. Um den Einfluss von Signalsequenzen auf die Expression von Rezeptoren an der Zellmembran zu untersuchen, wurden die GFP-Fluoreszenzsignale der verschiedenen Rezeptorkonstrukte in transient transfizierten HEK-293-Zellen mit Hilfe konfokaler LSM analysiert (Abb. 10 A). Folgende Konstrukte wurden untersucht: CRF<sub>2a</sub>R.GFP und CRF<sub>1</sub>R.GFP, welche die wildtypischen Rezeptorkonstrukte darstellten sowie SP1-CRF<sub>2a</sub>R.GFP und SP2-CRF<sub>1</sub>R.GFP, welche den Signalpeptidaustauschmutanten entsprachen (SP1 = Signalpeptid des CRF<sub>1</sub>R und SP2 = Pseudosignalpeptid des CRF<sub>2a</sub>R).

Der CRF<sub>1</sub>R.GFP zeigte eine starke Expression an der Zellmembran, während bei dem CRF<sub>2a</sub>R.GFP und dem SP2-CRF<sub>1</sub>R.GFP eine deutlich geringere Zellmembranexpression beobachtet werden konnte. Durch den Austausch des CRF<sub>2a</sub>R-Pseudosignalpeptids mit SP1 und die N13A-Mutation des Pseudosignalpeptids wurde die Zellmembranexpression deutlich gesteigert (Abb. 10 A). Mit Hilfe der automatischen Mikroskopie wurde die Kollokalisierung der GFP-Rezeptorfluoreszenzen mit dem Zellmembranmarker Trypanblau quantifiziert (Abb. 10 B). Die Zellmembranexpression (GFP-Fluoreszenz Verhältnis  $I_{mem}/I_{cyt}$ ) des CRF<sub>1</sub>R.GFP wurde auf 100% normiert und mit allen Konstrukten verglichen. Dabei zeigte sich eine Reduktion der Zellmembranexpression des CRF<sub>2a</sub>R.GFP im Vergleich zum CRF<sub>1</sub>R.GFP um 75%. Bei dem Konstrukt SP2-CRF<sub>1</sub>R.GFP wurde eine Verringerung der Zellmembranexpression von 74% ermittelt. Die Expression des SP1-CRF<sub>2a</sub>R.GFP wurde dagegen auf 115% hochreguliert. Die Ergebnisse aus der LSM und der Quantifizierung der Zellmembranexpression mittels automatischer Mikroskopie weisen darauf hin, dass das Vorhandensein des CRF<sub>2a</sub>R-Pseudosignalpeptids zu einer geringeren Zellmembranexpression des Rezeptors führt (Schulz *et al.*, 2010). Ferner zeigen diese Resultate, dass die automatische Mikroskopie sehr gut geeignet ist, um die Zelloberflächenexpression von GPCR zu untersuchen.



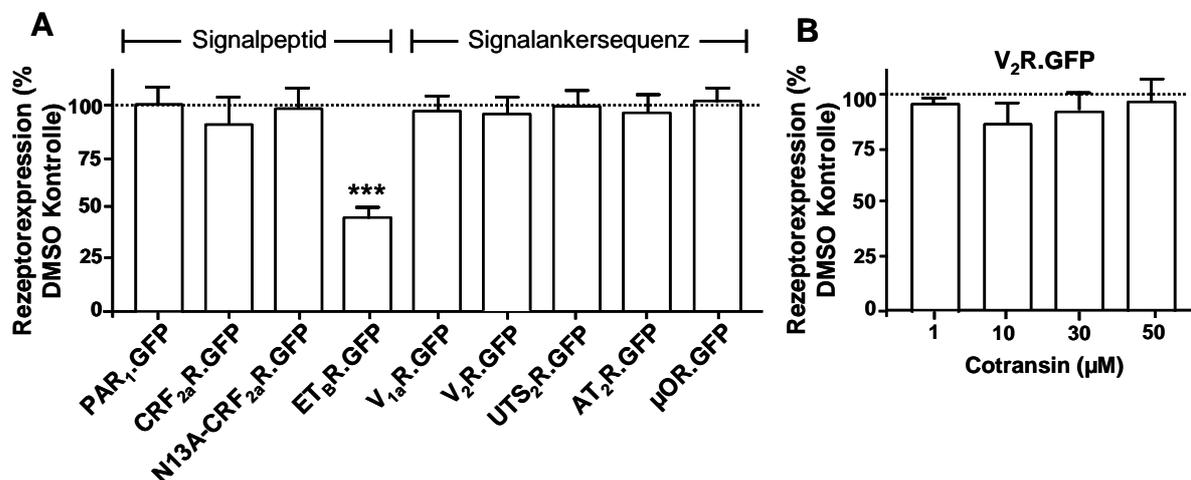
**Abb. 10:** Das Vorhandensein des CRF<sub>2a</sub>R-Pseudosignalpeptids reduziert die Zellmembranexpression der CRF-Rezeptoren in transient transfizierten HEK-293-Zellen. A) Kollokalisierung der GFP-Signale von CRF<sub>2a</sub>R.GFP, CRF<sub>1</sub>R.GFP, SP1-CRF<sub>2a</sub>R.GFP, SP2-CRF<sub>1</sub>R.GFP und N13A-CRF<sub>2a</sub>R.GFP mit dem Zellmembranmarker Trypanblau in lebenden Zellen. Die grünen GFP Signale der Rezeptoren (links) und die roten Signale des Zellmembranmarkers Trypanblau (Mitte) wurden mittels herkömmlicher LSM detektiert und eine Überlagerung generiert (rechts). Gelbe Signale zeigen die Kollokalisierung beider Fluoreszenzen. Die horizontalen (xy) Scans sind repräsentativ für drei unabhängige Messungen. Größenmaßstab 10  $\mu$ m. B) Quantifizierung der GFP-Rezeptorfluoreszenzintensität (Verhältnis  $I_{mem}/I_{cyt}$ ) unter Anwendung der automatischen Mikroskopie. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte (>400 Zellen) von drei unabhängigen Experimenten ( $\pm$  S.D.) (Schulz *et al.*, 2010).

### 5.2.2 Anwendung der Durchflusszytometrie zur Quantifizierung der GPCR-Expression

Im Rahmen von Kooperationen mit Westendorf *et al.*, wurde in dieser Arbeit eine weitere Methode etabliert, um die Rezeptorexpression verschiedener GPCR zu quantifizieren. Hierfür wurde die Durchflusszytometrie verwendet. Zunächst sollte die Sensitivität der Biosynthese auf die kürzlich beschriebene Substanz Cotransin untersucht werden. Bei dieser Substanz wurde bereits eine inhibitorische Wirkung auf die Biosynthese des CRF<sub>1</sub>R publiziert. Cotransin hemmt hierbei die Translokation des Proteins am proteinleitenden Sec-61-Kanal der ER-Membran mit einem Signalpeptid-spezifischen Mechanismus (Garrison *et al.*, 2005).

In der folgenden Studie wurden neun weitere GPCR mit verschiedenen Signalsequenzen auf ihre Cotransin-Sensitivität hin untersucht. Der Protease-aktivierte-Rezeptor 1 (PAR<sub>1</sub>) und ET<sub>B</sub>R stellten hierbei GPCR mit Signalpeptiden dar. Als Rezeptoren mit Signalankersequenzen dienten die nachstehend aufgeführten GPCR: Urotensin-Rezeptor 2 (UTS<sub>2</sub>R), Angiotensin-2-Rezeptor (AT<sub>2</sub>R),  $\mu$ -Opioidrezeptor ( $\mu$ OR), V<sub>1a</sub>R und V<sub>2</sub>R. Zudem wurde ein GPCR mit Pseudosignalpeptid, der CRF<sub>2a</sub>R und dessen N13A-Mutante auf Ihre Cotransin-Sensitivität

getestet. Alle Rezeptorkonstrukte waren C-terminal mit GFP fusioniert, um deren Expressions-Level vergleichen und quantifizieren zu können. Die mit den verschiedenen Konstrukten transient transfizierten HEK-293-Zellen wurden für 17 h mit 10  $\mu\text{M}$  Cotransin bzw. DMSO inkubiert und die Expression wurde anhand der GFP-Fluoreszenzsignale mittels Durchflusszytometrie quantifiziert (siehe. Abb. 11 A). Im Fall des  $\text{ET}_\text{B}$ R zeigte sich eine deutliche Reduktion der Expression der GFP-Signale der Rezeptoren nach Cotransin-Behandlung (auf 45% der DMSO Kontrolle). Dieses Resultat deutet darauf hin, dass Cotransin auch die Biosynthese des  $\text{ET}_\text{B}$ R inhibiert. Die Expression der weiteren untersuchten Rezeptoren wurde dagegen durch die Cotransin-Behandlung nicht beeinflusst. Am Beispiel des  $\text{V}_2$ R konnte auch bei höheren Konzentrationen an Cotransin (bis 50  $\mu\text{M}$ ) keine Veränderung in der Rezeptorexpression festgestellt werden (siehe Abb. 11 B) (Westendorf *et al.*, 2011).



**Abb. 11: Cotransin-Sensitivitätsassay von GPCR in transient transfizierten HEK-293-Zellen.** A) Durchflusszytometrische Messungen der GFP-Rezeptorfluoreszenzen verschiedener GPCR nach Cotransin-Behandlung (10  $\mu\text{M}$ , 17 h). B) Durchflusszytometrische Messungen der GFP-Rezeptorfluoreszenzen der  $\text{V}_2$ R nach Behandlung mit steigenden Konzentrationen an Cotransin (10 - 50  $\mu\text{M}$ , 17 h). Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der GFP-Fluoreszenzsignale von  $1 \times 10^4$  Zellen von drei unabhängigen Experimenten ( $\pm$  S.D.). Die Werte sind als prozentuales Verhältnis zur DMSO Kontrolle dargestellt. \*\*\* $p < 0,0001$  (Westendorf *et al.*, 2011).

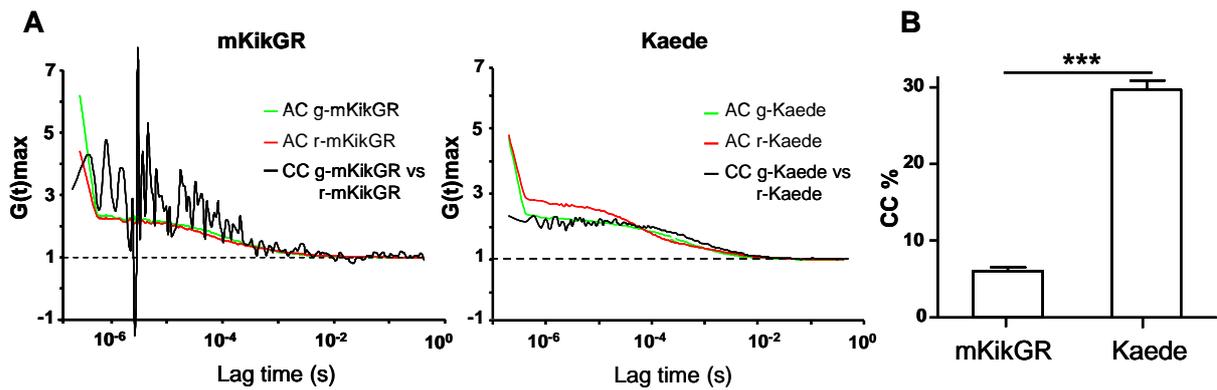
### 5.3 Untersuchung der co- und post-translationalen Wirkung von SR121463B auf den wildtypischen $\text{V}_2$ R und dessen Mutanten S167T und R337X

Das zweite Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Wirkung des pharmakologischen Chaperons SR121463B auf die Faltung und/oder den Zellmembrantransport von GPCR eingehender zu untersuchen, um den Wirkmechanismus besser zu verstehen. Speziell sollte die Frage geklärt werden, ob pharmakologische Chaperone auch co-translational wirken können. Es wurde bereits beschrieben, dass SR121463B den Transport von mutierten  $\text{V}_2$ R zur Zellmembran aufgrund einer post-translationalen Wirkung verbessert. In dieser Studie wurden die Rezeptoren

mit Cycloheximid vorinkubiert, um eine Neusynthese der Proteine zu inhibieren. Anschließend wurde das pharmakologische Chaperon SR121463B zugegeben und der Transport zur Zellmembran untersucht (Wüller *et al.*, 2004). Ein co-translationaler Effekt von SR121463B auf die mutierten Rezeptoren konnte durch diese Methode aber nicht ausgeschlossen werden. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit am Beispiel des V<sub>2</sub>R mit Hilfe des PCFP mKikGR (Habuchi *et al.*, 2008) ein zellbasierter Assay entwickelt, um eine co- und post-translationale Wirkung von SR121463B differenzieren zu können.

### 5.3.1 mKikGR ist ein monomeres Protein

Das mKikGR-Protein wurde bisher nicht als Fusionspartner zur Untersuchung von Membranproteinen eingesetzt. Aufgrund dessen waren umfangreiche Voruntersuchungen notwendig, um die Eignung des Proteins für Traffickingstudien zu überprüfen. Zunächst sollte verifiziert werden, ob mKikGR tatsächlich als Monomer vorliegt. Dies ist von Bedeutung, da eine Oligomerbildung die Eigenschaften der fusionierten Proteine verändern könnte. Das Protein mKikGR entstand durch den gezielten Austausch von 21 Aminosäuren an den tetramerbildenden Grenzflächen von KikGR. Der monomere Zustand vom mKikGR Protein wurde mittels analytischer Ultrazentrifugation und Messung der Molekularmasse (30 kDa) analysiert (Habuchi *et al.*, 2008). Um diese Ergebnisse zu überprüfen, wurden FCS-Messungen mit cytosolischem unfusioniertem mKikGR durchgeführt. Nach partieller Photokonversion von mKikGR liegen zwei Proteinpopulationen vor, die grüne und rote Fluoreszenzen aufweisen. Als Kontrolle für eine Tetramerbildung diente das tetramere PCFP Kaede (Ando, *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 2009). Mit mKikGR und Kaede transient transfizierte Zellen wurden so lange mit einem auf das Cytosol fokussierten Laser bestrahlt, bis ca. 50% der Proteine photokonvertiert waren. Unter Annahme einer dreidimensionalen Bewegung der Moleküle mit einer Komponente wurden normierte Autokorrelations- und Kreuzkorrelations-Kurven der grünen und roten Fluoreszenzen mit Hilfe der FCS ermittelt (siehe Abschnitt 4.5 und Abb. 12). Für mKikGR wurde keine Kreuzkorrelation detektiert, womit die bereits publizierten Daten bestätigt werden konnten (Habuchi *et al.*, 2008). Das mKikGR Protein liegt daher tatsächlich als Monomer vor. Bei Kaede wurde eine signifikante Kreuzkorrelation bestimmt, d.h. dieses Protein liegt wie ebenfalls zuvor beschrieben als Oligomer vor (Schmidt *et al.*, 2009).



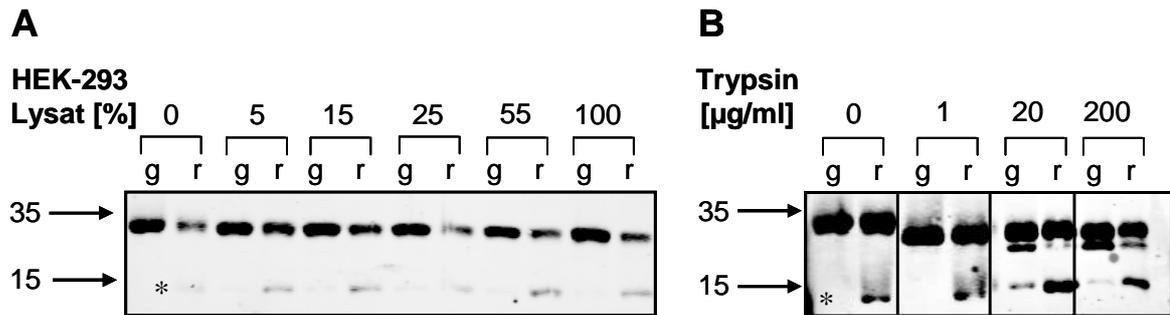
**Abb. 12: FCS-Messungen an mit den Konstrukten mKikGR und Kaede transient transfizierten HEK-293-Zellen.** Die Zellen wurden so lange mit UV-Licht bestrahlt (405 nm Laser), bis ca. 50% der grün fluoreszierenden Kaede bzw. mKikGR Proteine photokonvertiert waren. A) Normierte Autokorrelations- (AC) und Kreuzkorrelations- (CC) Kurven für mKikGR (links) und Kaede (rechts) B) Statistische Analyse der erhaltenen Kreuzkorrelationskurven für mKikGR und Kaede. Balken repräsentieren die Mittelwerte ( $n < 20$  Zellen) der Kreuzkorrelation in Prozent ( $\pm$  S.D.). Ein Kreuzkorrelationswert von 30% (wie im Fall von Kaede) deutet auf oligomere/tetramere Moleküle hin. Dagegen ist der Kreuzkorrelationswert von mKikGR (6%) vernachlässigbar und zeigt, dass das mKikGR-Protein als Monomer vorliegt. (Hintergrundwert von zwei unabhängigen Fluorophoren nach Co-Transfektion = 5%) \*\*\* $p < 0,0001$  (Ridelis *et al.*, 2012).

### 5.3.2 Die Stabilität des mKikGR Proteins wird nicht durch Photokonversion beeinflusst

Durch UV-Bestrahlung der PCFP findet eine  $\beta$ -Eliminationsreaktion statt. Dabei wird das Polypeptidrückgrat zwischen  $N\alpha$  und  $C\alpha$  des Histidins an der Stelle 62 (H62) irreversibel gespalten. Das grüne Chromophor bildet nach Abspaltung durch Elongation eines  $\pi$ -konjugierten Ringsystems das rote Chromophor (Mizuno *et al.*, 2003, Nienhaus *et al.*, 2005; Tsutsui *et al.*, 2009). Solche Umlagerungen könnten eine Auswirkung auf die Proteinestabilität haben und Langzeitversuche beeinträchtigen. Aufgrund dessen wurde vor der Herstellung der eigentlichen Fusionsproteine die proteolytische Stabilität von grünem und rotem mKikGR vor und nach Photokonversion untersucht.

N-terminal His-markiertes mKikGR wurde in *E. coli* Rosseta D3 exprimiert und anschließend aufgereinigt. Das gereinigte Protein wurde photokonvertiert (rotes mKikGR) oder nicht behandelt (grünes mKikGR). Rote und grüne mKikGR wurden mit unterschiedlichen Mengen an HEK-293-Zelllysat inkubiert (siehe Abb. 13 A). Weder beim grünen noch beim roten mKikGR konnte auf einem Immunoblot eine Degradation beobachtet werden, was zeigt, dass beide Chromophore gegen zelluläre Proteasen resistent sind. Des Weiteren wurde ein proteolytischer Verdau der grünen und roten mKikGR-Proteine mit steigenden Trypsinkonzentrationen durchgeführt und die Spaltungsprodukte auf einem Immunoblot detektiert (siehe Abb. 13 B). Das Degradationsmuster von rotem und grünem mKikGR war annähernd gleich, was erneut zeigt, dass sich rotes und grünes mKikGR in der Stabilität nicht wesentlich unterscheiden. Für Kaede und KikGR (Ando *et al.*, 2002; Habuchi *et al.*, 2008) wurde beschrieben, dass nach der

UV-induzierten Polypeptidrückgratsabspaltung zwei Fragmente des roten Chromophors entstehen (jeweils 8 und 23 kDa). Die beiden Fragmente bilden einen stabilen Komplex, der aber nicht vollständig SDS-resistent zu sein scheint. Die auf dem Immunoblot detektierten Banden bei ca. 10 kDa (\* in Abb. 13) könnten das kleinere Fragment des durch die SDS-PAGE dissoziierten Komplexes darstellen. Bei 23 kDa konnte dagegen keine Bande detektiert werden. Dieses könnte dadurch erklärt werden, dass das 23 kDa Fragment das Epitop für die mKikGR-Antikörper nicht mehr besitzt.



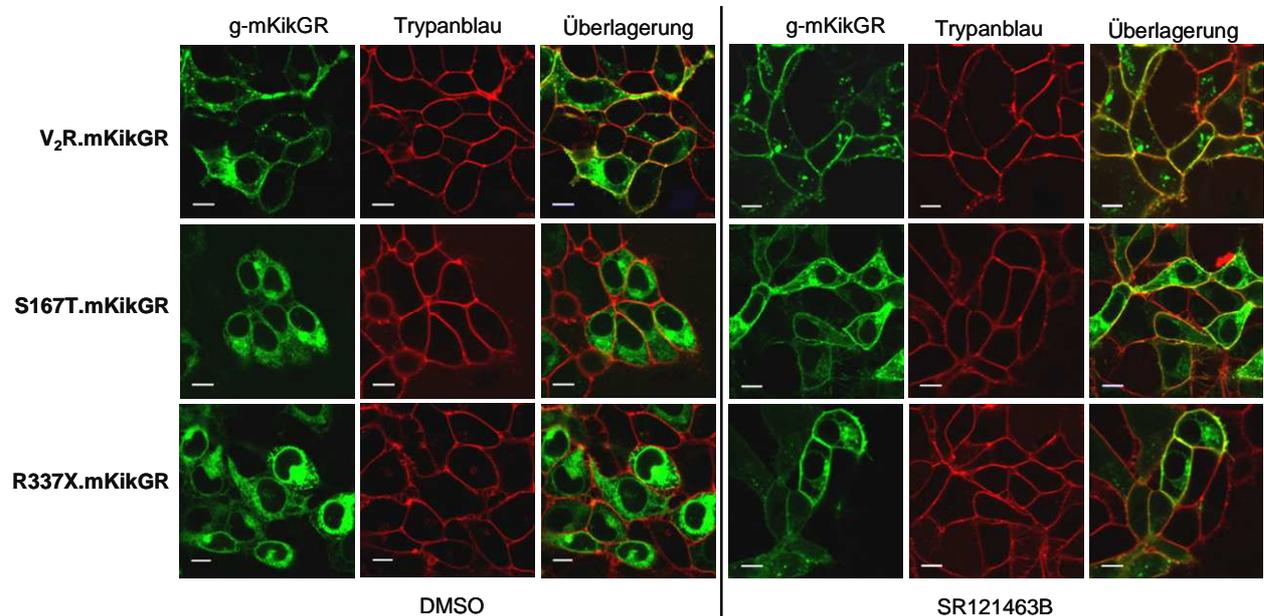
**Abb. 13: *In vitro* Analyse der Stabilität von g-mKikGR und r-mKikGR.** Aufgereinigtes His-mKikGR-Protein wurde durch UV-Bestrahlung zu rotem mKikGR (r) photokonvertiert oder unbehandelt gelassen (grünes mKikGR, g). A) His-mKikGR (3 mg/Bande) wurde mit unterschiedlichen Mengen an HEK-293-Zellysate (0, 5, 15, 25, 55, 100%, 37 °C) inkubiert oder mit B) Trypsin (0, 1, 20, 200 µg/ml, 4 °C) für jeweils 1 h verdaut und auf einem Immunoblot detektiert. Die Detektion erfolgte mit einem monoklonalen  $\alpha$ -KikGR-Antikörper und Dylight-680 konjugiertem  $\alpha$ -Maus-IgG (Ridelis *et al.*, 2012).

### 5.3.3 Analyse der Eigenschaften von V<sub>2</sub>R-mKikGR-Fusionsproteinen

#### 5.3.3.1 mKikGR-Fusionen haben keinen Einfluss auf das Trafficking wildtypischer und mutierter V<sub>2</sub>R

Für die Analyse der Lokalisation von V<sub>2</sub>R-Fusionsproteinen wurden der wildtypische V<sub>2</sub>R und die beschriebenen transportdefekten Mutanten S167T (Bichet *et al.*, 1994) und R337X (Oksche *et al.*, 1998) verwendet. Hierfür wurden die Rezeptoren C-terminal mit mKikGR fusioniert. Um zu überprüfen, ob der mKikGR-Anteil die Lokalisation der Rezeptoren beeinflusst, wurden HEK-293-Zellen mit den Konstrukten V<sub>2</sub>R.mKikGR, S167T.mKikGR und R337X.mKikGR stabil transfiziert. Danach wurde mit Hilfe der konfokalen LSM die Kolokalisation der grünen mKikGR-Rezeptorfluoreszenzen mit dem Zellmembranmarker Trypanblau in lebenden Zellen bestimmt (Abb. 14). Während das Konstrukt V<sub>2</sub>R.mKikGR mit Trypanblau kolokalisiert werden konnte, waren die Rezeptormutanten S167T und R337X intrazellulär retiniert. Die Resultate stimmen mit den veröffentlichten Daten für GFP-Fusionen dieser Mutanten überein (Oksche *et al.*, 1998; Robben *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2003; Wüller *et al.*, 2004). Ferner wurden die Zellen mit dem pharmakologischen Chaperon SR121463B behandelt, um zu untersuchen, ob der Transport zur Zellmembran auch bei mKikGR-Fusionen wiederhergestellt werden kann. Durch die

SR121463B-Behandlung wurden die beiden transportdefekten Rezeptormutanten zur Zellmembran transportiert und konnten mit dem Zellmembranmarker Trypanblau kolokalisiert werden. Diese Versuche zeigen, dass der Transport des V<sub>2</sub>R und seiner Mutanten durch mKikGR-Fusionen nicht beeinflusst wird.



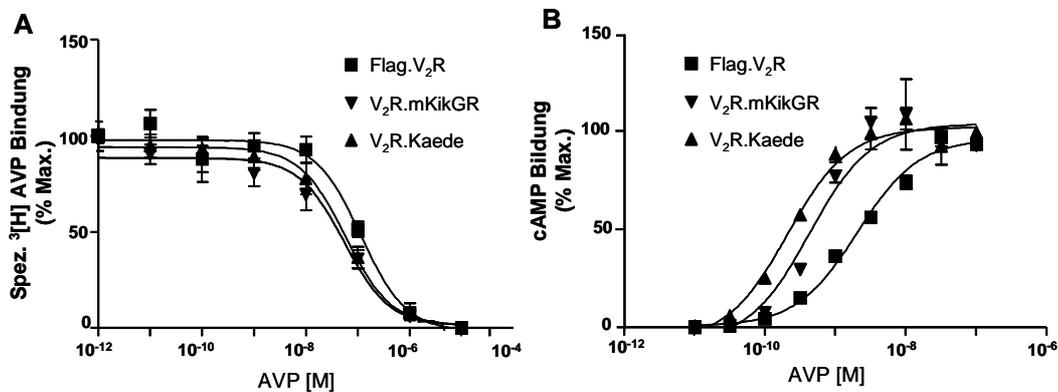
**Abb. 14: Lokalisation der Konstrukte V<sub>2</sub>R.mKikGR, S167T.mKikGR und R337X.mKikGR in stabil transfizierten HEK-293-Zellen.** Die Zellen wurden mit 0,1% DMSO (links) oder mit 1 µM SR121463B (rechts) behandelt. Mit Hilfe der konfokalen LSM wurden die grünen mKikGR Rezeptorsignale (jeweils linke Reihe, g-mKikGR) detektiert. Die Zellmembran wurde mit Trypanblau gefärbt (jeweils mittlere Reihen, Trypanblau) und beide Signale wurden überlagert (jeweils rechte Reihen, Überlagerung). Eine gelbe Färbung zeigt die Kolokalisation an. Alle Bilder sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Größenmaßstab 10 µm (Ridelis *et al.*, 2012).

### 5.3.3.2 Pharmakologische Eigenschaften des V<sub>2</sub>R werden nicht durch mKikGR-Fusionen beeinflusst

Im Folgenden sollten die pharmakologischen Eigenschaften der V<sub>2</sub>R-mKikGR-Fusionen untersucht werden. Entsprechend wurden als Kontrolle C-terminale Kaede Fusionsproteine (Schmidt *et al.*, 2009) und N-terminal Flag-markierte V<sub>2</sub>R eingesetzt (Schwieger *et al.*, 2008). Die jeweiligen Konstrukte wurden in stabil transfizierten HEK-293-Zellen zuerst mit Hilfe eines [<sup>3</sup>H]-AVP Verdrängungsassays untersucht (Abb. 15 A). Die Verdrängungskurven der drei Konstrukte und die ermittelten K<sub>i</sub>-Werte waren vergleichbar (V<sub>2</sub>R.mKikGR = 2.24±1.13 nM; V<sub>2</sub>R.Kaede = 2.69±1.06 nM; Flag.V<sub>2</sub>R = 11.3±1.44 nM) und entsprachen publizierten Daten (Bouley *et al.*, 2003; Schwieger *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2009).

Um die Aktivierung der verschiedenen Konstrukte zu analysieren, wurde die AVP-vermittelte Bildung von cAMP verglichen (siehe Abb. 15 B). Die Konzentrations-Wirkungskurven der V<sub>2</sub>R.mKikGR und V<sub>2</sub>R.Kaede Konstrukte und die entsprechenden EC<sub>50</sub>-Werte waren vergleichbar [V<sub>2</sub>R.mKikGR 0.4 (0.2-0.8) nM; V<sub>2</sub>R.Kaede 0.2 (0.1-0.3) nM]. Bei dem Flag.V<sub>2</sub>R

Konstrukt war die Konzentrations-Wirkungskurve geringfügig nach rechts verschoben [ $EC_{50} = 2.1 (1.6-2.7) \text{ nM}$ ]. Auch hier stimmen die  $EC_{50}$ -Werte weitestgehend mit publizierten Daten überein (Schmidt *et al.*, 2009; Schwieger *et al.*, 2008). Zusammengefasst zeigen diese Versuche, dass mKikGR-Fusionen auch die pharmakologischen Eigenschaften des  $V_2R$  nicht verändern. Damit scheint das Protein als Fusionspartner für GPCR geeignet zu sein.

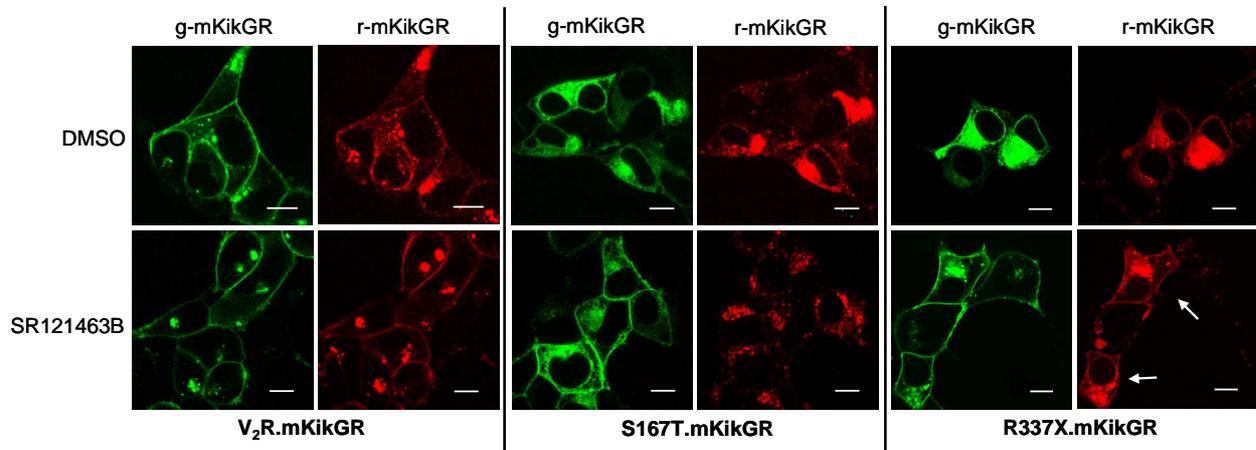


**Abb. 15: Pharmakologische Eigenschaften der Konstrukte Flag.V<sub>2</sub>R, V<sub>2</sub>R.mKikGR und V<sub>2</sub>R.Kaede in stabil transfizierten HEK-293-Zellen.** A) [<sup>3</sup>H]-AVP Verdrängungskurven. Die intakten Zellen wurden mit steigenden Konzentration des unmarkierten Liganden AVP inkubiert und die spezifische Bindung der Radioliganden [<sup>3</sup>H]-AVP bestimmt. B) Konzentrations-Wirkungskurven. Mit Hilfe eines cAMP RIA wurde die AVP-vermittelte cAMP Bildung bestimmt. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ( $\pm$ S.D) jeweils in Dreifachbestimmung dar und wurden auf ihre Maximalwerte (100%) normiert (Ridelis *et al.*, 2012).

#### 5.3.4 Das pharmakologische Chaperon SR121463B kann sowohl co- als auch post-translational wirken

Nachdem bestätigt werden konnte, dass die mKikGR-Fusion die  $V_2R$  Funktionen und den Transport zur Zellmembran nicht beeinflussen, wurde ein zellbasierter Assay entwickelt, mit dessen Hilfe überprüft werden sollte, ob das pharmakologische Chaperon SR121463B co- und/oder post-translational wirkt. Bei diesem Assay wurden die grünen mKikGR Fluoreszenzsignale von V<sub>2</sub>R.mKikGR, S167T.mKikGR und R337X.mKikGR in stabil transfizierten HEK-293-Zellen vollständig zu roten mKikGR Signalen photokonvertiert. In der Folge sind zwei verschiedene Rezeptorpopulationen nachweisbar. Die rote Population repräsentiert bereits synthetisierte Rezeptoren, die grüne stellt neu synthetisierte Rezeptoren dar. Im Anschluss an die Behandlung der Zellen mit SR121463B wurde analysiert, welche Rezeptorpopulation an die Zellmembran transportiert wurde (Abb. 16). Im Fall der S167T-Mutante wurde nur die grüne Rezeptorpopulation an der Zellmembran detektiert. Rot fluoreszierende Rezeptoren blieben dagegen intrazellulär retiniert. Dies zeigt, dass SR121463B bei der S167T-Mutante nur während der Rezeptorsynthese co-translational eingreifen kann und nicht post-translational. Bei der R337X-Mutante konnten dagegen nach Behandlung mit SR121463B beide Rezeptorpopulationen an der Zellmembran detektiert werden, was auch auf eine post-translational Wirkung von SR121463B bei dieser Mutante schließen lässt. Eine co-

translationale Wirkung ist hier ebenfalls wahrscheinlich, jedoch lässt sich diese anhand des Versuchsaufbaus nicht differenzieren: Die grüne Rezeptorpopulation an der Zellmembran könnte sowohl auf eine co- als auch auf eine post-translationale SR121463B-Wirkung zurückzuführen sein.



**Abb. 16: Co- und post-translational vermittelte SR121463B-Wirkung auf den Transport von V<sub>2</sub>R.mKikGR, S167T.mKikGR und R337X.mKikGR in stabil transfizierten HEK-293-Zellen.** Die grünen mKikGR Fluoreszenzsignale der verschiedenen Konstrukte wurden mit Hilfe einer UV-Lampe (45 s) vollständig zu roten Fluoreszenzsignalen konvertiert. Anschließend wurden die Zellen mit SR121463B (1 µM) oder 0,1% DMSO behandelt. Die subzelluläre Lokalisation der vorhandenen (rot) und neu entstehenden grün fluoreszierenden Rezeptoren wurde nach 16 h Inkubation mit Hilfe einer konfokalen LSM analysiert. Die Bilder sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Die Pfeile zeigen das rot fluoreszierende R337X.mKikGR-Konstrukt an der Zellmembran. Größenmaßstab 10 µm (Ridelis *et al.*, 2012).

## 6. Diskussion

### 6.1 Verwendung von HTS-Assays zur Identifizierung pharmakologischer Wirkstoffe

Das in der vorliegenden Arbeit entwickelte HTS bietet die Möglichkeit, kleine Moleküle zu identifizieren, welche als pharmakologische Chaperone oder als allosterische Modulatoren wirken. Diese Substanzen haben das Potential, die Faltung von mutierten Proteinen zu stabilisieren, die Erkrankungen wie beispielsweise NDI verursachen. Mit dem Assay können ferner Wirkstoffe identifiziert werden, die Komponenten der Qualitätskontrolle oder der Degradierung von integralen Membranproteinen beeinflussen.

Ein wichtiger Vorteil des hier entwickelten HTS-Assays besteht in der Anwendung der automatischen Mikroskopie, welche eine objektive Quantifizierung der Proteinexpression verschiedener Membranproteine ermöglicht. Weitere wichtige Vorzüge des HTS bestehen in der Verwendung von lebenden Zellen sowie in einer einfachen Übertragbarkeit auch auf andere Membranproteine, deren Fehlfaltung und/oder -transport ebenfalls zu Erkrankungen führen

können. Einen Nachteil des Assays stellt die Verwendung von HEK-293-Zellen dar. Es zeigte sich, dass sich diese Zellen je nach Anzahl der Waschschriffe von den Zellkulturplatten relativ leicht ablösen. Obwohl in dieser Arbeit lediglich ein Waschschriff notwendig war, wurden kollagenbeschichtete Zellkulturplatten verwendet, um das Ablösen der Zellen zu minimieren. Zukünftig sollten daher robustere Zellsysteme wie z.B. Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) Zellen Anwendung finden, die sich im Vergleich zu HEK-293-Zellen weniger leicht von den Zellkulturplatten ablösen. Auch der Einsatz von Trypanblau als Zellmembranmarker sollte überdacht werden, da die Substanz nach relativ kurzer Zeit (ca. 90 min) in die Zellen eindringt. In diesem Fall kann es zu einer intrazellulären Kolokalisation der GFP-Fluoreszenz der Rezeptoren und der roten Fluoreszenz des Zellmembranmarkers kommen. Diese Kolokalisation wird vom automatischen Mikroskop falsch interpretiert und es kommt zur Identifizierung falsch positiver Hits. Bei einer weiteren Optimierung dieses Screening-Verfahrens sollten daher zukünftig geeignetere Zellmembranmarker wie beispielsweise Antikörper berücksichtigt werden. Es ist bereits eine Vielzahl von Antikörpern auf dem Markt verfügbar, die sich eventuell als Zellmembranmarker eignen. Nachteilig wäre, dass diese lediglich bei fixierten Zellen verwendet werden können. Andere Zellmembranmarker wie CellMask, die in lebenden Zellen eingesetzt werden, sind zwar weniger toxisch als Trypanblau, besitzen aber den Nachteil, dass sie noch schneller internalisieren (ca. 30 min).

Die Basis vieler Screeningmethoden von GPCR stellt die Messung der Proteinfunktionalität dar (Titus *et al.*, 2008) wie z.B. bei zellbasierten cAMP-Verfahren. Diese besitzen den Vorteil der Proteinspezifität und berücksichtigen dabei die Aktivität des "geretteten" Zielproteins, lassen sich jedoch nicht, wie das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte HTS, ohne weiteres auf andere Membranproteine übertragen.

## **6.2 Einfluss der Substanz 23933 auf den Transport der V<sub>2</sub>R-L336T-Mutante**

Im Anschluss an das primäre Screening erfolgte die Charakterisierung der erhaltenen Hits. Die Substanzenbibliothek beinhaltet hauptsächlich kleine und sehr hydrophobe Moleküle, die z.T. in DMSO gelöst sind. Eine gewisse Hydrophobizität der Substanzen ist zwar notwendig, damit diese die Zellmembran passieren können, einige der Hitsubstanzen präzipitierten aber bei höheren Konzentrationen (>30 µM). Auf deren Analyse und Charakterisierung wurde deshalb verzichtet. Bei der in dieser Arbeit detaillierter beschriebenen Substanz 23933 wurde dagegen auch bei höheren Konzentrationen (bis 70 µM) keine Präzipitation beobachtet. Diese Substanz zeigte im Vergleich zu anderen Hitsubstanzen nach der Validierung des primären Screenings die beste Wirkung auf den Transport der V<sub>2</sub>R-L336T-Mutante. Der Biotinylierungsassay und die Untersuchung der Rezeptorexpression legen nahe, dass 23933 nicht wie ein klassisches pharmakologisches Chaperon wirkt, sondern einen anderen Wirkmechanismus aufweist. Ein typisches pharmakologisches Chaperon erhöht die Expression des Rezeptors an der

Zellmembran, indem es die korrekte Faltung des Rezeptors unterstützt. Dadurch werden intrazellulär retinierte mannosereiche Glykosylierungsformen in komplexglykosylierte Formen überführt. Die Behandlung mit 23933 führte jedoch zu einer stärkeren Expression beider Glykosylierungsformen. Die Zunahme der mannosereichen Glykosylierung könnte auch aus der Inhibition der QCS-vermittelten Rezeptordegradierung resultieren. Eine Erhöhung der Gesamtexpression des Rezeptors durch Beeinflussung des Promotors konnte dagegen mittels RT-PCR und Vergleichsuntersuchungen am CRF<sub>1</sub>R ausgeschlossen werden. Der genaue Wirkmechanismus und die Bindungsstelle der Substanz 23933 bleiben bis zum jetzigen Zeitpunkt unbekannt. Es wäre denkbar, dass 23933 orthosterisch an die AVP-Bindungsstelle bindet, sich aber von Liganden verdrängen lässt oder dass 23933 allosterisch bindet und die AVP-Bindung nicht beeinflusst. Um eine direkte Bindung der Substanz an den Rezeptor zu überprüfen, würde sich das Biacore System eignen, bei dem Proteininteraktionen durch Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SRP) in Echtzeit detektiert werden können. Diese Methode basiert auf einem Sensor-Chip, der mit einer biospezifischen Oberfläche versehen ist. Einer der beiden zu untersuchenden Bindungspartner, beispielsweise der Ligand 23933, könnte zunächst auf der Sensoroberfläche immobilisiert werden. Der andere Bindungspartner, in diesem Fall eine V<sub>2</sub>R-Mutante, könnte dann mit Hilfe eines Mikrofluss-Systems über diese Oberfläche geleitet werden. Voraussetzung für solche Messungen sind jedoch aufgereinigte Proteine, und dies ist gerade bei integralen Membranproteinen wie den GPCR nur sehr schwer umzusetzen. Eine weitere Methode könnte die Modellierung der Interaktion zwischen dem V<sub>2</sub>R und der Substanz 23933 darstellen. Anschließend könnten gerichtete Mutationen an den Regionen des Rezeptormoleküls erfolgen, an denen wahrscheinlich die Interaktion mit den Liganden stattfindet. Entsprechende Untersuchungen werden aktuell allerdings dadurch erschwert, dass die Substanz 23933 neu synthetisiert werden müsste und das Molekül sehr komplex ist. Derzeit ist 23933 nicht kommerziell erhältlich und im FMP liegen nur noch Restbestände vor.

### **6.3 mKikGR als Fusionsprotein und die Wirkung von SR121463B auf den Transport von V<sub>2</sub>R-Mutanten**

Das in dieser Arbeit untersuchte mKikGR Protein wurde zum ersten Mal als Fusionsprotein mit einem Membranprotein eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass mKikGR in zellulärem Milieu als Monomer vorliegt und dass dessen Stabilität durch die Photokonversion mittels UV-Licht nicht beeinträchtigt wird. Zudem belegen die Ergebnisse, dass weder der Transport noch die pharmakologischen Eigenschaften des V<sub>2</sub>R und dessen Mutanten durch die C-terminale mKikGR Fusion beeinträchtigt werden (Ridelis *et al.*, 2012). Durch die Fähigkeit zur Photokonversion eignen sich mKikGR Fusionen hervorragend, um den Transport von GPCR zwischen verschiedenen Zellkompartimenten zu untersuchen. Sobald das mit mKikGR

fusionierte Zielprotein ein bestimmtes subzelluläres Kompartiment erreicht hat, lässt sich die Fluoreszenz von mKikGR mittels UV-Bestrahlung umschalten und der weitere Proteintransport durch die Analyse der neuen Fluoreszenz verfolgen. Dadurch könnte zukünftig eine Vielzahl unterschiedlicher Transportprozesse in Zellen in Echtzeit untersucht werden. Ein weiteres PCFP stellt das bereits beschriebene Protein Kaede dar, welches verwendet wurde, um GPCR-Recycling (Schmidt *et al.*, 2009) und GPCR-Biosynthese (Westendorf *et al.*, 2011) zu untersuchen. Nach einer Fusionierung von Kaede mit einem Membranprotein kommt es zwar nicht mehr zu einer Tetramerisierung; in löslicher Form neigt Kaede dagegen zur Tetramerbildung (Schmidt *et al.*, 2009). Das in dieser Arbeit verwendete mKikGR stellt daher eine gute Alternative zu Kaede dar. mKikGR liegt als Monomer in der Zelle vor und hat noch weitere spektroskopische Vorteile gegenüber Kaede. So ist die Quantenausbeute von mKikGR höher, es lässt sich schneller photokonvertieren und ist weniger sensitiv für *Photobleaching*-Prozesse (Tsutsui *et al.*, 2005). Mit Hilfe von mKikGR könnten neue Assays entwickelt werden, um Transportwege in der Zelle genauer zu untersuchen. Auf Basis der Umschaltung von mKikGR ließe sich somit beispielsweise die Degradation von Proteinen analysieren und Halbwertszeiten hierfür bestimmen. Eine ähnliche Methode wurde bereits durch Zhang *et al.*, beschrieben. Die Autoren stellten ein Degradationsassay mit Dendra2-fusionierten Proteinen vor. Dabei wurde anhand einer Durchflusszytometrie die Abbaukinetik des Proteins über die Zeit gemessen (Zhang *et al.*, 2007). Der Vorteil gegenüber der häufig für Degradationsmessungen eingesetzten *Pulse Chase*-Methode wäre, dass keine radioaktive Markierung des Liganden erforderlich ist.

In dieser Arbeit wurden die V<sub>2</sub>R-mKikGR Fusionen genutzt, um den Wirkmechanismus des pharmakologischen Chaperons SR121463B zu analysieren. Es wurde bereits beschrieben, dass SR121463B die Faltung des V<sub>2</sub>R auf post-translationaler Ebene beeinflusst (Wüller *et al.*, 2004). Im Rahmen der vorliegenden Studien konnte nach vollständiger Photokonversion der mit mKikGR markierten Rezeptoren gezeigt werden, dass die SR121463B-Wirkung sowohl co- als auch post-translational erfolgen kann. Diese Schlussfolgerung basiert auf dem beobachteten Unterschied des SR121463B-Effekts auf den Transport der Mutanten S167T und R337X an die Zellmembran. Bei der S167T-Mutante wurde ein ausschließlich co-translationaler Wirkmechanismus gezeigt. Im Fall der R337X-Mutante ist dagegen eine post-translational Wirkung beteiligt, wobei auch eine zusätzliche co-translational Komponente nicht ausgeschlossen werden kann. Dieser Unterschied in der Wirkungsebene könnte auf dem Grad des Faltungsdefektes der Ligandenbindungstasche der jeweiligen Mutante beruhen. Bei der R337X Mutante ist die achte Helix des intrazellulären C-Terminus des Rezeptors trunkiert. Möglicherweise ist der Faltungsdefekt der Bindungstasche hier nicht so schwerwiegend, so dass SR121463B auch noch post-translational binden kann, d.h. wenn der Rezeptor vollständig synthetisiert ist. Diese vermutete weniger gravierende Fehlfaltung der R337X-Mutante könnte

auch publizierte Daten erklären, die zeigten, dass diese Mutante auch post-ER-Kompartimente wie das ERGIC erreichen kann (Hermosilla *et al.*, 2004). Dies würde auf eine weniger effektive Retention durch das QCS im ER hindeuten. Im Gegensatz dazu wurde die S167T-Mutante ausschließlich im ER retiniert, was auf einen schwerwiegenden Faltungsdefekt hindeutet (Robben *et al.*, 2005). Die Fehlfaltung könnte hier eine Konformationsänderung der Bindungstasche verursachen, die diese für SR121463B unzugänglich macht. Die Substanz könnte dann lediglich co-translational, d.h. während der Biosynthese der S167T-Mutante binden und so die korrekte Ausbildung der Bindungstasche und in der Folge des gesamten Rezeptors fördern. Eine post-translationale Wirkung von SR121463B wäre hier nicht möglich. Diese Überlegungen könnten durch Bindungsstudien an intrazellulären Rezeptoren überprüft werden. Hier sollte die R337X-Mutante in der Lage sein, AVP zu binden, die S167T-Mutante dagegen nicht.

In den letzten Jahren konzentrierte sich die Forschung bei Faltungsdefekten, krankheitsauslösenden Membranproteinen auf die Suche nach pharmakologischen Chaperonen, welche die Faltungsdefekte beheben können. Eine grundsätzlich neue Strategie zur Behandlung von NDI könnten nicht-peptidische Agonisten darstellen, welche die V<sub>2</sub>R-Mutanten intrazellulär aktivieren. Robben *et al.* beschreiben, dass die Aktivierung von intrazellulär retinierten V<sub>2</sub>R-Mutanten durch solche Agonisten effektiver ist als durch pharmakologische Chaperone, da der Transport der Rezeptoren zur Zellmembran und die anschließende Verdrängung durch AVP für die Signalaktivierung umgangen wird (Robben *et al.*, 2009). Eine Voraussetzung für die Verwendung als therapeutisches Arzneimittel wäre jedoch, dass der Agonist ein möglichst breites Spektrum verschiedener Mutanten aktiviert. Es muss vor allem überprüft werden, ob diese Agonisten auch bei Bindungsdefekten Rezeptormutanten wirken. Hier könnten pharmakologische Chaperone Vorteile zeigen, da sie die Rezeptorfaltung auch auf einer sehr frühen Stufe (co-translational) beeinflussen.

## 7. Ausblick

In den vorliegenden Studien wurde durch ein HTS die Substanz 23933 identifiziert, welche den Transport der L336T-Mutante des  $V_2R$  an die Zellmembran verbessert. Um den Wirkmechanismus zu klären, sind weiterführende Untersuchungen speziell für die genaue Bindungsstelle am Rezeptor notwendig. Sofern die Substanz mit dem Rezeptor direkt interagiert, könnten hierfür molekulare Modellierungs-Studien und gerichtete Mutagenese eingesetzt werden. Des Weiteren sollte die Selektivität der Substanz 23933 noch eingehender analysiert werden. Bisher wurde der Einfluss von 23933 lediglich auf den Transport des wildtypischen  $V_2R$  und der L336T-Mutante getestet. Der  $V_{1a}R$  weist eine hohe Homologie zum  $V_2R$  auf. Mit diesem Rezeptor könnte geklärt werden, ob 23933 selektiv auf den  $V_2R$  wirkt. Im Fall einer indirekten Wirkung von 23933, wie z.B. bei einer Interaktion mit Komponenten des QCS, sollte auch das Trafficking anderer transportdefekter Rezeptoren zur Zellmembran beeinflusst werden. Würde eine geringere intrazelluläre Retention der fehlgefalteten Rezeptoren nach Behandlung mit der Substanz 23933 beobachtet werden, wäre die erwähnte Interaktion von 23933 mit Komponenten des QCS sehr wahrscheinlich.

Auf Basis der photokonvertierbaren Proteine Kaede oder mKikGR ergibt sich eine Vielzahl von neuen Möglichkeiten zur Untersuchung des Transports von Membranproteinen. Bisher wurden mittels PCFP Rezeptor-Recycling und -Biosynthese sowie die Wirkung des pharmakologischen Chaperons SR121463B auf den Rezeptortransport untersucht (Schmidt *et al.*, 2009; Westendorf *et al.*, 2011; Ridelis *et al.*, 2012). Die Entwicklung weiterer zellbasierter Assays mit Hilfe von mKikGR könnte die Analyse des Proteintransports zwischen subzellulären Kompartimenten ermöglichen, wie beispielsweise zwischen ER und Golgi-Apparat oder Golgi-Apparat und Zellmembran.

Darüber hinaus könnte die Photokonvertierbarkeit der Rezeptoren Studien zu den Transportkinetiken zwischen den einzelnen Kompartimenten erlauben. Ferner könnte geklärt werden, ob sich die Transportgeschwindigkeiten von Proteinen unter bestimmten Bedingungen wie z.B. zellulärem Stress ändern.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC	Autokorrelation
ADP	Adenosindiphosphat
AQP2	Aquaporin 2
ATP	Adenosintriphosphat
AT <sub>2</sub> R	Angiotensin 2 Rezeptor
AVP	8-Arginin-Vasopressin
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CC	Kreuzkorrelation
cpm	<i>Counts per minute</i> , Impulse pro Minute
CRF <sub>1</sub> R	<i>Corticotropin-Releasing-Factor</i> - Rezeptor 1
CRF <sub>2a</sub> R	<i>Corticotropin-Releasing-Factor</i> - Rezeptor 2a
DMEM	Dulbecco's modified eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	<i>Desintegration per minute</i> , Zerfälle pro Minute
EC <sub>50</sub>	<i>Half maximal effective concentration</i> , mittlere effective Dosis
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziiertes Degradationsweg
ERGIC	ER-Golgi-Intermediärkompartiment
ET <sub>B</sub> R	Endothelin Rezeptor B
FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
FMP	Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Berlin
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	grünfluoreszierendes Protein
g-Kaede	grünfluoreszierendes Kaede
g-mKikGR	grünfluoreszierendes mKikGR
GnRHR	<i>Gonadotropin-Releasing-Hormone</i> - Rezeptor
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guaninnukleotid bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat

HEK-293-Zellen	<i>human embryonic kidney cells</i> , humane embryonale Nierenzellen
HH	hypogonadotroper Hypogonadismus
HTS	<i>High Throughput Screening</i> , Hochdurchsatzverfahren
$I_{\text{cyt}}$	Rezeptor-Fluoreszenzintensität im Cytosol
IgG	Immunglobulin G
$I_{\text{mem}}$	Rezeptor-Fluoreszenzintensität an der Zellmembran
$K_i$	Inhibitionskonstante
KikGR	<i>Kikume Green-Red</i>
LSM	<i>Laser Scanning Microscopy</i>
mKikGR	monomerische <i>Kikume Green-Red</i>
mV <sub>2</sub> R	muriner Vasopressin-Rezeptor Typ 2
$\mu$ OR	$\mu$ -Opioid Rezeptor
NDI	nephrogener Diabetes Insipidus
PAR <sub>1</sub>	Protease-aktivierter-Rezeptor 1
PBS	Phosphatpuffer
PBS-CM	Phosphatpuffer mit Kalziumchlorid und Magnesiumchlorid
PCFP	photokonvertierbares Fluoreszenzprotein
QCS	Qualitätskontrollsystem
RIA	Radioimmunoassay
r-Kaede	rotfluoreszierendes Kaede
r-KikGR	rotfluoreszierendes KikGR
RP	Retinitis Pigmentosa
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Quantitative <i>Real Time</i> Polymerase-Kettenreaktion
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SP	Signalpeptid
SRP	<i>Signal recognition particle</i>
UTS <sub>2</sub> R	Urotensin 2 Rezeptor
UV	Ultraviolett
V <sub>1a</sub> R	humaner Vasopressin-Rezeptor Typ 1a
V <sub>2</sub> R	humaner Vasopressin-Rezeptor Typ 2
VCAM1	Zelladhäsionsmolekül 1
$\lambda_{\text{em}}$	Emissionswellenlänge
$\lambda_{\text{exc}}$	Anregungswellenlänge

## 9. Literaturverzeichnis

- Abeijon,C., Mandon,E.C., Hirschberg,C.B. (1997). Transporters of nucleotide sugars, nucleotide sulfate and ATP in the Golgi apparatus. *Trends Biochem. Sci.* 22, 203-207.
- Ando,R., Hama,H., Yamamoto-Hino,M., Mizuno,H., Miyawaki,A. (2002). An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12651-12656.
- Audigier,Y., Friedlander,M., Blobel,G. (1987). Multiple topogenic sequences in bovine opsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 5783-5787.
- Bacia,K., Schwille,P. (2007). Fluorescence correlation spectroscopy. *Methods Mol. Biol.* 398, 73-84.
- Belin,D., Bost,S., Vassalli,J.D., Strub,K. (1996). A two-step recognition of signal sequences determines the translocation efficiency of proteins. *EMBO J.* 15, 468-478.
- Bernier,V., Lagace,M., Lonergan,M., Arthus,M.F., Bichet,D.G., Bouvier,M. (2004). Functional rescue of the constitutively internalized V2 vasopressin receptor mutant R137H by the pharmacological chaperone action of SR49059. *Mol. Endocrinol.* 18, 2074-2084.
- Besemer,J., Harant,H., Wang,S., Oberhauser,B., Marquardt,K., Foster,C.A., Schreiner,E.P., de Vries,J.E., Dascher-Nadel,C., Lindley,I.J. (2005). Selective inhibition of cotranslational translocation of vascular cell adhesion molecule 1. *Nature.* 436, 290-293.
- Bichet,D.G. (2006). Nephrogenic diabetes insipidus. *Adv. Chronic. Kidney Dis.* 13, 96-104.
- Bichet,D.G. *et al.* (1994). Nature and recurrence of AVPR2 mutations in X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *Am. J. Hum. Genet.* 55, 278-286.
- Birnbaumer,M. (2000). Vasopressin receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* 11, 406-410.
- Birnbaumer,M. (2002). V2R structure and diabetes insipidus. *Receptors. Channels.* 8, 51-56.
- Bonifacino,J.S. Weissman,A.M. (1998). Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 19-57.
- Bouley,R., Sun,T.X., Chenard,M., McLaughlin,M., McKee,M., Lin,H.Y., Brown,D., Ausiello,D.A. (2003). Functional role of the NPxxY motif in internalization of the type 2 vasopressin receptor in LLC-PK1 cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 285, 750-762.

- Brodsky, J.L. (1998) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Int. Rev. Cytol.* 17, 277-328
- Chen, C.H., Chen, W.Y., Liu, H.L., Liu, T.T., Tsou, A.P., Lin, C.Y., Chao, T., Qi, Y., Hsiao, K.J. (2002). Identification of mutations in the arginine vasopressin receptor 2 gene causing nephrogenic diabetes insipidus in Chinese patients. *J. Hum. Genet.* 47, 66-73.
- Chudakov, D.M., Lukyanov, S., Lukyanov, K.A. (2005). Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging. *Trends Biotechnol.* 23, 605-613.
- Conn, P.M., Janovick, J.A. (2011). Pharmacoperone identification for therapeutic rescue of misfolded mutant proteins. *Front Endocrinol. (Lausanne)*. 2, 1-15.
- Conn, P.M., Ulloa-Aguirre, A., Ito, J., Janovick, J.A. (2007). G protein-coupled receptor trafficking in health and disease: lessons learned to prepare for therapeutic mutant rescue in vivo. *Pharmacol. Rev.* 59, 225-250.
- Czaplewski, C., Kazmierkiewicz, R., Ciarkowski, J. (1998). Molecular modeling of the human vasopressin V2 receptor/agonist complex. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 12, 275-287.
- Ellgaard, L., Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 181-191.
- Forloni, G. *et al.* (2002). Protein misfolding in Alzheimer's and Parkinson's disease: genetics and molecular mechanisms. *Neurobiol. Aging* 23, 957-976.
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M.C., Lundin, L.G., Schioth, H.B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* 63, 1256-1272.
- Fujiwara, T.M., Bichet, D.G. (2005). Molecular biology of hereditary diabetes insipidus. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 2836-2846.
- Garrison, J.L., Kunkel, E.J., Hegde, R.S., Taunton, J. (2005). A substrate-specific inhibitor of protein translocation into the endoplasmic reticulum. *Nature.* 436, 285-289.
- Habuchi, S., Tsutsui, H., Kochaniak, A.B., Miyawaki, A., van Oijen, A.M. (2008). mKikGR, a monomeric photoswitchable fluorescent protein. *PLoS. One.* 3, e3944.
- Haga, T., Takeda, S. (2006). *G Protein-Coupled Receptors: Structure, Function and Ligand Screening*, Taylor & Francis Group, LLC.

- Heilker,R., Wolff,M., Tautermann,C.S., Bieler,M. (2009). G-protein-coupled receptor-focused drug discovery using a target class platform approach. *Drug Discov. Today.* 14, 231-240.
- Hermosilla,R., Oueslati,M., Donalies,U., Schonenberger,E., Krause,E., Oksche,A., Rosenthal,W., Schülein,R. (2004). Disease-causing V(2) vasopressin receptors are retained in different compartments of the early secretory pathway. *Traffic.* 5, 993-1005.
- Higy,M., Junne,T., Spiess,M. (2004). Topogenesis of membrane proteins at the endoplasmic reticulum. *Biochemistry.* 43, 12716-12722.
- Hutter,H. (2006). Fluorescent reporter methods. *Methods Mol. Biol.* 351, 155-173.
- Hwang,L.C., Wohland,T. (2007). Recent advances in fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Cell Biochem. Biophys.* 49, 1-13.
- Jungnickel,B., Rapoport,T.A. (1995). A posttargeting signal sequence recognition event in the endoplasmic reticulum membrane. *Cell.* 82, 261-270.
- Kulesa,P.M., Teddy,J.M., Stark,D.A., Smith,S.E., McLennan,R. (2008). Neural crest invasion is a spatially-ordered progression into the head with higher cell proliferation at the migratory front as revealed by the photoactivatable protein, KikGR. *Dev. Biol.* 316, 275-287.
- Kyhse-Andersen,J. (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 10, 203-209.
- Landry,Y., Gies,J.P. (2008). Drugs and their molecular targets: an updated overview. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 22, 1-18.
- Lippincott-Schwartz,J., Altan-Bonnet,N., Patterson,G.H. (2003). Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells. *Nat. Cell Biol. Suppl,* S7-14.
- Lukyanov,K.A., Chudakov,D.M., Lukyanov,S., Verkhusha,V.V. (2005). Innovation: Photoactivatable fluorescent proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 885-891.
- Mizuno,H., Mal,T.K., Tong,K.I., Ando,R., Furuta,T., Ikura,M., Miyawaki,A. (2003). Photo-induced peptide cleavage in the green-to-red conversion of a fluorescent protein. *Mol. Cell.* 12, 1051-1058.
- Morello,J.P. *et al.* (2000). Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J. Clin. Invest.* 105, 887-895.

- Nienhaus,K., Nienhaus,G.U., Wiedenmann,J., Nar,H. (2005). Structural basis for photo-induced protein cleavage and green-to-red conversion of fluorescent protein EosFP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 9156-9159.
- Noorwez,S.M., Kuksa,V., Imanishi,Y., Zhu,L., Filipek,S., Palczewski,K., Kaushal,S. (2003). Pharmacological chaperone-mediated in vivo folding and stabilization of the P23H-opsin mutant associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *J. Biol. Chem.* 278, 14442-14450.
- Nowotschin,S., Hadjantonakis,A.K. (2009). Use of KikGR a photoconvertible green-to-red fluorescent protein for cell labeling and lineage analysis in ES cells and mouse embryos. *BMC. Dev. Biol.* 9, 9-49.
- Oksche,A., Dehe,M., Schülein,R., Wiesner,B., Rosenthal,W. (1998). Folding and cell surface expression of the vasopressin V2 receptor: requirement of the intracellular C-terminus. *FEBS Lett.* 424, 57-62.
- Oksche,A., Schülein,R., Rutz,C., Liebenhoff,U., Dickson,J., Muller,H., Birnbaumer,M., Rosenthal,W. (1996). Vasopressin V2 receptor mutants that cause X-linked nephrogenic diabetes insipidus: analysis of expression, processing, and function. *Mol. Pharmacol.* 50, 820-828.
- Oksche,A., Leder,G., Valet,S., Platzer,M., Hasse,K., Geist,G., Krause,G., Rosenthal,A., Rosenthal,W. (2002) Variant amino acids in the extracellular loops of murine and human vasopressin V2 receptors account for differences in cell surface expression and ligand affinity. *Mol. Endocrinol.* 16, 799-724
- Osborne,A.R., Rapoport,T.A., van den Berg,B. (2005). Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 529-550.
- Parodi,A.J. (2000). Protein glycosylation and its role in protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 69-93.
- Reits,E.A., Neefjes,J.J. (2001). From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. *Nat. Cell Biol.* 3, 145-147.
- Ridelis,I., Schmidt,A., Teichmann,A., Furkert,J., Wiesner,B., Schülein,R. (2012). Use of Kikume green-red fusions to study the influence of pharmacological chaperones on trafficking of G protein-coupled receptors. *FEBS Lett.* [Epub ahead of print]

- Ridelis,I., Vogelbein,S., Friedl,S., Westendorf,C., Rosenthal,W., von Kries.J.P., Wiesner,B., Schülein,R. (2012). A high throughput screening assay to identify substances facilitating trafficking of transport-defective mutant membrane proteins. Submitted
- Robben,J.H., Knoers,N.V., Deen,P.M. (2005). Characterization of vasopressin V2 receptor mutants in nephrogenic diabetes insipidus in a polarized cell model. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 289, 265-272.
- Robben,J.H., Kortenoeven,M.L., Sze,M., Yae,C., Milligan,O., Oorschot,V.M., Klumpermann, J., Knoers,N.V., Deen,P.M. (2009). Intracellular activation of vasopressin V2 receptor mutants in nephrogenic diabetes insipidus by nonpeptide agonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 12195-12200.
- Robben,J.H., Sze,M., Knoers,N.V., Deen,P.M. (2007). Functional rescue of vasopressin V2 receptor mutants in MDCK cells by pharmacochaperones: relevance to therapy of nephrogenic diabetes insipidus. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 292, 253-260.
- Rosenbaum,D.M. *et al.* (2011). Structure and function of an irreversible agonist-beta(2) adrenoceptor complex. *Nature.* 469, 236-240.
- Ruddock,L.W., Molinari,M. (2006) N-glycan processing in ER quality control. *J. Cell Sci.* 1, 4373-80.
- Sadeghi,H., Birnbaumer,M. (1999). O-Glycosylation of the V2 vasopressin receptor. *Glycobiology.* 9, 731-737.
- Sadeghi,H.M., Innamorati,G., Dagarag,M., Birnbaumer,M. (1997). Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor. *Mol. Pharmacol.* 52, 21-29.
- Schmidt,A., Wiesner,B., Weisshart,K., Schulz,K., Furkert,J., Lamprecht,B., Rosenthal,W., Schülein,R. (2009). Use of Kaede fusions to visualize recycling of G protein-coupled receptors. *Traffic.* 10, 2-15.
- Schülein,R., Rutz,C., Rosenthal,W. (1996). Membrane targeting and determination of transmembrane topology of the human vasopressin V2 receptor. *J. Biol. Chem.* 271, 28844-28852.
- Schülein,R., Zuhlke,K., Oksche,A., Hermosilla,R., Furkert,J., Rosenthal,W. (2000). The role of conserved extracellular cysteine residues in vasopressin V2 receptor function and

- properties of two naturally occurring mutant receptors with additional extracellular cysteine residues. *FEBS Lett.* 466, 101-106.
- Schulz,K., Rutz,C., Westendorf,C., Ridelis,I., Vogelbein,S., Furkert,J., Schmidt,A., Wiesner,B., Schülein,R. (2010). The pseudo signal peptide of the corticotropin-releasing factor receptor type 2a decreases receptor expression and prevents Gi-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity. *J. Biol. Chem.* 285, 32878-32887.
- Schwieger,I., Lautz,K., Krause,E., Rosenthal,W., Wiesner,B., Hermosilla,R. (2008). Derlin-1 and p97/valosin-containing protein mediate the endoplasmic reticulum-associated degradation of human V2 vasopressin receptors. *Mol. Pharmacol.* 73, 697-708.
- Serradeil-Le Gal,C. (2001). An overview of SR121463, a selective non-peptide vasopressin V(2) receptor antagonist. *Cardiovasc. Drug Rev.* 19, 201-214.
- Shan,S.O., Walter,P. (2005). Co-translational protein targeting by the signal recognition particle. *FEBS Lett.* 579, 921-926.
- Shimozono,S., Tsutsui,H., Miyawaki,A. (2009). Diffusion of large molecules into assembling nuclei revealed using an optical highlighting technique. *Biophys. J.* 97, 1288-1294.
- Stark,D.A., Kulesa,P.M. (2007). An in vivo comparison of photoactivatable fluorescent proteins in an avian embryo model. *Dev. Dyn.* 236, 1583-1594.
- Tan,C.M., Nickols,H.H., Limbird,L.E. (2003). Appropriate polarization following pharmacological rescue of V2 vasopressin receptors encoded by X-linked nephrogenic diabetes insipidus alleles involves a conformation of the receptor that also attains mature glycosylation. *J. Biol. Chem.* 278, 35678-35686.
- Thielen,A., Oueslati,M., Hermosilla,R., Krause,G., Oksche,A., Rosenthal,W., Schülein,R. (2005). The hydrophobic amino acid residues in the membrane-proximal C tail of the G protein-coupled vasopressin V2 receptor are necessary for transport-competent receptor folding. *FEBS Lett.* 579, 5227-5235.
- Titus,S., Neumann,S., Zheng,W., Southall,N., Michael,S., Klumpp,C., Yasgar,A., Shinn,P., Thomas,C.J., Inglese,J., Gershengorn,M.C., Austin,C.P. (2008). Quantitative High Throughput Screening Using a Live Cell cAMP Assay Identifies Small Molecule Agonists of the TSH Receptor. *J. Biomol. Screen.* 13, 120–127.

- Trombetta, E.S., Helenius, A. (1998). Lectins as chaperones in glycoprotein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 587-592.
- Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 509-544.
- Tsutsui, H., Karasawa, S., Shimizu, H., Nukina, N., Miyawaki, A. (2005). Semi-rational engineering of a coral fluorescent protein into an efficient highlighter. *EMBO Rep.* 6, 233-238.
- Tsutsui, H., Shimizu, H., Mizuno, H., Nukina, N., Furuta, T., Miyawaki, A. (2009). The E1 mechanism in photo-induced beta-elimination reactions for green-to-red conversion of fluorescent proteins. *Chem. Biol.* 16, 1140-1147.
- von Heijne G. (1985). Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.* 184, 99-105.
- von Heijne G. (1990). Protein targeting signals. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2, 604-608.
- Wallin, E., von Heijne G. (1995). Properties of N-terminal tails in G-protein coupled receptors: a statistical study. *Protein Eng.* 8, 693-698.
- Walter, P., Johnson, A.E. (1994). Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10, 87-119.
- Westendorf, C., Schmidt, A., Coin, I., Furkert, J., Ridelis, I., Zampatis, D., Rutz, C., Wiesner, B., Rosenthal, W., Beyermann, M., Schüle, R. (2011). Inhibition of biosynthesis of human endothelin B receptor by the cyclodepsipeptide cotransin. *J. Biol. Chem.* 286, 35588-35600.
- Wüller, S., Wiesner, B., Löffler, A., Furkert, J., Krause, G., Hermosilla, R., Schaefer, M., Schüle, R., Rosenthal, W., Oksche, A. (2004). Pharmacochaperones post-translationally enhance cell surface expression by increasing conformational stability of wild-type and mutant vasopressin V2 receptors. *J. Biol. Chem.* 279, 47254-47263.
- Zhang, J., Campbell, R.E., Ting, A.Y., Tsien, R.Y. (2002). Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 906-918.
- Zhang, L., Gurskaya, N.G., Merzlyak, E.M., Staroverov, D.B., Mudrik, N.N., Samarkina, O.N., Vinokurov, L.M., Lukyanov, S., Lukyanov, K.A. (2007). Method for real-time monitoring of protein degradation at the single cell level. *BioTechniques.* 42, 446-450.

## Anteilserklärung

Frau Ingrid Ridelis hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

- 1 Ridelis I, Schmidt A, Teichmann A, Wiesner B, Furkert J, Schülein R.  
Use of Kikume Green-Red fusions to study the influence of pharmacological chaperones on protein folding and trafficking.  
FEBS Letters  
2012, [Epub ahead of print]  
Anteil: 70 Prozent

Die experimentellen Daten für die Abbildung 2A hat Frau Ridelis erhoben und an der Analyse der Daten und an der Erstellung der Abbildung mitgewirkt. Die experimentellen Arbeiten zum Trypsinsensitivitätsassay und zur Laser Scanning Mikroskopie (Abb. 3, 4 und 6) hat sie vollständig durchgeführt. Am Manuskript hat sie anteilig mitgewirkt.

- 2 Westendorf C, Schmidt A, Coin I, Furkert J, Ridelis I, Zampatis D, Rutz C, Wiesner B, Rosenthal W, Beyermann M, Schülein R.  
Inhibition of the biosynthesis of the human endothelin B receptor by the cyclodepsipeptide cotransin.  
Journal of Biological Chemistry  
2011, 286:35588-35600  
Anteil: 20 Prozent

Frau Ridelis hat die Abb. 3 erstellt und die experimentellen Arbeiten hierfür anteilig durchgeführt. Am Manuskript hat sie anteilig mitgewirkt

- 3 Schulz K, Rutz C, Westendorf C, Ridelis I, Vogelbein S, Furkert J, Schmidt A, Wiesner B, Schülein R.  
The pseudo signal peptide of the corticotropin-releasing factor receptor type 2a decreases receptor expression and prevents Gi-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity.  
Journal of Biological Chemistry  
2010, 22; 285(43):32878-32887  
Anteil: 25 Prozent

Frau Ridelis hat im Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie die automatische Mikroskopie etabliert, die für die Abbildungen 2A und 2B verwendet wurde. An den experimentellen Arbeiten für die Abbildungen 2A und 2B war sie anteilig beteiligt. Am Manuskript hat sie anteilig mitgewirkt.

Ingrid Ridelis

Walter Rosenthal

## Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

**Ridelis I**, Schmidt A, Teichmann A, Wiesner A, Furkert J, Schüle R. 2012. Use of Kikume Green-Red fusions to study the influence of pharmacological chaperones on protein folding and trafficking. FEBS Lett. Jan 28 [Epub ahead of print]

Impact Factor: 3,601

<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2012.01.043>

Westendorf C, Schmidt A, Coin I, Furkert J, **Ridelis I**, Zampatis D, Rutz C, Wiesner B, Rosenthal W, Beyermann M, Schulein R. 2011. Inhibition of the biosynthesis of the human endothelin B receptor by the cyclodepsipeptide cotransin. *J Biol Chem.* 286,35588-35600.

Impact Factor: 5,328

<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.239244>

Schulz K, Rutz C, Westendorf C, **Ridelis I**, Vogelbein S, Furkert J, Schmidt A, Wiesner B, Schülein R. 2010. The pseudo signal peptide of the corticotropin-releasing factor receptor type 2a decreases receptor expression and prevents Gi-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity. *J Biol Chem.* 285:32878-87.

Impact Factor: 5,328

<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.129627>

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

## Publikationsliste

- Ridelis I**, Vogelbein, S. Friedl, S. Westendorf, C. Rosenthal W, von Kries JP, Wiesner B, Schülein R. 2012. A high throughput screening assay to identify substances facilitating trafficking of transport-defective mutant membrane proteins. Submitted
- Ridelis I**, Schmidt A, Teichmann A, Wiesner A, Furkert J, Schülein R. 2012. Use of Kikume Green-Red fusions to study the influence of pharmacological chaperones on protein folding and trafficking. FEBS Lett. Jan 28 [Epub ahead of print]
- Westendorf C, Schmidt A, Coin I, Furkert J, **Ridelis I**, Zampatis D, Rutz C, Wiesner B, Rosenthal W, Beyermann M, Schulein R. 2011. Inhibition of the biosynthesis of the human endothelin B receptor by the cyclodepsipeptide cotransin. J Biol Chem. 286,35588-35600.
- Schulz K, Rutz C, Westendorf C, **Ridelis I**, Vogelbein S, Furkert J, Schmidt A, Wiesner B, Schülein R. 2010. The pseudo signal peptide of the corticotropin-releasing factor receptor type 2a decreases receptor expression and prevents Gi-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity. J Biol Chem. 285:32878-87.
- Nussio MR, Oncins G, **Ridelis I**, Szili E, Shapter JG, Sanz F, Voelcker NH. 2009. Nanomechanical characterization of phospholipid bilayer islands on flat and porous substrates: a force spectroscopy study. J Phys Chem B. 113:10339-47.
- Candelario-Jalil E, Slawik H, **Ridelis I**, Waschbisch A, Akundi RS, Hüll M, Fiebich BL. 2005. Regional distribution of the prostaglandin E2 receptor EP1 in the rat brain: accumulation in Purkinje cells of the cerebellum. J Mol Neurosci. 27:303-10.

## Posterpräsentationen

A High-Throughput Screening Assay to identify substances facilitating trafficking of transport-defective mutant membrane proteins. Molecular Pharmacology of G Protein-Coupled Receptors Meeting. 2.-4. Dezember 2010. Melbourne, Australia.

Use of KikGR Fusions to Study the Influence of Pharmacological Chaperones on Protein Folding and Trafficking. PhD Symposium Campus Buch. 26. Mai 2011. Berlin, Deutschland.

## **Selbständigkeitserklärung**

Ich, Ingrid Ridelis, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema "Analyse des intrazellulären Transports von fehlgefalteten Varianten des Vasopressin-V<sub>2</sub>-Rezeptors" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

---

Datum

Unterschrift

## Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Walter Rosenthal für die Überlassung des Themas bedanken. Besonders danke ich Herrn PD Dr. Ralf Schüle für die Bereitstellung des Themas dieser Doktorarbeit und die fortwährende Unterstützung und Betreuung in den letzten Jahren am FMP.

Ein besonderer Dank gilt auch Dr. Susanne Vogelbein für die Einarbeitung und die nette Atmosphäre, die zusammen mit Katharina Schulz im Labor geschaffen wurde. Dr. Antje Schmidt danke ich für die vielen guten Ratschläge, Diskussionen und Korrekturarbeiten. Außerdem danke ich Dr. Anita Kinne und Anke Teichmann, die ebenfalls beim Korrigieren dieser Arbeit geholfen haben.

Für die Unterstützung bei der experimentellen Durchführung bedanke ich mich herzlich bei Dr. Jens Furkert, Dr. Burkhard Wiesner, Jenny Eichhorst und Dr. Claudia Rutz. Bei Bettina Kahlich, Dr. Elvira Rohde und Dr. Gisela Papsdorf möchte ich mich für die Unterstützung und die Arbeit in der Zellkultur bedanken. Auch an Dr. Jens von Kries und die Mitarbeiter der Screening Unit geht ein herzliches Dankeschön. Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der AG Schüle, AG Klusmann und AG Krause und hier insbesondere bei Ann-Karin Haas und Inna Hoyer sowie Dr. Carolin Westendorf und Katharina Schulz für die Zusammenarbeit, die netten Gespräche und die schöne Zeit sowie für Hilfe und Anregungen bedanken.

Für die netten Mittagstischgespräche danke ich Anke Teichmann, Jessika Tröger, Dr. Kerstin Zühlke und unserem neuen Ankömmling Wolfgang Klein.

Ich danke von ganzem Herzen meinen Freunden, meiner alten und meiner neuen Familie und vor allem danke ich meinem Mann Eike Dümmer für die unendliche Unterstützung, eres la luz de mis ojos y lo mas grande que tengo en la vida.

Querida familia gracias por todo, sin ustedes no hubiera llegado a donde estoy ahora, miles de gracias.