

Zusammenfassung

Für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase ist das Gleichgewicht zwischen dem Abbau und der Neusynthese von Proteinen eine essentielle Voraussetzung. Die Anhäufung von fehlerhaften Proteinen kann dieses Gleichgewicht durch Auslösen eines protektiven Mechanismus, der „Unfolded protein response“ (UPR), empfindlich stören. Die UPR ist charakterisiert durch eine Hemmung der ribosomalen Proteinneusynthese und der Aktivierung unterschiedliche protektiver Wege, die korrekte Proteinfaltung fördern oder den Abbau der fehlerhaften Proteine bewirken.

Sekretorische Glycoproteine, zu denen viele Proteine mit spezialisierten Funktionen in der zellulären Signaltransduktion gehören, werden während der Translation in das Lumen oder in die Membran des Endoplasmatischen Reticulums (ER) synthetisiert. Das ER ist das erste Kompartiment des sekretorischen Transportwegs und erfüllt eine wichtige Funktion in der intrazellulären Qualitätskontrolle. Das ist ein Mechanismus, der die Zelle vor fehlerhaften Proteinen schützt und so zum Überleben beiträgt. Bei bestimmten Erbkrankheiten werden Proteine gebildet, die nicht den richtigen Faltungszustand aufweisen, um an ihren Bestimmungsort zu gelangen oder ihre korrekte Funktion auszuüben. Sie werden von der Qualitätskontrolle erkannt, retiniert und dem Proteinabbau zugeführt. Das ER weist hierfür einen speziellen Mechanismus auf, die ER-assoziierte Degradation (ERAD). Dabei werden fehlgefaltete Proteine von Komponenten des Qualitätskontrollsystems erkannt, über die ER-Membran ins Cytosol freigesetzt und durch das Markermolekül Ubiquitin für den Abbau gekennzeichnet. Dort baut ein proteolytischer Komplex, das Proteasom, die polyubiquitinierten Proteine ab. Das Proteasom stellt ein neues Ziel für die Therapie bestimmter Krankheiten dar. Ein erster Arzneistoff, Bortezomib, kann die proteinabbauenden Aktivitäten des Proteasoms inhibieren und verbessert dabei die Überlebenszeit von Patienten, die am Multiplen Myelom leiden, einer Knochenkrebserkrankung. Der genaue Wirkmechanismus von Bortezomib ist unbekannt und die Therapie ist bisher mit schweren Nebenwirkungen verbunden. Somit stellt die Erforschung der komplexen molekularen Grundlagen des proteasomalen Abbaus eine große Herausforderung dar.

Das Modellprotein dieser Studie, der Vasopressin V2 Rezeptor (V2R), ist ein Protein welches über den sekretorischen Transportweg zur Plasmamembran transportiert wird. Dort vermittelt der Rezeptor die anti-diuretische Wirkung des Hormons Vasopressin. Durch Mutationen im *AVPR*-Gen, welches für den Vasopressin V2 Rezeptor kodiert, kommt es zu V2R Mutanten, die durch die veränderte Proteinfaltung einen Transportdefekt aufweisen können. Sie werden von der Qualitätskontrolle der Zelle erkannt und in

allen Kompartimenten des sekretorischen Transportwegs retiniert: im ER (L62P), im ER-Golgi Intermediär Kompartiment (ERGIC) (V226E) oder Golgi-Apparat (G201D). Durch die Retention ist die Lokalisation der Rezeptoren an der Plasmamembran reduziert oder nicht mehr vorhanden und verursacht das Krankheitsbild des Nephrogenen Diabetes Insipidus (NDI). Patienten sind nicht mehr in der Lage, ihren Urin aufzukonzentrieren und leiden deswegen an Polyurie und Polydipsie. Es sind bereits mehr als 170 krankheitsauslösende Mutationen des V2R beschrieben worden. Durch diese Vielzahl an Mutationen kommen diese in allen Domänen des Rezeptors vor. Diese strukturelle Besonderheit des V2R bietet ein interessantes Modell für die Analyse des Zusammenhangs zwischen Qualitätskontrolle und intrazellulärer Proteindegradation, besonders in Bezug auf Rezeptoren, die in post-ER Kompartimenten zurückgehalten werden. Das Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der Degradationswege unterschiedlicher V2R Mutanten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das Qualitätskontrollsystem bestimmt, welcher Degradationsweg eingeschlagen wird. Komplex-glykosylierte wildtypische V2Rs und im Golgi-Apparat retinierte G201D Mutanten können die Qualitätskontrolle von ER und ERGIC überwinden und zeigen Kollokalisierung mit Lysosomen. Kernglykosylierte, unreife Formen aller untersuchten Mutanten und des wildtypischen Rezeptors, auch die im ERGIC-lokalisierte Mutante V226E, wurden vom lysosomalen Abbausystem ausgeschlossen. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die unreifen Formen aller untersuchten Rezeptoren mit ERAD Komponenten interagieren und proteasomal degradiert werden. Das humane ERAD ist bisher nur unzureichend charakterisiert. Es gibt viele offene Frage bezüglich des Zusammenspiels der einzelnen Komponenten.

Die untersuchten unreifen Rezeptorformen konnten ein zentrales ERAD Protein, die AAA ATPase p97/Valosin-containing protein (p97/VCP) kopräzipitieren. p97/VCP ist an allen bekannten ERAD Wegen beteiligt. Vermutlich spielt die ATPase eine Rolle bei der Extraktion von membranständigen Proteinen. Ein weiteres bekanntes Protein, Derlin-1, wurde ebenfalls mit allen Rezeptoren kopräzipitiert. Die genaue Funktion von Derlin-1 ist nicht bekannt, aber es ist nicht in allen bekannten ERAD Wegen von Bedeutung. Deswegen werden die Wege nach der Derlin-1 und E3 Ligasen Beteiligung unterschieden. Carvalho et al. konnten zeigen, dass es in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* drei unterschiedliche ERAD Wege gibt. Über den ERAD-C Weg werden Substrate abgebaut, die Mutationen in der cytoplasmatischen Proteindomäne haben. ERAD-M degradiert Proteine mit Fehlfaltungen im Transmembranbereich, während ERAD-L Proteine mit luminal lokalisierten Mutationen abbaut. Dazu stehen die hier erhaltenen Ergebnisse in starkem Kontrast: nur ein Derlin-1 / p97/VCP abhängiger ERAD Weg baut die V2Rs mit Mutationen in unterschiedlichen Rezeptordomänen in humanen Zellen ab. Bei diesem Abbauweg werden die Rezeptoren von einer noch unbekanntem Ubi-

quitin-Ligase für den Abbau markiert. Nach anschließender Retranslokation ins Cytosol mit Hilfe von p97/VCP werden sie deubiquitiniert und deglycosyliert.

In einer massenspektrometrischen Untersuchung wurden verschiedene Proteine in den V2R Proben identifiziert, die eine Rolle bei der Qualitätskontrolle und der Degradation spielen. Dabei wurde eine ATPase Untereinheit des regulatorischen 19S Unterkomplexes des Proteasoms gefunden. Die Interaktion mit Rpt1 konnte in Kopräzipitationsexperimenten bestätigt werden. Die proteasomale Untereinheit bietet die Möglichkeit, eine Hypothese für den bisher unbekannt Mechanismus zur Substraterkennung durch das Proteasom aufzustellen. Die Daten dieser Arbeit lassen vermuten, dass die von Derlin-1 und p97/VCP präsentierten V2Rs freie Rpt1 Untereinheiten binden und so die Proteasomrekrutierung oder Assemblierung ermöglichen.

In dieser Arbeit wurde ein neues Modellsystem zur Untersuchung von humanem ERAD etabliert. Durch die Vielzahl der krankheitsauslösenden Mutationen in allen Rezeptordomänen können Qualitätskontrollkomponenten und Degradationswege genau charakterisiert werden.