

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

DISSERTATION

Intrazelluläre Qualitätskontrolle des Vasopressin-V2-Rezeptors

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Eva Schönenberger

aus Dresden

Gutachter/in:

1. Priv. Doz. Dr. R. Schülein
2. Priv. Doz. Dr. rer. nat. H. Biebermann
3. Priv. Doz. Dr. S. Krautzig

Datum der Promotion: 30.11.2012

Inhaltsverzeichnis

1 ZUSAMMENFASSUNG	2
2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	3
2.1 Abkürzungen	3
2.2 Bezeichnung der Aminosäuren	4
3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	5
4 EINLEITUNG	6
5 MATERIAL UND METHODEN	12
5.1 V ₂ R-Konstrukte und DNA-Manipulationen.....	12
5.2 Zellkultur.....	13
5.3 Immunpräzipitation und Glykosylierungsanalyse.....	13
5.4 Biotinylierung von Oberflächenproteinen.....	14
5.5 Limitierte Proteolyse von Gesamtmembran-Präparationen	15
5.6 [³ H]AVP Bindungsstudien	16
5.7 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie und Immunfluoreszenz.....	16
5.8 Immunogold-Elektronenmikroskopie	18
5.9 Statistik.....	19
6 ERGEBNISSE	20
6.1 Intrazelluläre Retention der V2R Mutanten L62P, G201D und Y205C	20
6.2 Detektion der Mutante Y205C im ERGIC	25
6.3 Unterschiede in den Faltungszuständen der Mutanten L62P und Y205C	28
6.4 Die Mutante G201D akkumuliert im Golgi-Apparat	29
7 DISKUSSION	34
8 LITERATUR.....	39
9 PUBLIKATIONEN DER DISSERTATION	48
10 WEITERE PUBLIKATIONEN.....	49
11 LEBENS LAUF	51
12 ERKLÄRUNG.....	52
13 DANKSAGUNG.....	53

1 Zusammenfassung

Der nephrogene Diabetes insipidus (NDI) ist eine genetisch bedingte Erkrankung, die insbesondere durch Mutationen im Vasopressin-V2-Rezeptor (V2R) hervorgerufen wird. Mittlerweile sind mehr als 180 krankheitsauslösende Mutationen des V2R bekannt. In ca. zwei Dritteln der Fälle bleibt der mutierte Rezeptor intrazellulär retiniert und gelangt nicht an die Plasmamembran. Ursächlich hierfür ist die Qualitätskontrolle von Proteinen im Verlauf des intrazellulären Transportwegs. Bisher wurde angenommen, dass diese Qualitätskontrolle hauptsächlich im endoplasmatischen Reticulum (ER) stattfindet.

In dieser Arbeit wurde anhand verschiedener Mutanten des Vasopressin-V2-Rezeptors gezeigt, dass auch das ERGIC (ER-Golgi-intermediate compartment) und der Golgi-Apparat eine entscheidende Rolle bei der Qualitätskontrolle spielen. In einem Zellkulturmodell mit transfizierten HEK 293 Zellen konnten V2R-Mutanten charakterisiert werden, die in unterschiedlichen intrazellulären Kompartimenten retiniert werden (im ER z.B. L62P, im ERGIC z.B. Y205C und im Golgi-Apparat z.B. G201D). Dafür wurden Glykosylierungs- und Oberflächenbiotinylierungsanalysen sowie Lokalisationsstudien mit Hilfe der Laser Scanning Mikroskopie durchgeführt. Die verschiedenen intrazellulären Lokalisationen der Rezeptormutanten konnten anschließend durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt werden. Eine mögliche Ursache für diese Differenzierung im Qualitätskontrollsystem könnten Strukturunterschiede der mutierten Rezeptoren sein. So zeigten ER-Mutanten im Vergleich zu ERGIC-Mutanten ein differentes Abbaumuster nach Trypsin-Proteolyse.

Zusammenfassend konnte am Beispiel des V2R gezeigt werden, dass die Qualitätskontrolle von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in Säugerzellen nicht nur im ER sondern auch im ERGIC und im Golgi-Apparat stattfindet. Eine mögliche mechanistische Erklärung könnte in der unterschiedlichen Tertiärstruktur der mutierten Rezeptoren liegen.

2 Abkürzungsverzeichnis

2.1 Abkürzungen

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon,
AQP2	Aquaporin 2
AVP	Arginin-Vasopressin
AVPR2 Gen	Arginin-Vasopressin Rezeptor 2 Gen
Baf A1	Bafilomycin A1
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BFA	Brefeldin A
BiP	<i>Binding immunoglobulin protein</i>
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
COP	<i>Coatmer complex</i>
CPP	<i>Cell-penetrating peptide</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>Enhanced GFP</i>
EndoH	Endoglykosidase H
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERAD	<i>ER-reticulum-associated protein degradation</i>
ERGIC	<i>ER-Golgi-intermediate compartment</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor .
GRP78	78 kDa <i>Glucose Regulated Protein</i>
GRP94	94 kDa <i>Glucose Regulated Protein</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HERG	<i>human ether-a-go-go-related gene</i>
HSP70	70 kDa <i>heat shock protein</i>
HSP90	90 kDa <i>heat shock protein</i>
ICL1	erste intrazelluläre Schleife
IgG	Immunglobulin G
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LSM	Laser Scanning Mikroskop
MDCK	<i>Madin Darby Canine Kidney</i>
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NDI	nephrogener Diabetes insipidus

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNGaseF	Peptide:N-Glycosidase F
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinyliden-Fluorid
QCS	<i>quality control system</i>
ROI	<i>region of interest</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TMD	Transmembrandomäne
V1aR	Vasopressin-V1a-Rezeptor
V1bR	Vasopressin-V1b-Rezeptor
V2R	Vasopressin-V2-Rezeptor
V-ATPase	<i>V-Type Adenosintriphosphatase</i>
vWF	von Willebrand Faktor

2.2 Bezeichnung der Aminosäuren

Ein-Buchstaben-Code	Drei-Buchstaben-Code	Name
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

3 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Wirkung von Vasopressin in Abhängigkeit von den Vasopressin-Rezeptor-Subtypen. **Seite 7**
- Abbildung 2:** Zweidimensionales Topologiemodell des Vasopressin-V2-Rezeptors (V2R) und Lage der krankheitsverursachenden Mutationen. **Seite 8**
- Abbildung 3:** Zusammenfassung verschiedener Szenarien der Qualitätskontrolle entlang des intrazellulären Transportwegs. **Seite 10**
- Abbildung 4:** (A) Glykosylierungsanalyse des wildtypischen V2R, der in transient transfizierten HEK 293 Zellen exprimiert wurde. (B) Glykosylierungsanalyse der V2R Mutanten L62P, Y205C und G201D in transient transfizierten HEK 293 Zellen. (C) Biotinylierung von Zellmembranproteinen mit anschließender Immunpräzipitation mit einem anti-GFP Serum. **Seite 21**
- Abbildung 5:** Spezifische [³H]AVP Bindung an intakten HEK 293 Zellen, die den wildtypischen V2R oder die jeweiligen Mutanten transient exprimierten. **Seite 22**
- Abbildung 6:** Laser Scanning Mikroskopie von intakten HEK 293 Zellen, die den wildtypischen V2R oder die Mutanten L62P, Y205C, G201D (grüner Kanal) transient exprimierten. **Seite 24**
- Abbildung 7:** Quantitative Analyse der Kolo-kalisation der GFP-Fluoreszenzsignale mit der Plasmamembran nach Laser Scanning Mikroskopie von intakten HEK 293 Zellen, die den wildtypischen V2R oder die Mutanten L62P, Y205C oder G201D transient exprimierten. **Seite 25**
- Abbildung 8:** Laser Scanning Mikroskopie von fixierten HEK 293 Zellen, die den wildtypischen V2R oder die Mutanten L62P, Y205C, G201D (grüner Kanal) transient exprimierten. **Seite 27**
- Abbildung 9:** Limitierte Proteolyse von V2R-Mutanten. **Seite 29**
- Abbildung 10:** Laser Scanning Mikroskopie von fixierten HEK 293 Zellen, die den wildtypischen V2R oder die Mutanten L62P, Y205C, G201D (grüner Kanal) transient exprimieren. **Seite 30**
- Abbildung 11:** Quantitative Analyse der Kolo-kalisation der Rezeptoren mit dem 58K Golgi-Markerprotein basierend auf den LSM-Daten nach Immunfluoreszenz. **Seite 31**
- Abbildung 12:** Immunogold-Elektronenmikroskopie von stabil transfizierten HEK 293 Zellen, die die V2R-Mutante G201D exprimieren. **Seite 33**

4 Einleitung

Die Wasserhomöostase des Körpers wird zum großen Teil durch das Hormon Vasopressin (Synonyme: Antidiuretisches Hormon, ADH, oder Arginin-Vasopressin, AVP) reguliert. Bei einigen Krankheitsbildern wie der Herzinsuffizienz oder dem Diabetes insipidus ist die Wasserhomöostase durch eine pathologisch erhöhte Vasopressin-Sekretion oder fehlende Vermittlung der Vasopressin-Wirkung gestört [1-2].

Vasopressin wird im Hypothalamus produziert und anschließend im Hypophysenhinterlappen gespeichert. Die Sekretion in die Blutbahn erfolgt auf unterschiedliche Stimuli, wie z.B. eine ansteigende Plasmaosmolarität, Abfall des Plasmavolumens oder des systolischen Blutdrucks [1-2]. Die Wirkung von Vasopressin wird durch drei Rezeptoren vermittelt [Abb. 1].

Der Vasopressin-V1a-Rezeptor (V1aR), der vor allem in glatten Gefäßmuskelzellen und Herzmuskelzellen exprimiert wird, beeinflusst die Vasokonstriktion sowie Herzfunktion und ist für die Entstehung einer kardialen Hypertrophie mitverantwortlich. Zusammen mit dem Oxytocin-Rezeptor beeinflusst der V1aR die uterine Kontraktilität und Durchblutung. Der Vasopressin-V1b-Rezeptor (V1bR) ist im Hypophysenvorderlappen an der Sekretionssteuerung des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) beteiligt [3]. Außerdem spielen der V1aR und der V1bR im Hypothalamus und limbischen System eine wichtige Rolle für die Steuerung von Aggressivität und Stressbewältigung [4-6]. Der Vasopressin-V2-Rezeptor (V2R) vermittelt die von Willebrand-Faktor-Sekretion der Endothelzellen [7], wird jedoch vor allem in den Sammelrohrzellen der Niere exprimiert und steuert hier die antidiuretische Wirkung von Vasopressin. Die Vasopressin-Rezeptoren gehören zur großen Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Diese verfügen über 7 Transmembrandomänen (TMD), 3 intra- und 3 extrazelluläre Schleifen sowie je einen extrazellulären N-Terminus und intrazellulären C-Terminus [Abb. 2]. GPCRs stellen etwa 80% aller Rezeptoren der Säugetiere, und sind für zahlreiche lebenswichtige biologische Funktionen notwendig [8].

Nach Stimulation durch Vasopressin aktiviert der V2R das G_s /Adenylylcyclase-System und der nachfolgende Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration führt über die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) zur Fusion von Aquaporin 2 (AQP2)-haltigen Vesikeln mit der apikalen Plasmamembran der Epithelzellen in den Sammelrohren der Niere [9]. Die Umverteilung von AQP2 an die Plasmamembran erhöht die Wasserdurchlässigkeit des Sammelrohrepithels und ist

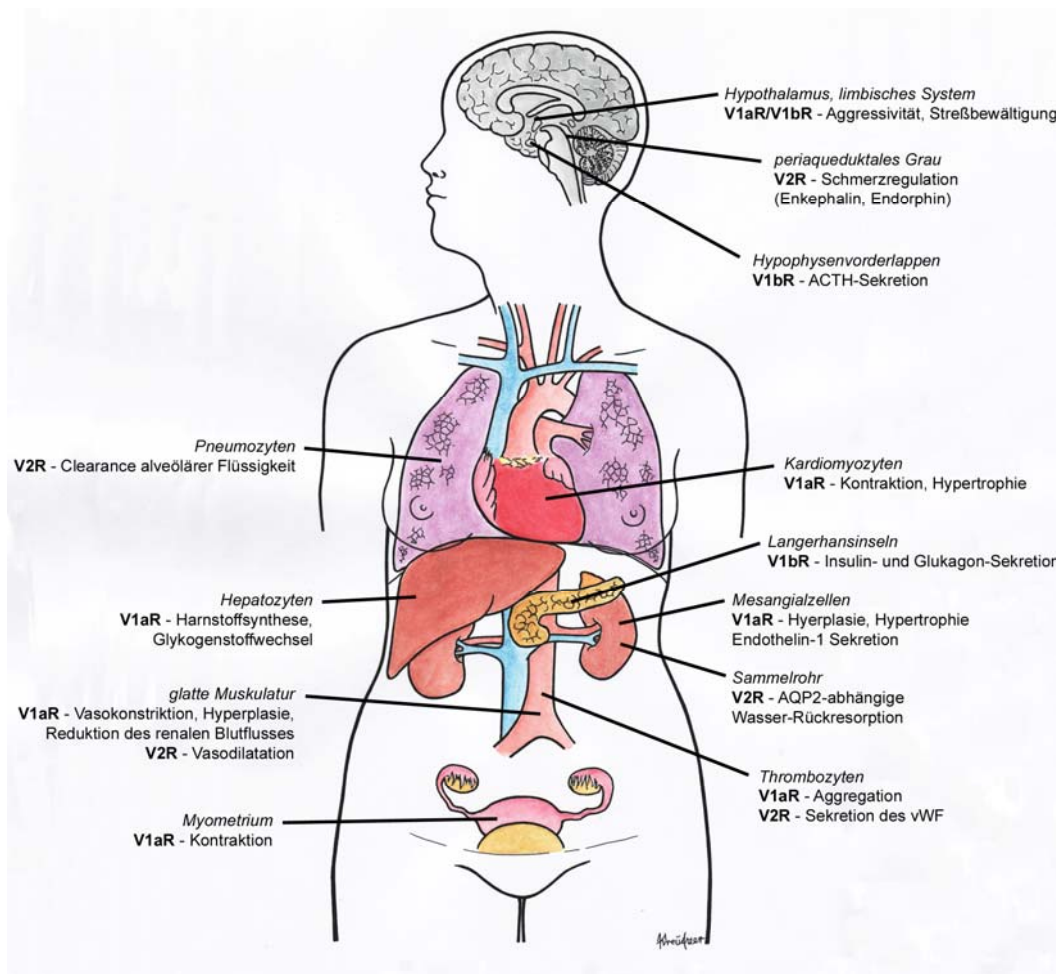


Abbildung 1: Wirkung von Vasopressin in Abhängigkeit von den Vasopressin-Rezeptor-Subtypen. ACTH – Adrenocorticotropes Hormon, AQP2 – Aquaporin 2, V1aR – Vasopressin-V1a-Rezeptor, V1bR – Vasopressin-V1b-Rezeptor, V2R – Vasopressin-V2-Rezeptor, vWF – von Willebrand Faktor

auf diesem Weg mitverantwortlich für die Freiwasser-Clearance und damit Rückresorption von Wasser aus dem Primärharn in der Niere (Antidiurese).

Mutationen im AVPR2 Gen (*arginine vasopressin receptor 2 gene*) verursachen den X-chromosomal vererbten nephrogenen Diabetes insipidus (NDI) [Abb. 2] [10]. Der NDI führt bereits im Säuglingsalter zu Polyurie, Isostenurie und Polydipsie unterschiedlicher Ausprägung, wobei die erkrankten Säuglinge vor allem mit Erbrechen, Trinkschwäche, Fieber und rezidivierenden Dehydrierungen auffallen. Bleibt die Erkrankung unbehandelt, kann dies zu physischer und mentaler Retardierung führen. Die bisherige Therapie zielt darauf ab, eine Verringerung der Flüssigkeitsmenge im distalen Nierentubulus durch Reduktion der glomerulären Filtrationsrate sowie Erhöhung der Natriumreabsorption mittels Thiaziddiuretika und Indomethazin zu erreichen [11-12]. Die bei NDI trotz Therapie großen Urinvolumina von bis zu 20 Litern pro Tag führen langfristig zu sackartigen Aufweitungen der ableitenden Harnwege.

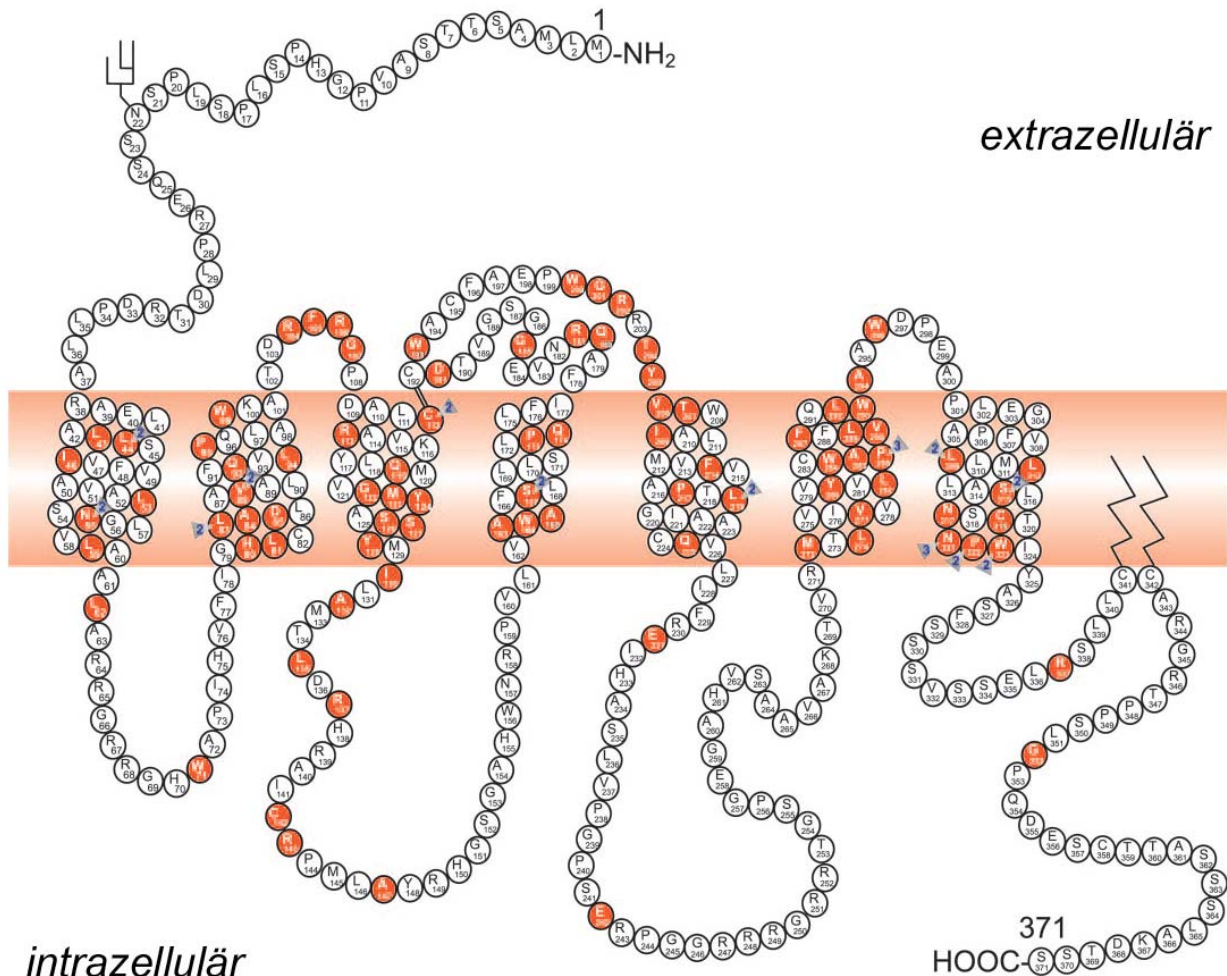


Abbildung 2: Zweidimensionales Topologiemodell des Vasopressin-V2-Rezeptors (V2R) und Lage der krankheitsverursachenden Mutationen. Der V2R ist ein 41 kDa großer G-Protein-gekoppelter Rezeptor und besteht aus 371 Aminosäuren (im Ein-Buchstaben-Code dargestellt). Die Rot markierten Aminosäuren charakterisieren Positionen von *Missense* oder *Nonsense* Mutationen. Zahlen stehen dabei für mehr als eine Mutation im selben Codon. Andere Mutationsarten sind in dieser Abbildung nicht dargestellt. Die extrazellulären, transmembranären und zytoplasmatischen Domänen sind in Übereinstimmung mit Mouillac et al [13] dargestellt. An Position N22 weist der V2R eine N-Glykosylierung und an Positionen C341 und C342 je eine Palmitoylierung auf. Des weiteren besteht eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen an den Positionen 112 und 192. (aus Fujiwara et al. [14]).

Aktuell sind mehr als 180 krankheitsauslösende Mutationen im AVPR2 Gen beschrieben, davon 48% Missense Mutationen, 9% Nonsense Mutationen, 23% Frameshift Deletionen oder Insertionen, 4,4% In-frame Deletionen oder Insertionen, 1,42% Splice-Site Mutationen und 16,6% größere Deletionen (<http://www.medicine.mcgill.ca/nephros>) [15-16]. Ungefähr zwei Drittel der Mutationen führen zu fehlgefalteten Rezeptoren, die vom Qualitätskontrollsystem (*quality control system*, QCS) der Zelle erkannt und intrazellulär retiniert werden und damit nicht die Plasmamembran als Zielkompartiment erreichen.

Neben dem X-chromosomal vererbaren nephrogenen Diabetes insipidus werden auch viele andere Erkrankungen durch fehlgefaltete und damit transportdefekte Membranproteine hervorgerufen. Zu diesen gehören z.B. zystische Fibrose (Mutationen im Gen für den *cystic fibrosis transmembrane regulator*), hereditäre Retinitis pigmentosa (Mutationen im Rhodopsin Gen), familiäre Hypercholesterinämie (Mutationen im Gen für den *low density lipoprotein* (LDL)-Rezeptor), hereditäres Long QT-Syndrom (Mutationen im humanen *ether-a-go-go-related* Gen (HERG)) und das Laron-Syndrom (Mutationen im Gen für den Somatotropin-Rezeptor) [17-24]. Für eine mögliche kausale Therapie werden 2 Strategien verfolgt. Mit Hilfe so genannter pharmakologischer Chaperone kann über eine Stabilisierung von korrekten und damit transportkompetenten Faltungszuständen der jeweiligen Membranproteine eine Reduktion der Interaktion mit Komponenten des QCS erreicht und so der intrazelluläre Transport unterstützt werden. Als pharmakologische Chaperone werden membranpermeable Rezeptor-Liganden eingesetzt. Diese sind spezifisch und in geringen Konzentrationen wirksam [26-29]. Der bisher erste klinisch erprobte Ansatz einer kausalen Therapie des NDI beruht auf der Verwendung von Vasopressin-Rezeptor-Antagonisten im Sinne pharmakologischer Chaperone, wobei nicht für alle untersuchten Mutanten ein Effekt beobachtet wurde [17, 26-27]. Die Einnahme von Relcovaptan (V1aR-Antagonist) führte in einer Pilotstudie mit 5 NDI Patienten und insgesamt 3 verschiedenen AVPR2-Mutationen zu verringerten 24h-Urinvolumina und einer verringerten Trinkmenge bei gleichzeitig erhöhter Urinosmolarität [30]. Die zweite Strategie besteht in der Entwicklung von Inhibitoren des QCS. Diese Strategie ist insbesondere dann Erfolg versprechend, wenn die mutierten Proteine noch eine Restfunktion aufweisen, jedoch aufgrund der intrazellulären Retention nicht in ausreichendem Maße an den Zielwirkort (z.B. die Plasmamembran) gelangen, wie bei der Mutante $\Delta F508$ der zystischen Fibrose [24]. Hier sind z.B. so genannte zellpenetrierende Peptide (*cell-penetrating peptides*, CPPs) in der Diskussion [31], die aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen und über eine Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration wahrscheinlich Komponenten des QCS im ERGIC hemmen können [32-35].

Der intrazelluläre Transportweg (*secretory pathway*) umfasst mehrere Stationen der Qualitätskontrolle, die sicherstellen, dass nur Proteine in der korrekten Tertiär- und/oder Quartärstruktur ihren jeweiligen Zielort erreichen [Abb. 3] [36]. Der bisher am besten untersuchte Abschnitt der Qualitätskontrolle ist das ER-ständige QCS. Die einzelnen Komponenten des ER-ständigen QCS sind Proteine, die als molekulare Chaperone bezeichnet werden. Dazu gehören z.B. klassische Chaperone wie BiP (GRP78) aus der Familie der HSP70-Proteine (70 kDa *heat shock protein*) und Endoplasmin (GRP94) aus der Familie der HSP90-

Proteine, Lektin-Chaperone wie Calnexin/Calreticulin und verschiedene andere Enzyme wie die Protein-Disulfid-Isomerasen oder Cyclophiline und FK-Bindungsproteine [37].

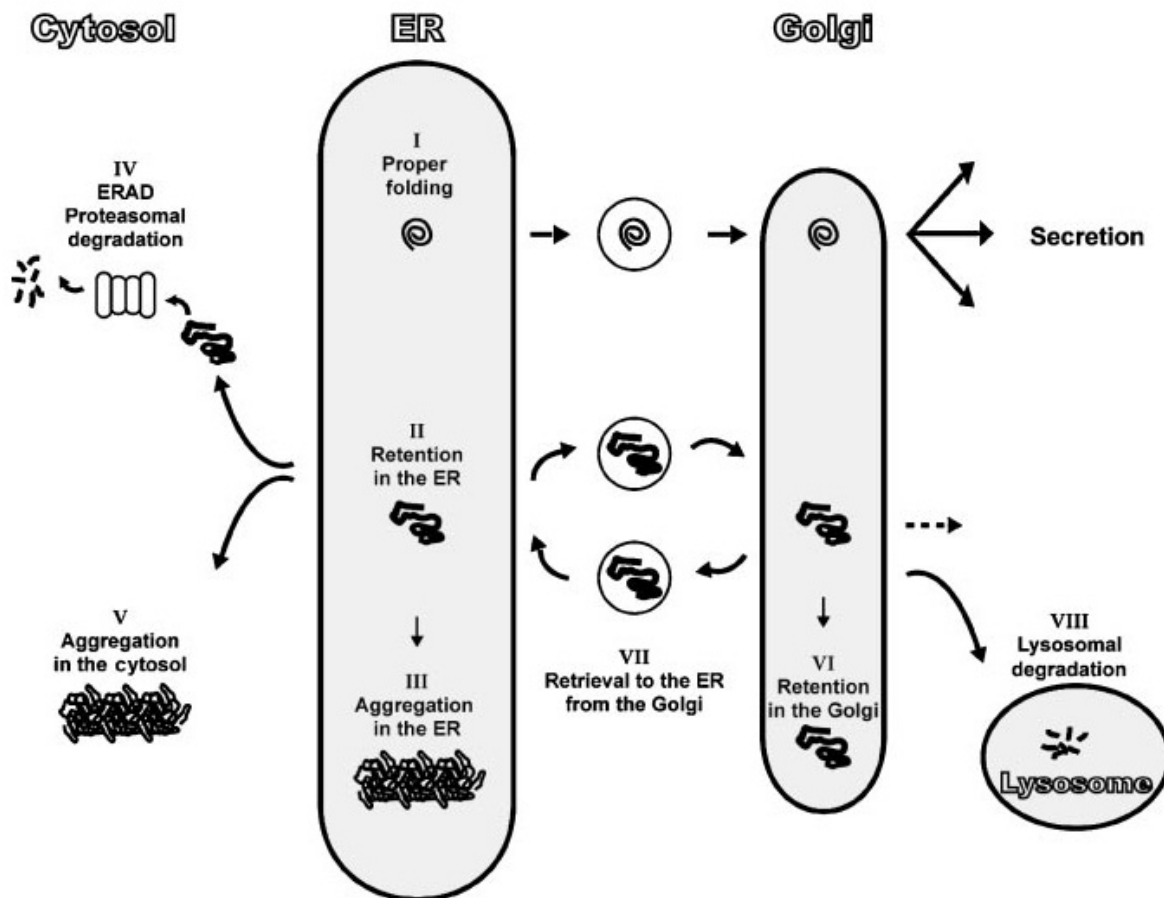


Abbildung 3: Zusammenfassung verschiedener Szenarien der Qualitätskontrolle entlang des intrazellulären Transportwegs. Korrekt gefaltete Proteine werden aus dem ER hinaus transportiert (I). Fehlgefaltete Proteine werden normalerweise zunächst im ER retiniert und erfahren durch ER-ständige Chaperone eine Unterstützung der Faltung (II). Fehlgefaltete Proteine können aber auch im ER aggregieren (transient oder permanent) (III) oder in das Zytosol transportiert werden, wo sie der proteasomalen Degradation (ERAD) (IV) zugeführt werden oder aggregieren (V). Einige fehlgefaltete Proteine können bis in den Golgi-Apparat gelangen, wo sie dann retiniert (VI), zum ER zurück (VII) oder zu Lysosomen für die weitere Degradation (VIII) transportiert werden. (aus Trombetta et al. [38]).

Fehlgefaltete und/oder fehlassemblierte Membranproteine zeigen eine prolongierte Interaktion mit den einzelnen Komponenten des QCS im ER. Dies kann zu einer Akkumulation im ER führen und schließlich zum ER-assoziierten Abbau über das Proteasom [39-41]. Auch eine Akkumulation im Zytoplasma als Aggresom ist möglich [42].

Mittlerweile gibt es mehrere Hinweise dafür, dass die Qualitätskontrolle von intrazellulären Proteinen nicht alleine im ER stattfindet. Obwohl in der Abb. 3 von Trombetta et al. noch nicht

berücksichtigt, spielt neben dem ER auch das ERGIC (*ER-Golgi-intermediate compartment*) für die Qualitätskontrolle von Proteinen eine Rolle [43-46]. So konnten Mutanten des *vesicular stomatitis virus G protein* [47] und der Sucrose-Isomaltase [43] auch das ERGIC und den cis-Golgi-Apparat erreichen. Für die alpha-Kette des nichtassemblierten T-Zell Rezeptors konnte eine Rezirkulation zwischen dem ERGIC und dem ER nachgewiesen werden [48], wobei der retrograde Transport vom ERGIC zum ER durch das *coatamer complex I* (COPI)-haltige Vesikelsystem vermittelt wurde [49-50]. Der Mechanismus, durch den das ER-ständige QCS einige Mutanten passieren lässt, ist nur in Ansätzen geklärt. Als ursächlich werden bestimmte Aminosäuresequenzen (Transport- und Retentionssignale) und Faltungszustände der Membranproteine bzw. der jeweiligen Mutanten angesehen [51]. Über die Beteiligung des Golgi-Apparats am QCS ist bisher wenig bekannt [52]. In Hefen konnte erstmals gezeigt werden, dass der Golgi-Apparat für die Qualitätskontrolle einiger Proteine wie den Eisen-Transport-Komplex, die Proteinase A und das Wscp1-Protein eine Rolle spielt [44, 53-54]. In diesem Fall wird über den Golgi-Apparat ein Rücktransport zum ER initiiert, um dann in einem weiteren Schritt die Membranproteine der Degradation zuzuführen [54-55]. Alternativ dazu scheint in Hefen aber auch über den Golgi-Apparat ein Weitertransport mit nachfolgender Degradation in endosomal/ lysosomalen Kompartimenten möglich zu sein [56]. In Säugerzellen konnte für eine Mutante des *gap junction*-Proteins Connexin 46 eine Akkumulation im ERGIC und Golgi-Apparat gezeigt werden. Über die Bildung eines Retentionsmotivs kam es hier zu einer transportdefekten Connexinvariante [46]. Für GPCR ist über eine Qualitätskontrolle im Golgi-Apparat bisher nichts bekannt [52, 55].

Mit der hier vorliegenden Arbeit und den bereits publizierten Daten [32, 57] konnte gezeigt werden, dass das ERGIC eine wichtige Rolle in der Qualitätskontrolle des V2R spielt. Die Möglichkeit von V2R-Mutanten das ERGIC zu erreichen, scheint von den verschiedenen Faltungszuständen der jeweiligen V2R-Mutante abhängig zu sein. Außerdem konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine V2R-Mutante im Golgi-Apparat akkumuliert, und somit auch der Golgi-Apparat eine Funktion im Rahmen der Qualitätskontrolle hat.

5 Material und Methoden

Alle Experimente wurden im Labor von Priv. Doz. R. Schüle in am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie in Berlin-Buch durchgeführt. Falls nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien und Reagenzien von Sigma Aldrich (München, Deutschland), MERCK (Darmstadt, Deutschland) oder Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

5.1 V₂R-Konstrukte und DNA-Manipulationen

Material	Hersteller
Plasmid pEGFP.N1	Clontech Laboratories, Heidelberg, Deutschland
FS Dye Terminator Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland
Qiagen Plasmid Mini Kit®	Qiagen, Deutschland
Qiagen Plasmid Midi Kit®	Qiagen, Deutschland
QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Amsterdam, Niederlande

Als Vorlage für die Generierung der einzelnen Mutationen des V₂R wurde ein Plasmid genutzt, das den C-terminal GFP-fusionierten humanen V₂R codiert [58]. Grundlage hierfür war das Plasmid pEGFP.N1. An die Aminosäure K367 des wildtypischen V₂R wurde die in ihrer Fluoreszenz nach Rot verschobene GFP-Variante (EGFP, [59]) fusioniert. Dem resultierenden Konstrukt V₂R.GFP fehlen die 4 C-terminalen Aminosäurereste. Für V₂R.GFP wurden im Vergleich zum wildtypischen Rezeptor ähnliche pharmakologische Eigenschaften sowie die gleiche polarisierte intrazelluläre Verteilung nachgewiesen [60]. Mit Hilfe des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit wurden die Mutationen L62P, Y205C, G201D eingefügt. Die resultierenden Rezeptoren sind damit ebenfalls GFP-Fusionsproteine. Die dafür notwendigen Oligonucleotid-Primer wurden anhand der Nukleotidsequenzen der Patientenmutationen generiert [61-64]. Die DNA-Sequenzen wurden durch Sequenzierung mit Hilfe des FS Dye Terminator Kit kontrolliert.

Zur Vermehrung der entsprechenden Plasmide wurde der E. coli Stamm DH5α verwendet. Die Plasmidaufreinigung im kleinen bzw. großen Maßstab erfolgte nach den Empfehlungen des Herstellers mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit® bzw. dem Qiagen Plasmid Midi Kit®. DNA-Manipulationen wurden nach den Handbüchern von Sambrook und Russel durchgeführt [65].

5.2 Zellkultur

Material	Hersteller
FuGENE 6	Roche, Mannheim, Deutschland
G418	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden, Deutschland
Lipofectamine 200	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Jasco FP-6500 Fluoreszenzspektrometer	Jasco, Great Dunmow, UK
Zellzähler Casi®1	Casy, Schäfe System, Deutschland

Human Embryonic Kidney (HEK) 293 Zellen wurden mit 5% CO₂ in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) kultiviert. Das Medium enthielt zusätzlich 10% (v/v) fetales Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Die Selektionierung von stabil transfizierten HEK 293 Zellklonen erfolgte durch Zugabe von 400 µg/ml G418 zum Medium.

Die Transfektionen von HEK 293 Zellen mit den oben beschriebenen Plasmiden erfolgte mittels FuGENE 6 oder Lipofectamine 2000 entsprechend der Anleitung des Herstellers. Falls notwendig, erfolgte eine Expressionskontrolle der V2R-Mutanten über eine fluorimetrische Quantifizierung der GFP-Fluoreszenz-Signale. Dafür wurden stabil transfizierte HEK 293 Zellklone auf einer 100 mm-Schale kultiviert. Nach 48 h Wachstum wurden die Zellen nach Trypsin-vermitteltem Ablösen von der Kulturschale und Vereinzeln der Zellen zweimal mit eiskaltem PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM KH₂PO₄; pH 7,4) gewaschen.

Anschließend wurde eine Probe zur Zellzählung entnommen. Der Rest der Suspension wurde in eiskaltem Lysepuffer (1% Triton X-100, 0,1% SDS, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 40 mM PMSF, 1 µg/ml Trasylol, 100 mM Benzamidin, pH 8,0) aufgenommen und für 1 h inkubiert. Unlösliche Anteile wurden abzentrifugiert (20 min, 28 000 × g, 4 °C) und eine durch die Zellzählung definierte Menge des Überstandes für die Messung der GFP-Fluoreszenz verwendet ($\lambda(\text{Excitation}) = 486\text{-}490 \text{ nm}$; $\lambda(\text{Emission}) = 500\text{-}750 \text{ nm}$). Die Zellzählung erfolgte mit dem Zellzähler Casi®1.

5.3 Immunpräzipitation und Glykosylierungsanalyse

Material	Hersteller
Denaturierungspuffer	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Endoglykosidase H (EndoH)	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland

Peptide:N-Glycosidase F (PNGaseF)	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
anti-GFP Antikörper, monoklonal	Clontech, Heidelberg, Deutschland
anti-Maus IgG, konjugiert mit alkalischer Phosphatase, polyklonal	Dianova, Hamburg, Deutschland

Zur Vorbereitung der Immunpräzipitation wurde Protein A-Sepharose für 30 min mit Puffer A (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, Triton-X 100 1% (v/v), SDS 0,1% (w/v), 0,5 mM PMSF, 1,4 µg/ml Aprotinin, 3,2 µg/ml Trypsininhibitor, 0,5 mM Benzamidine; pH 8,0) inkubiert und anschließend dreimal mit Puffer A gewaschen. Die so vorbereitete Protein A-Sepharose wurde mit einem polyklonalen anti-GFP Serum [66] in Puffer A für mindestens 3 h inkubiert. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation (5 min, 500 x g, 4 °C) von Puffer A und dem überschüssigen anti-GFP Serum getrennt.

Für die Präzipitation der Rezeptoren wurden transient transfizierte HEK 293 Zellen 24 h nach Transfektion verwendet. Die transfizierten Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in Puffer A aufgenommen und für 1 h lysiert. Unlösliche Anteile wurden abzentrifugiert (12 000 x g, 30 min, 4 °C). Anschließend wurde der Überstand für 3 h mit der Antikörper-gekoppelten Protein A-Sepharose inkubiert. Danach wurde zweimal mit Puffer B (Puffer A, aber mit 500 mM NaCl und Triton-X 100 0,5% (v/v)) und einmal mit Puffer C (Puffer B ohne NaCl) gewaschen. Die präzipitierten Proteine wurden mit einem Denaturierungspuffer oder einem Probenpuffer (62,5 mM Phosphatpuffer, pH 7,0, Glycerol 2% (v/v), SDS 2% (w/v), Bromphenol Blau 0,1% (w/v), Mercaptoethanol 5% (v/v)) eluiert. Für die Glykosylierungsanalyse wurden die in Denaturierungspuffer aufgenommenen Präzipitate mit EndoH oder PNGaseF nach den Empfehlungen des Herstellers inkubiert. Die auf diese Weise präzipitierten und behandelten Rezeptoren wurden für die weitere Darstellung mit Hilfe einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) getrennt. Anschließend erfolgte ein Westernblot auf Nitrozellulose. Die Detektion der Rezeptoren erfolgte mit einem monoklonalen anti-GFP Antikörper (1:4 000) und mit alkalischer Phosphatase gekoppeltem anti-Maus IgG (1:5000). Die immunoreaktiven Proteinbanden wurden durch Inkubation mit NBT/BCIP in 10 mM Tris-HCl (pH 9,5) sichtbar gemacht.

5.4 Biotinylierung von Oberflächenproteinen

Material	Hersteller
POD Substratlösung, Lumi-Light Solution	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Sulfo-NHS-Biotin	Perbio Science, Bonn, Deutschland
anti-Biotin Antikörper, monoklonal	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-Maus IgG, konjugiert mit Peroxidase, polyklonal	Dianova, Hamburg, Deutschland
Lumi-Imager F1	Roche, Mannheim, Deutschland

Für die Biotinylierung von Plasmamembranproteinen wurden transient oder stabil transfizierte HEK 293 Zellen für 30 min bei 4 °C mit 0,5 mg/ml Sulfo-NHS-Biotin inkubiert. Bei dieser Methode werden alle Plasmamembranproteine mit Biotin markiert. Die Durchführung bei 4 °C verhindert die Internalisierung von Oberflächenrezeptoren und Biotin. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen, mit Puffer A lysiert und eine Immunpräzipitation mit einem polyklonalen anti-GFP Serum durchgeführt (siehe oben). Die präzipitierten Rezeptoren wurden für die weitere Darstellung mittels SDS-PAGE getrennt und auf Polyvinyliden-Fluorid (PVDF)-Membran geblottet. Die Detektion erfolgte mit einem monoklonalen anti-Biotin Antikörper (1:3 000) und Peroxidase-konjugiertem anti-Maus IgG (1:2 500). Die immunoreaktiven Proteinbanden wurden nach Inkubation mit POD Substratlösung mit dem Lumi-Imager F1 detektiert.

5.5 Limitierte Proteolyse von Gesamtmembran-Präparationen

Material	Hersteller
anti-Kaninchen IgG, konjugiert mit alkalischer Phosphatase, polyklonal	Dianova, Hamburg, Deutschland
Ultraschaller	B. Braun 1000L, Labsonic, Deutschland

Für die Gesamtmembran-Präparation wurden transient transfizierte HEK293 Zellen verwendet. Die transfizierten Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in PBS-I (PBS mit 0,5 mM PMSF, 1,4 µg/ml Aprotinin, 3,2 µg/ml Trypsininhibitor, 0,5 mM Benzamidin) aufgenommen und mittels Ultraschall homogenisiert (1 Impuls, 10 s). Die Gesamtmembranen und das Zytoplasma wurden durch Zentrifugation (1 h, 150 000 x g, 4 °C) getrennt und das Membranpellet erneut in PBS-I aufgenommen und homogenisiert. Die so erhaltenen Proben wurden in Aliquots aufgeteilt und anschließend mit aufsteigenden Trypsin-Konzentrationen (zwischen 0-150 µg/ml) für 30 min bei 4 °C behandelt. Die Proben wurden in Probenpuffer aufgenommen und für die weitere Darstellung mittels SDS-PAGE getrennt. Anschließend erfolgte ein Westernblot auf Nitrozellulose. Die Rezeptoren wurden mit einem polyklonalen

anti-GFP Serum [66] und mit alkalischer Phosphatase konjugiertem anti-Kaninchen IgG (1:5 000) detektiert.

5.6 [³H]AVP Bindungsstudien

Material	Hersteller
[³ H]AVP	Du Pont, Bad Homburg, Deutschland
Szintillator Aquasafe 3000 Plus	Zinsser Analytic, Deutschland
Flüssig-Szintillations-Messer	FHT 111M, Contamat, Deutschland
Graph-Pad Prism Version 3.02	GraphPad software. San Diego, USA
RadLig Software 6.0	Cambridge, UK

Die Bindungsstudien mit [³H]AVP (Arginin-Vasopressin) wurden an intakten, transient transfizierten HEK 293 Zellen durchgeführt. [³H]AVP (2,4 TB/mmol) wurde in Dulbecco's PBS (D-PBS) (0,9 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, 2,7 mM KCl, 136,9 mM NaCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,1 mM, Na₂HPO₄, pH 7,4) verdünnt. Für die Bindungskurven wurden Konzentrationen zwischen 0,1 und 50 nM [³H]AVP verwendet. Die unspezifische Bindung wurde durch die Zugabe von jeweils 10 µM unmarkiertem AVP erfasst. Die Zellen wurden zweimal mit D-PBS gewaschen und anschließend mit den Vasopressin-Lösungen ([³H]AVP für totale Bindung, [³H]AVP und AVP für unspezifische Bindung) für 2 h bei 4 °C inkubiert. Die Durchführung bei 4 °C verhinderte die Internalisierung und Degradation von Oberflächenrezeptoren. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem D-PBS gewaschen und in 0,1 M NaOH für 30 min bei Raumtemperatur lysiert. Das Lysat wurde zusammen mit Szintillator (Aquasafe 3000 Plus, Zinsser Analytic, Deutschland) in ein Szintillationsgefäß überführt und die Radioaktivität mit einem Flüssig-Szintillations-Messer (Beta-Zähler) bestimmt.

Um die spezifische Bindung zu berechnen, wurde die Differenz aus totaler Bindung und unspezifischer Bindung bestimmt. Die weitere Datenauswertung erfolgte mit Hilfe der RadLig Software 6.0 und Graph-Pad Prism Version 3.02. Die K_D - und B_{max} -Werte (für Affinität und Anzahl der Rezeptoren) wurden durch eine iterative, nicht lineare Regression berechnet.

5.7 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie und Immunfluoreszenz

Material	Hersteller
Mountingmedium, Shandon ImmuMount®	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

Trypanblau	Seromed, Berlin, Deutschland
anti-58K Golgi Antikörper, monoklonal	Abcam, Cambridge, UK
anti-ERGIC 53 Antikörper, monoklonal	Axxora, Grünberg, Deutschland
anti-Maus-Cy3 IgG, polyklonal	Dianova, Hamburg, Deutschland
Laser Scanning Mikroskop, LSM510-META	Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Deutschland
Image J	http://rsbweb.nih.gov/ij/ Plugin: MBF „Image J for Microscopy“ Collection
Zeiss LSM510-META Software	Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Deutschland

Transient transfizierte HEK 293 Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten 30 mm-Deckgläsern kultiviert. Für die Mikroskopie wurden die Zellen mit PBS (37 °C, pH 7,4) gewaschen und sofort in eine beheizbare Kammer für Objektträger überführt und mit PBS überschichtet. Die Zellmembran der lebenden Zellen wurde durch Färbung mit 0,05% Trypanblau dargestellt. Die GFP-Fluoreszenzsignale des wildtypischen Rezeptors und der einzelnen Mutanten wurden mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM510-META) und den folgenden Einstellungen erfasst: multitrack mode; Objektiv: 100x/1,3 Öl; optische Schichtdicke < 2,0 µm; λ_{exc} = 488 nm, Argon Laser, BP Filter = 505-530 nm. Die Fluoreszenzsignale von Trypanblau wurden in einem zweiten Kanal mit folgenden Einstellungen aufgenommen: λ_{exc} = 543 nm, He Ne laser, LP Filter = 560 nm. Anschließend wurde ein Überlagerungsbild berechnet.

Für die Quantifizierung der Rezeptor-GFP-Signale an der Plasmamembran wurde im Trypanblau-Bild die Plasmamembran als ROI (*region of interest*, polygonal) markiert. Diese ROI wurde in die GFP-Aufnahme der gleichen Zellen transferiert und eine zweite ROI generiert, die den Zellinnenraum ohne den Zellkern umfasste. Anschließend wurden die durchschnittlichen GFP-Fluoreszenz-Signale in beiden ROI's gemessen (Zeiss LSM510-META Software und Image J) und nach dem Abzug des Hintergrundsignals die Ratio aus membranärer und intrazellulärer GFP-Intensität gebildet.

Für die Immunfluoreszenzuntersuchungen wurden transient oder stabil transfizierte HEK 293 Zellen auf Poly-L-Lysin beschichteten 12 mm-Deckgläsern kultiviert und falls notwendig mit 1 µM Bafilomycin A1 (Baf A1) für 3,5 h oder 5 µg/ml Brefeldin A (BFA) für 1 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (130 mM NaCl, 4,7

mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 5,5 mM Glukose und 10 mM HEPES, pH 7,4) gewaschen und mit Fixans (2,5 % (v/v) Paraformaldehyd, 100 mM Natriumcacodylat, 100 mM Sucrose, pH 7,5) für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 0,2 % (v/v) Trition X-100 in PBS für 15 min bei Raumtemperatur permeabilisiert und erneut gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung der fixierten HEK 293 Zellen mit einem monoklonalen anti-ERGIC 53 Antikörper (1:1000) oder einem monoklonalen anti-58K Golgi Antikörper (1:100). Als Sekundärantikörper wurde ein Cy3 konjugierter anti-Maus Antikörper (1:300) verwendet. Danach wurden die Deckgläser mit Mountingmedium auf dem Objektträger fixiert. Die GFP- und Cy3-Fluoreszenzsignale wurden am Laser Scanning Mikroskop (LSM) wie oben beschrieben mit den folgenden Einstellungen detektiert: optische Schichtdicke < 0,8 µm; multitrack mode; GFP: λ_{exc} : 488 nm, Argon laser, BP filter: 500-530 nm; Cy3: λ_{exc} : 543 nm, HeNe laser, LP filter: 560 nm. Das Überlagerungsbild wurde berechnet. Für die nachfolgende Quantifizierung der Kolo-kalisation der GFP-Fluoreszenzsignale mit dem Golgi-Markerprotein wurde der Golgi-Apparat als ROI (polygonal) anhand der Fluoreszenzsignale des 58K Golgi-Markerproteins dargestellt. In der GFP-Aufnahme (entspricht dem wildtypischen V2R oder den einzelnen Mutanten) wurde der Rest der Zelle ohne den Zellkern durch eine zweite ROI definiert. Anschließend wurden die durchschnittlichen GFP-Fluoreszenz-Signale in beiden ROI's gemessen (Zeiss LSM510-META Software und Image J) und nach dem Abzug des Hintergrundsignals die Ratio aus den Fluoreszenzsignalen im Golgi-Apparat und dem Rest der Zelle gebildet.

5.8 Immunogold-Elektronenmikroskopie

Material	Hersteller
anti-ERGIC 53 Antikörper, monoklonal	Axxora, Grünberg, Deutschland
anti-GFP Antikörper, polyklonal	Molecular Probes/Invitrogen, Eugene, USA

Die Immunogold-Elektronenmikroskopie wurde im Labor von J. Klumperman (Department of Cell Biology, University Medical Center Utrecht, Niederlande) durchgeführt. Stabil transfizierte HEK 293 Zellklone mit annähernd gleich starker Rezeptor-GFP-Fluoreszenz wurden selektioniert. Die Zellen wurden für 2 h bei Raumtemperatur durch die Zugabe von 2% Formaldehyd und 0,2% Glutaraldehyd (in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4) fixiert. Danach wurde dreimal mit Phosphatpuffer gewaschen und die Zellen in 1% Gelatine aufgenommen. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 12% Gelatine (37 °C) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert und die Gelatine auf Eis ausgehärtet. Das Pellet wurde in kleine

Blöcke geschnitten und jeweils über Nacht bei 4 °C mit 2,3 M Sucrose in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,2) inkubiert. Die Blöcke wurden dann auf Nadeln fixiert und im flüssigen Stickstoff eingefroren. Danach wurden 50-60 nm dicke Schnitte (Gefrierschnitt) hergestellt. Die einzelnen Schnitte wurden mit den Primärantikörpern (anti-GFP für die Mutante G201D bzw. anti-ERGIC 53 und anti-GFP für die Mutanten L62P und Y205C) und Protein A-Gold (10°nm Goldpartikel für GFP, 15°nm Goldpartikel für ERGIC 53) behandelt [32, 67].

5.9 Statistik

Material	Hersteller
SPSS version 12.0	SPSS, Chicago, USA

Statistische Analysen wurden mit Hilfe des Student's t-test (SPSS version 12.0) durchgeführt und P-Werte<0,05 als statistisch signifikant gewertet.

6 Ergebnisse

6.1 Intrazelluläre Retention der V2R Mutanten L62P, G201D und Y205C

Zuerst wurde der Glykosylierungszustand der NDI-verursachenden Mutanten im Vergleich zum wildtypischen V2R analysiert. Dafür wurden die jeweiligen Rezeptoren in transient transfizierten HEK 293 Zellen exprimiert und anschließend immunpräzipitiert (polyklonales anti-GFP Serum). Auf dem Westernblot erfolgte dann der Nachweis mit einem monoklonalen anti-GFP-Antikörper [Abb. 4]. Die zuvor beschriebenen zwei immunreaktiven Banden mit einer molekularen Masse von ca. 60 und 70-75 kDa konnte im Falle des wildtypischen V2R in den unbehandelten Proben nachgewiesen werden [Abb. 4A] [68]. Die 60 kDa Bande, jedoch nicht die 70-75 kDa Bande, war empfindlich gegenüber der Behandlung mit Endoglykosidase H (EndoH). Dies zeigt die Größenveränderung der Bande auf eine molekulare Masse von ca. 57 kDa. Die 57 kDa Bande repräsentiert die nicht-glykosylierte Form des GFP-fusionierten wildtypischen V2R. Die 60 kDa und die 70-75 kDa Banden waren beide empfindlich gegenüber einer Behandlung mit Peptide:N-Glycosidase F (PNGaseF). Daher repräsentiert die 60 kDa Bande die so genannte mannosereiche Form, die im ER gebildet wird. Die 70-75 kDa Bande repräsentiert die komplex glykosylierte Form des Rezeptors, die erst im Golgi-Apparat vervollständigt wird [57]. Der V2R besitzt außerdem an N-terminalen Serin- und Threonin-Resten eine O-Glykosylierung, die ebenfalls erst im Golgi-Apparat vervollständigt wird [69]. Die O-Glykosylierung wird nicht durch eine Behandlung mit PNGaseF entfernt und daher wurde die Größe der komplex glykosylierten Form nach PNGaseF-Behandlung nicht auf 57 kDa reduziert. Die Mutanten L62P und Y205C waren ohne Behandlung nur in der mannosereichen Form nachzuweisen [Abb. 4B]. Dies impliziert eine Retention der Mutanten im frühen intrazellulären Transportweg (*early secretory pathway*). Im Fall der Mutante G201D ließ sich ein nahezu wildtypisches Bandenmuster erkennen, d.h. auch hier war die mannosereiche Form und die komplex glykosylierte Form detektierbar. Es ist jedoch auffällig, dass die exprimierte Rezeptormenge im Vergleich zum wildtypischen V2R reduziert war [Abb. 4B].

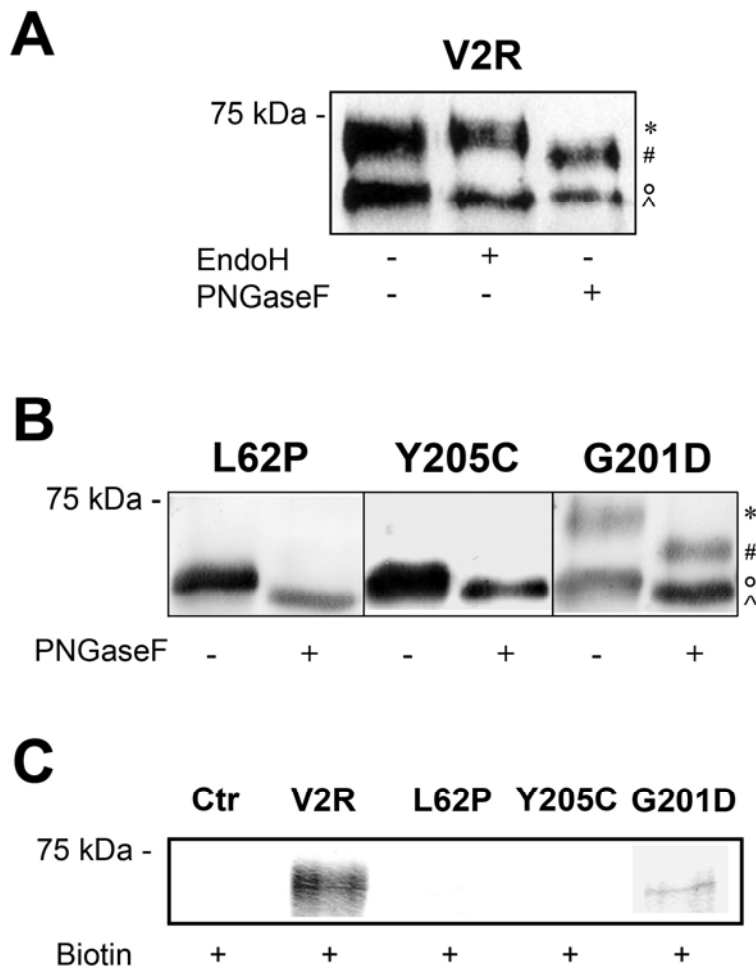


Abbildung 4: (A) Glykosylierungsanalyse des wildtypischen V2R, der in transient transfizierten HEK 293 Zellen exprimiert wurde. Die Rezeptoren wurden mit EndoH oder PNGaseF behandelt und im Westernblot mit einem monoklonalen anti-GFP Antikörper detektiert. Die komplexe Glykosylierung (*) und O-Glykosylierung (#) werden erst im Golgi Apparat vervollständigt. Ebenfalls dargestellt sind die unmodifizierte Form (^) und die mannosereiche Form (°, Modifizierung im ER).

(B) Glykosylierungsanalyse der V2R Mutanten L62P, Y205C und G201D in transient transfizierten HEK 293 Zellen. Die Rezeptormutanten wurden mit PNGaseF behandelt oder blieben unbehandelt. Die Mutanten L62P und Y205C wiesen keine komplex glykosylierten Formen (*) auf.

(C) Biotinylierung von Zellmembranproteinen mit anschließender Immunpräzipitation mit einem anti-GFP Serum. Die biotinylierten Proteine wurden im Westernblot mit Hilfe eines anti-Biotin Antikörpers detektiert. Im Vergleich zu den Mutanten L62P und Y205C wird die Mutante G201D in einem geringeren Maße als der Wildtyp, an der Zelloberfläche exprimiert.

Um den Transport zur Plasmamembran weiter zu untersuchen, wurden Biotinylierungsanalysen durchgeführt. Bei dieser Methode werden nur die komplex glykosylierten Rezeptoren an der Plasmamembran nachgewiesen. HEK 293 Zellen wurden transient transfiziert und die Oberflächenproteine anschließend biotinyliert. Zur Minimierung der Internalisierung und nachfolgender Degradation von Plasmamembranproteinen wurde der Versuch bei 4 °C

durchgeführt [70-72]. Im Gegensatz zum wildtypischen V2R sind die Mutanten L62P und Y205C nicht an der Plasmamembran nachzuweisen [Abb. 4C] [57]. Im Fall der Mutante G201D konnte eine schwache Bande biotinylierter Rezeptoren detektiert werden. Dies verdeutlicht den vorhandenen, jedoch deutlich geringeren Transport zur Plasmamembran im Vergleich zum wildtypischen V2R [Abb. 4C].

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass neben dem wildtypischen V2R lediglich die Mutante G201D im Rahmen der Funktionsstudien eine spezifische [³H]AVP-Bindung an der Plasmamembran intakter HEK 293 Zellen aufwies [Abb. 5]. Für die Mutanten L62P und Y205C konnte keine spezifische [³H]AVP-Bindung detektiert werden.

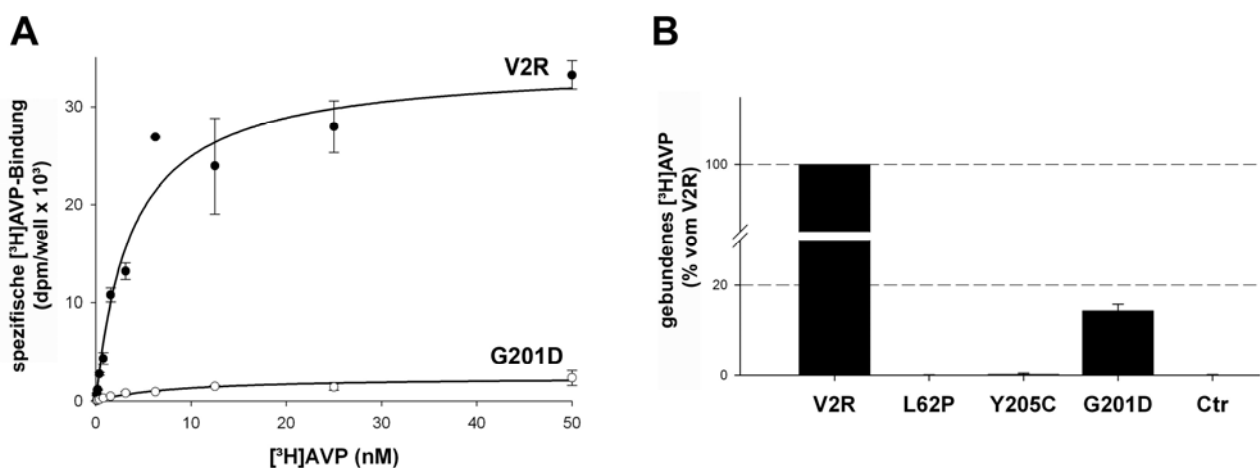


Abbildung 5: Spezifische [³H]AVP Bindung an intakten HEK 293 Zellen, die den wildtypischen V2R oder die jeweiligen Mutanten transient exprimierten. Eine spezifische Bindung war nur für den wildtypischen V2R sowie für die Mutante G201D nachweisbar. (A) zeigt eine repräsentative Bindungskurve des wildtypischen V2R ($K_D = 2,46 \pm 0,36$ nM) und der G201D Mutante ($K_D = 3,64 \pm 0,52$ nM). (B) zeigt die Ergebnisse der Bindungsanalyse mit einer [³H]AVP Konzentration von 50 nM, d.h. unter Sättigungsbedingungen. Als Negativkontrollen (Ctr) wurden nicht transfizierte Zellen verwendet. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm SD von 3 unabhängigen Experimenten.

Für die Mutante G201D war die maximale [³H]AVP-Bindung im Vergleich zum wildtypischen V2R stark reduziert. Die K_D -Werte waren aber sehr ähnlich (V2R.GFP:

$B_{\max} = 2,48 \pm 0,24$ pmol/mg; $K_D = 2,46 \pm 0,36$ nM; G201D.GFP: $B_{\max} = 0,13 \pm 0,01$ pmol/mg; $K_D = 3,64 \pm 0,52$ nM). Der Vergleich der [³H]AVP Bindung im Sättigungsbereich (50 nM [³H]AVP) zeigte für die Mutante G201D eine maximale Bindung (dpm/well) von nur $14,4\% \pm 1,3\%$ des wildtypischen V2R. Dies lässt darauf schließen, dass nur eine limitierte Menge an Rezeptoren dieser Mutante an die Plasmamembran gelangt.

Für die Mutante G201D deutet das Vorhandensein einer komplex glykosylierten Form im Immunoblot [Abb. 4] und der Nachweis eines stark reduzierten Plasmamembran-Signals in der Biotinylierungsanalyse und den Bindungsstudien [Abb. 4 und 5] an, dass ein bedeutender Anteil der G201D Rezeptoren offensichtlich erst in späteren Kompartimenten des intrazellulären Transportwegs retiniert wird. Um dies näher zu beleuchten, wurden Untersuchungen zur der intrazellulären Lokalisation der verschiedenen Mutanten und des wildtypischen V2R durchgeführt.

Die Untersuchung an lebenden, transient transfizierten HEK 293 Zellen mit Hilfe der Laser Scanning Mikroskopie erlaubt die Betrachtung der GFP-Fluoreszenzsignale (grüner Kanal, Abb. 6) der einzelnen Rezeptoren auf Einzelzellebene. Für die gleichzeitige Detektion der Plasmamembran erfolgte unmittelbar vor der Aufnahme eine Färbung mit Trypanblau (roter Kanal, Abb. 6). Dieser Farbstoff lagert sich unspezifisch an die Plasmamembran, ohne in die Zelle zu penetrieren [58]. In Übereinstimmung mit publizierten Daten [60], war der wildtypische V2R hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert [Abb. 6]. Dies wird deutlich durch die Überlagerung der GFP-Fluoreszenzsignale mit den Signalen des Plasmamembranmarkers Trypanblau. Im Gegensatz dazu wurden die GFP-Fluoreszenzsignale der Mutanten L62P und Y205C nur intrazellulär detektiert. Die diffuse, retikuläre Verteilung der GFP-Fluoreszenzen deutet an, dass die Mutanten im frühen intrazellulären Transportweg im ER retiniert bleiben.

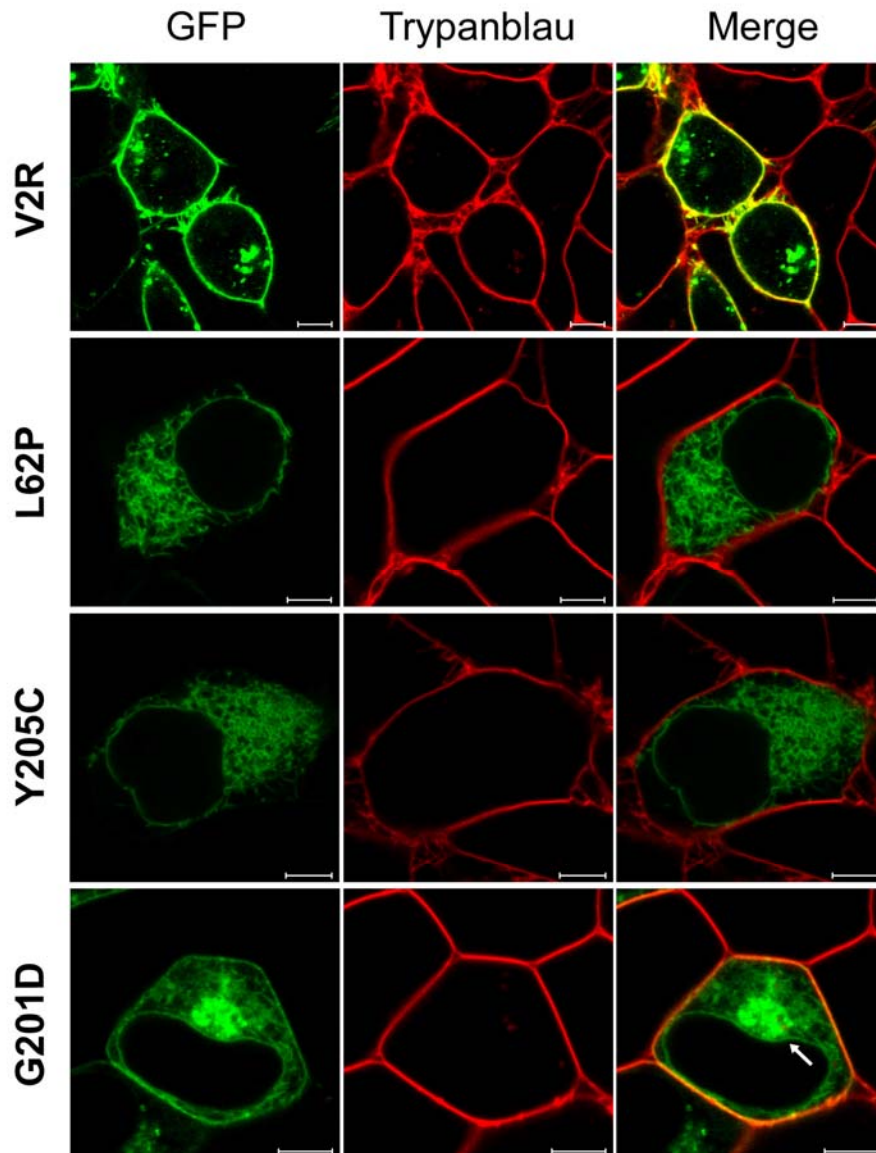


Abbildung 6: Laser Scanning Mikroskopie von intakten HEK 293 Zellen, die den wildtypischen V2R oder die Mutanten L62P, Y205C, G201D (grüner Kanal) transient exprimierten. Die Zellmembran wurde mit Trypanblau (roter Kanal) markiert und das Überlagerungsbild (Merge) wurde berechnet. Eine Kolokalisation zeigt sich im Überlagerungsbild in Gelb. Der *Pfeil* zeigt auf die perinukleäre Anreicherung der GFP-Signale der Mutante G201D. Dies ist ein Hinweis auf eine Retention in post-ER-Kompartimenten. Die Bilder zeigen repräsentative Zellen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Maßstab=5 μm .

In Übereinstimmung mit den [^3H]AVP Bindungsdaten konnte im Fall der Mutante G201D ein kleiner Teil der Rezeptoren auch an der Plasmamembran detektiert werden. Die Quantifizierung der Kollokalisierung von GFP- und Trypanblau-Fluoreszenzsignalen bestätigte diese Ergebnisse [Abb. 7]. Die Mehrheit der G201D-Fluoreszenzsignale war jedoch nicht diffus intrazellulär verteilt, wie dies bei den v.a. im ER retinierten Mutanten L62P und Y205C der Fall war. Die Mutante G201D akkumulierte perinukleär (*Pfeil* in Abb. 6]. Dies ist ein Hinweis, dass die Mutante G201D in einem post-ER-Kompartiment retiniert wird.

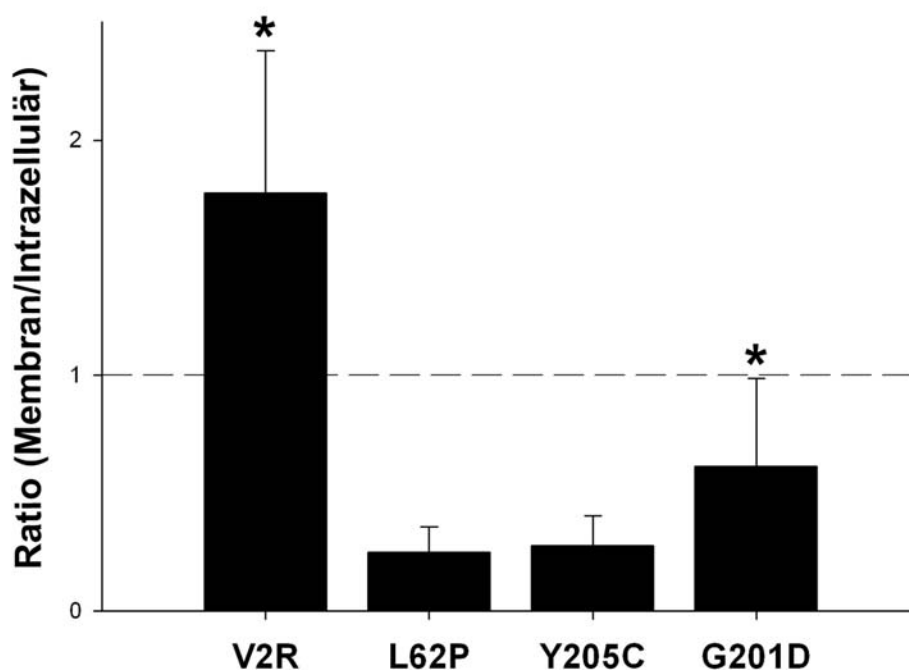


Abbildung 7: Quantitative Analyse der Kollokalisierung der GFP-Fluoreszenzsignale mit der Plasmamembran nach Laser Scanning Mikroskopie von intakten HEK 293 Zellen, die den wildtypischen V2R oder die Mutanten L62P, Y205C oder G201D transient exprimierten. Die Plasmamembran wurde mit Trypanblau markiert. Dargestellt sind die durchschnittlichen Einzelzell-Ratios der GFP-Fluoreszenz an der Plasmamembran vs. dem Rest der Zelle ohne Zellkern. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm SD ($n \geq 20$ Zellen). Der Stern (*) markiert die signifikant höhere Ratio für V2R und G201D im Vergleich zu den Ratios der Mutanten L62P und Y205C (P-Werte $< 0,001$).

6.2 Detektion der Mutante Y205C im ERGIC

Im Folgenden wurde die intrazelluläre Lokalisation der einzelnen Mutanten genauer untersucht. Unter *steady state*-Bedingungen lässt sich mittels LSM eine Lokalisation von Rezeptoren im ERGIC ähnlich wie für das ERGIC-Markerprotein (ERGIC 53) nicht eindeutig nachweisen [49]. Daher wurden die Zellen mit Baf A1 behandelt. Diese Substanz blockiert den möglichen retrograden Transport der Rezeptormutanten und führt damit zur Anreicherung der Rezeptoren

im ERGIC, wenn die Mutante dieses Kompartiment erreichen kann. Die Beeinflussung des anterograden Transportwegs und insbesondere des Golgi-Apparates ist dabei nur minimal [73]. HEK 293 Zellen wurden mit den Rezeptorkonstrukten transient transfiziert und nachfolgend für 3 h mit Baf A1 behandelt. Diese Behandlung führte im Fall der Y205C Mutante zu einer perinukleären Anreicherung und es zeigte sich in dieser Region eine Kollokalisierung der GFP-Signale mit dem ERGIC-Markerprotein ERGIC 53 [Abb. 8] [57]. Im Vergleich dazu zeigte die Mutante L62P trotz Behandlung mit Baf A1 weiterhin eine diffuse intrazelluläre Verteilung. Eine Behandlung von HEK 293 Zellen im *steady state* mit Baf A1 hatte keine Auswirkungen auf die intrazelluläre Verteilung des wildtypischen V2R oder der Mutante G201D [Abb. 8]. Mittels Immunfluoreszenzuntersuchungen konnte hier keine signifikante Kollokalisierung mit dem ERGIC-Markerprotein nachgewiesen werden. Man kann folgern, dass eine Qualitätskontrolle der Mutante Y205C nicht nur im ER sondern auch im ERGIC stattfindet. Auch im Fall der Mutante G201D deuten die Ergebnisse an, dass die Rezeptormutante möglicherweise erst in einem post – ER Kompartiment retiniert wird.

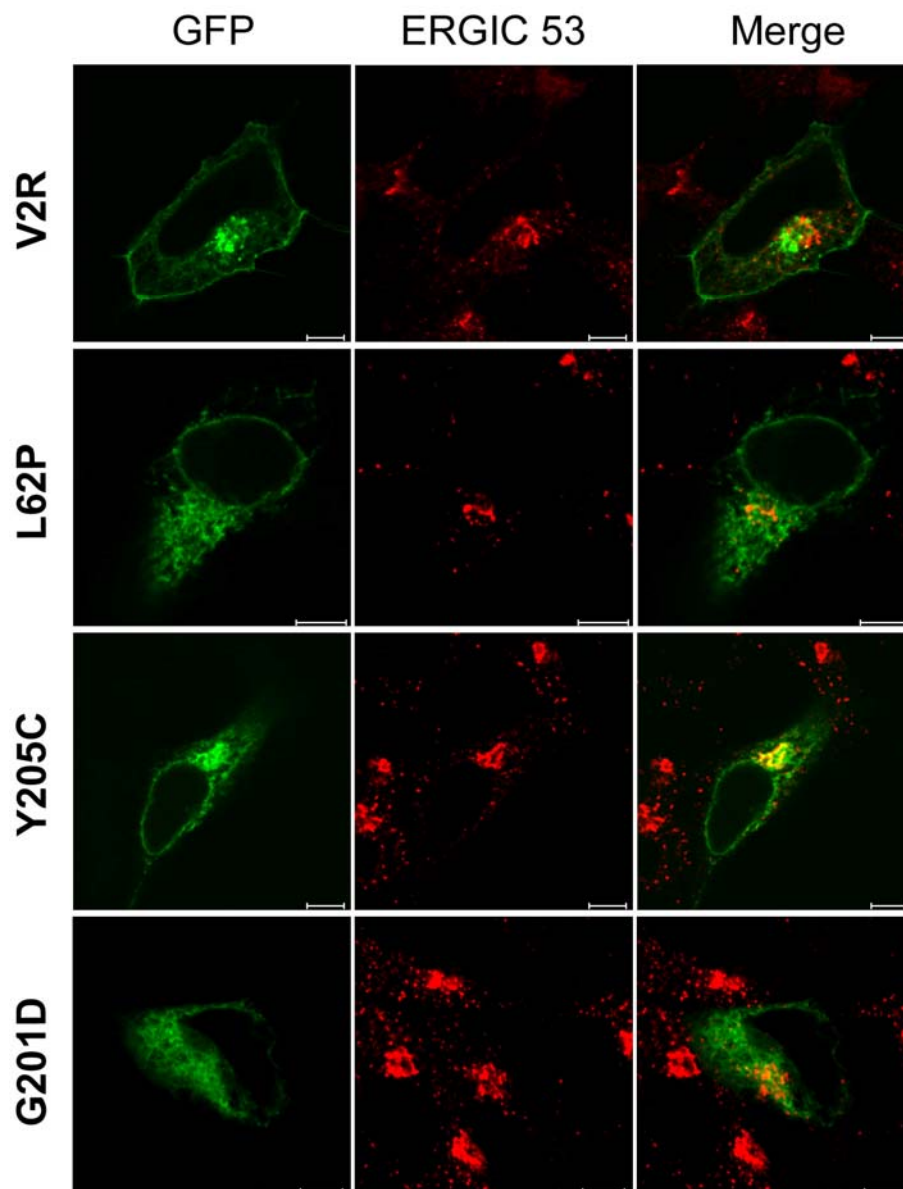


Abbildung 8: Laser Scanning Mikroskopie von fixierten HEK 293 Zellen, die den wildtypischen V2R oder die Mutanten L62P, Y205C, G201D (grüner Kanal) transient exprimierten. Nach Behandlung der Zellen mit Bafilomycin A1 für 3 h wurden diese fixiert. Das im ERGIC lokalisierte Protein ERGIC 53 wurde mit einem monoklonalen anti-ERGIC 53 Antikörper detektiert und mit einem CY3-konjugierten Sekundärantikörper (roter Kanal) visualisiert. Das Überlagerungsbild (Merge) wurde berechnet. Eine Kolokalisation zeigt sich in gelber Farbe und weist auf eine Retention im ERGIC hin. Die Bilder zeigen repräsentative Zellen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Maßstab=5 μ m.

6.3 Unterschiede in den Faltungszuständen der Mutanten L62P und Y205C

Für die Mutante G201D konnte nach Baf A1-Behandlung keine Kolo­kalisierung mit dem ERGIC-Marker (ERGIC 53) gezeigt werden. Das perinukleäre Kompartiment, in dem diese Mutante ohne Bafilomycin akkumuliert, könnte daher der Golgi-Apparat sein. Zunächst jedoch sollte analysiert werden, ob die unterschiedliche Lokalisation der Mutanten L62P und Y205C durch unterschiedliche Faltungszustände der Rezeptormutanten bedingt wird. Um dies zu untersuchen, wurden Experimente mit limitierter Proteolyse durchgeführt. Unterschiedliche Faltungszustände der Rezeptoren führen zu alternativen freiliegenden Angriffsstellen für die Serinprotease Trypsin und damit zu unterschiedlich großen Rezeptorfragmenten. Ziel war es daher, zu sehen, ob sich das Degradationsmuster und damit der Faltungszustand von Mutanten unterscheidet, die ausschließlich im ER retiniert werden oder die das ERGIC erreichen können.

Für die limitierte Proteolyse wurden Membranpräparationen von transient transfizierten HEK 293 Zellen verwendet. Die Proben wurden mit aufsteigenden Konzentrationen an Trypsin inkubiert und die Degradationsprodukte mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf einem Westernblot mit einem polyklonalen anti-GFP Serum detektiert [Abb. 9]. Es konnten nur die Fragmente detektiert werden, die C-terminal noch GFP-Anteile enthielten. Im Falle des wildtypischen V2R konnte in den unbehandelten Proben die komplex glykosylierte Form und auch die mannosereiche Form nachgewiesen werden [Abb. 9, zum Vergleich: Abb. 4A und B]. Die Behandlung mit Trypsin führte zu zwei prominenten Degradationsprodukten mit einer geschätzten molekularen Masse von 41 bzw. 32 kDa [Abb. 9]. Die Rezeptor-Mutanten zeigten in den unbehandelten Proben das gleiche Muster wie in den Glykosylierungsanalysen. Hier wurde lediglich eine kräftige Bande detektiert, die der mannosereichen Form entspricht. Nach Trypsinverdau konnten für die Mutante L62P mindestens drei immunoreaktive Degradationsprodukte (47, 41 und 32 kDa) bereits ab einer Trypsin-Konzentration von 37,5 µg/ml detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnten bei der Mutante Y205C keine 47 kDa Bande detektiert werden und die 41 kDa Bande war sehr schwach. Die Degradationsprodukte des wildtypischen V2R ähneln denen der Mutante Y205C, die 41 kDa Bande war aber bereits bei niedrigen Trypsin-Konzentrationen (≥ 15 µg/ml) detektierbar.

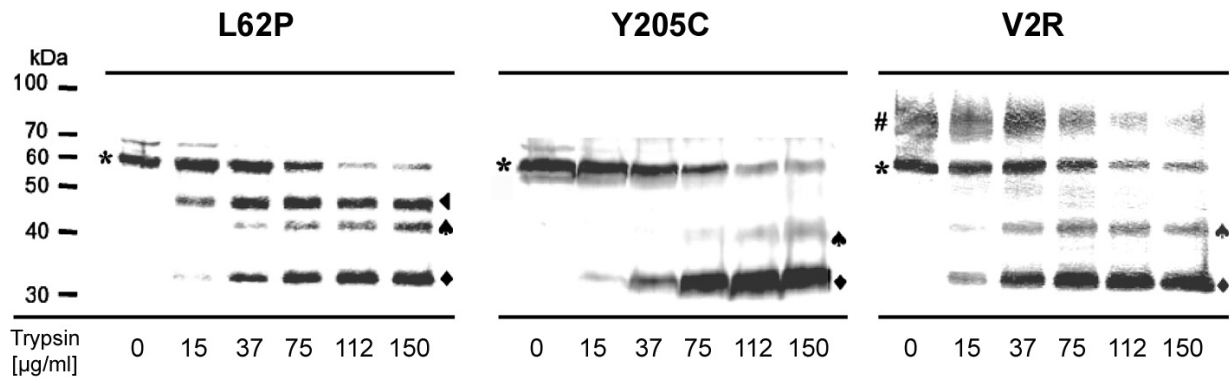


Abbildung 9: Limitierte Proteolyse von V2R-Mutanten. Membranpräparationen von transient transfizierten HEK 293 Zellen, die den wildtypischen V2R oder die Mutanten L62P bzw. Y205C exprimierten, wurden mit steigenden Trypsin-Konzentrationen (0-150 µg/ml) behandelt. Immunreaktive Proteine wurden auf einem Westernblot mit Hilfe eines polyklonalen anti-GFP-Serum und mit alkalischer Phosphatase konjugiertem anti-Kaninchen IgG detektiert. Der Westernblot ist repräsentativ für sechs unabhängige Experimente. # komplex glykosylierte Form, * mannosereiche Form, ◀ 47 kDa Degradationsprodukt, ▶ 41 kDa Degradationsprodukt, ◆ 32 kDa Degradationsprodukt (aus Hermosilla et al. [57]).

Zusammenfassend zeigt dies, dass sehr wahrscheinlich unterschiedliche Faltungszustände die verschiedenen intrazellulären Lokalisationen der Mutanten bedingen.

In weiteren Arbeiten aus der Arbeitsgruppe [57] konnte gezeigt werden, dass Mutanten, die das ERGIC erreichen, höchstwahrscheinlich über eine direkte Interaktion des COP I-Komplexes der retrograden Transportvesikel mit einem RXR-Retentionssignal in der dritten intrazellulären Schleife des V2R wieder zurück in das ER transportiert werden.

6.4 Die Mutante G201D akkumuliert im Golgi-Apparat

Bisher konnte gezeigt werden, dass es Mutanten des V2R gibt, die zum einen im ER verbleiben (L62P) und zum anderen in das ERGIC gelangen können (Y205C). Die Mutante G201D zeigt zwar eine perinukleäre Lokalisation [siehe Abb. 6], scheint aber innerhalb des Transportwegs erst nach dem ERGIC zu akkumulieren, da eine Behandlung mit Baf A1 zu keiner signifikanten Kollokalisierung mit dem ERGIC-Markerprotein führte. Als nächstes wurde daher die Kollokalisierung der Mutanten mit dem Golgi-Markerprotein Formiminotransferase-Cyclodeaminase (58K Golgi) mit Hilfe von Immunfluoreszenz und LSM untersucht [Abb. 10].

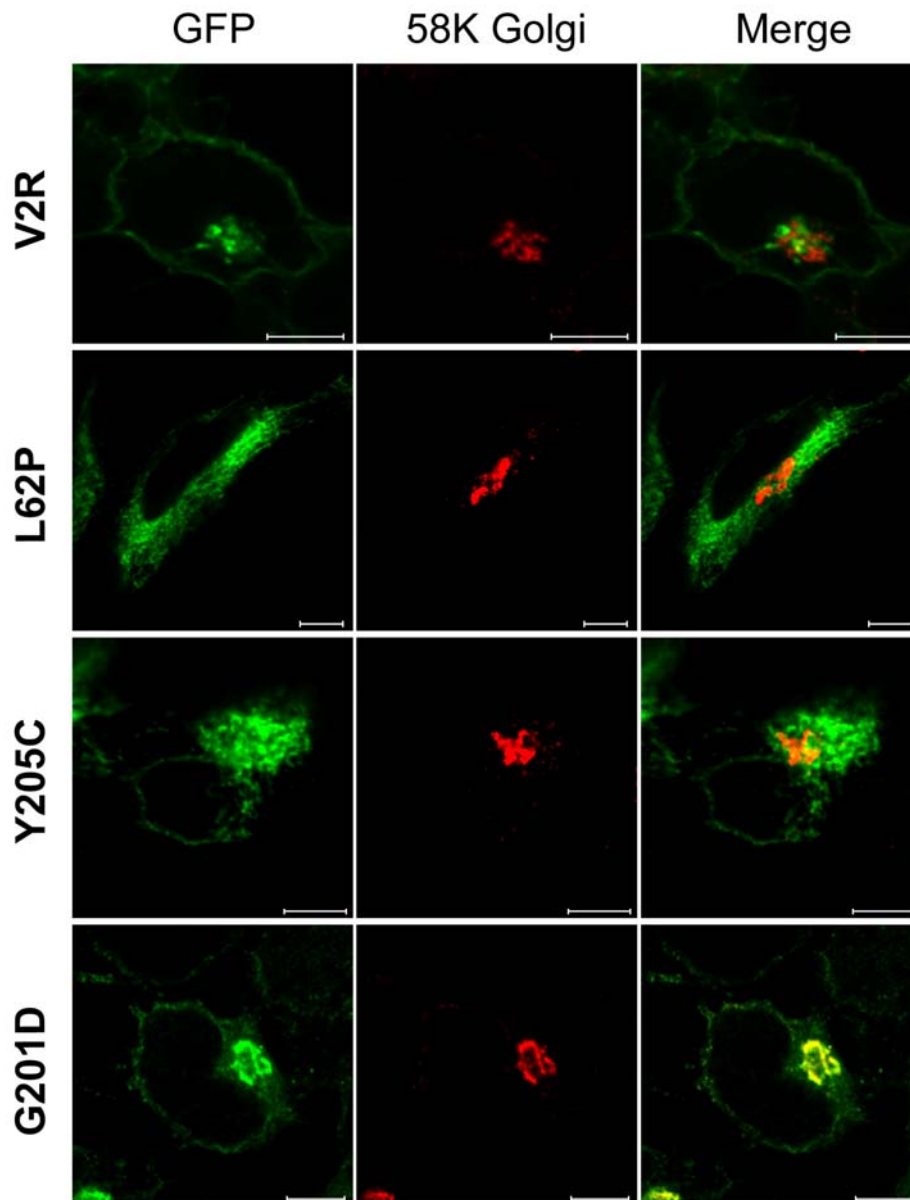


Abbildung 10: Laser Scanning Mikroskopie von fixierten HEK 293 Zellen, die den wildtypischen V2R oder die Mutanten L62P, Y205C, G201D (grüner Kanal) transient exprimieren. Das im Golgi-Apparat ansässige Protein Formiminotransferase Cyclodeaminase wurde als Golgi-Marker verwendet, mit einem 58K Golgi Antikörper detektiert und mit einem Cy3-konjugierten Sekundärantikörper (roter Kanal) visualisiert. Das Überlagerungsbild (Merge) wurde berechnet. Eine Kolokalisation ist durch die gelbe Farbe zu erkennen und deutet auf eine Retention im Golgi-Apparat. Die Bilder zeigen repräsentative Zellen aus mindestens vier unabhängig von einander durchgeführten Experimenten. Maßstab=5 μm .

Für die Mutante G201D wurde im LSM eine deutliche Kolokalisation der GFP-Signale mit dem 58K Golgi-Markerprotein detektiert [Abb. 10]. Dies konnte durch die Quantifizierung der Kolokalisation bestätigt werden [Abb. 11].

Für die Mutanten L62P und Y205C sowie für den wildtypischen Rezeptor ließ sich keine signifikante Kolokalisation mit dem 58K Golgi-Markerprotein nachweisen. Auch die Hemmung des retrograden Transportes durch Bafilomycin A1 bewirkte keine diesbezügliche Änderung. Die Mutante G201D wies eine deutliche Kolokalisation mit dem 58K Golgi-Markerprotein auf, die durch die Behandlung mit Baf A1 deutlich reduziert wurde [Abb. 11]. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Mutante G201D nicht den retrograden Transportweg nutzt, sondern nach Erreichen des Golgi-Apparats in Endosomen degradiert wird. Auch nach einer Behandlung mit BFA kam es zu einer Abnahme der Kolokalisation.

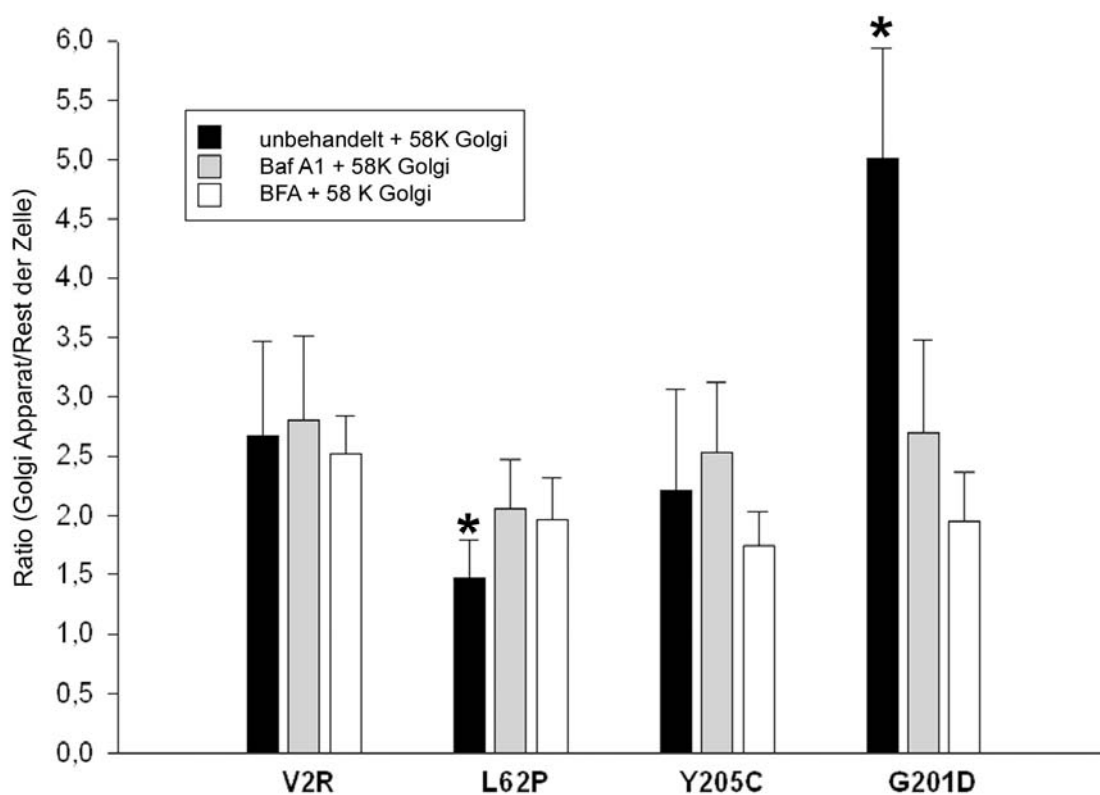


Abbildung 11: Quantitative Analyse der Kolokalisation der Rezeptoren mit dem 58K Golgi-Markerprotein basierend auf den LSM-Daten nach Immunfluoreszenz. Dargestellt sind die durchschnittlichen Einzelzell-Ratios der GFP-Fluoreszenz (entspricht den Rezeptormutanten) im Golgi-Apparat vs. dem Rest der Zelle ohne Zellkern. Die mit dem wildtypischen V2R oder den Mutanten L62P, Y205C, G201D transient transfizierten HEK 293 Zellen wurden mit Bafilomycin A1 (graue Säule, Baf A1) oder Brefeldin A (weiße Säule, BFA) behandelt oder blieben unbehandelt (schwarze Säule). Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm SD ($n \geq 20$ Zellen). Die Sterne (*) markieren einen signifikanten Unterschied zwischen unbehandelten Zellen und Zellen nach Behandlung mit Bafilomycin A1 oder Brefeldin A (P -Werte $< 0,001$).

Vordaten zeigen, dass BFA über eine ARF-Inhibierung die Dissoziation von β -COP von den Golgi-Membranen bewirkt und damit über die Reduktion der Membranstabilität eine Auflösung

des Golgi-Apparats und Umverteilung von Golgi-Proteinen (zumeist zurück ins ER) verursacht [74]. Dabei verbleiben einige „Golgi Vesikel Reste“ (*Golgi remnants*), die sich punktförmig in der Zellperipherie anordnen [75-76]. Die hier erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die Mutante G201D im Golgi-Apparat akkumuliert und dass der Golgi-Apparat an der Qualitätskontrolle dieser Mutante beteiligt ist.

Transiente Transfektionen führen zu einer Überexpression der jeweiligen Proteine. Dies könnte im Fall der Mutanten Y205C und G201D zu einer Sättigung des QCS und nachfolgend zu der beobachteten Anreicherung im ERGIC bzw. Golgi-Apparat führen. Um dies auszuschließen, wurden stabil transfizierte HEK 293 Zellklone generiert, die ein unterschiedliches Expressionsniveau aufwiesen (insbesondere niedrig exprimierende G201D- und Y205C - Zellklone sowie hoch exprimierende L62P-Zellklone). Erneut durchgeführte Immunfluoreszenzuntersuchungen zur Anreicherung im ERGIC bzw. im Golgi-Apparat zeigten keine relevanten Unterschiede im Vergleich zu den Ergebnissen der transient transfizierten HEK 293 Zellen (Daten nicht gezeigt). Die jeweiligen Expressionsniveaus scheinen daher keine entscheidende Rolle bei der Akkumulation der Mutanten im ERGIC und/oder Golgi-Apparat zu spielen.

Um die Akkumulation der Mutante G201D im Golgi-Apparat zu verifizieren, wurden in Zusammenarbeit mit Kollegen aus Utrecht die stabil transfizierten HEK 293 Zellklone auch mittels Immunogold-Elektronenmikroskopie untersucht. Hierfür wurden stabil transfizierte HEK 293 Zellklone verwendet, die im Vergleich zu den bereits publizierten Zellklonen der Mutanten L62P und Y205C ein ähnliches und insgesamt hohes Expressionsniveau aufwiesen [32]. Die Kontrolle des Expressionsniveaus erfolgte während der Generierung der stabil transfizierten Zellen mittels fluorimetrischer Analyse der GFP-Signale (siehe Methoden). Für die Mutante G201D erfolgte eine GFP-Markierung mit 10 nm Goldpartikel [Abb. 12]. Die Daten von Oueslati et al. zeigen die Mutante L62P in ER-Zisternen, jedoch nicht im ERGIC oder anderen post-ER Kompartimenten [32]. Im Gegensatz dazu konnte die Mutante Y205C im ER, ERGIC und in geringem Umfang auch im cis-Golgi-Apparat nachgewiesen werden [32]. Für die Mutante G201D ließ sich eine kräftige Markierung der Golgi-Membranen nachweisen [Abb. 12]. Zusätzlich war die Mutante G201D auch im ER, im trans-Golgi-Netzwerk, an der Plasmamembran und in endosomalen Kompartimenten/multivesikulären Strukturen (*multivesicular bodies*) nachweisbar [Abb. 12B]. Diese Daten decken sich vollständig mit den oben erwähnten Ergebnissen und verfeinern diese.

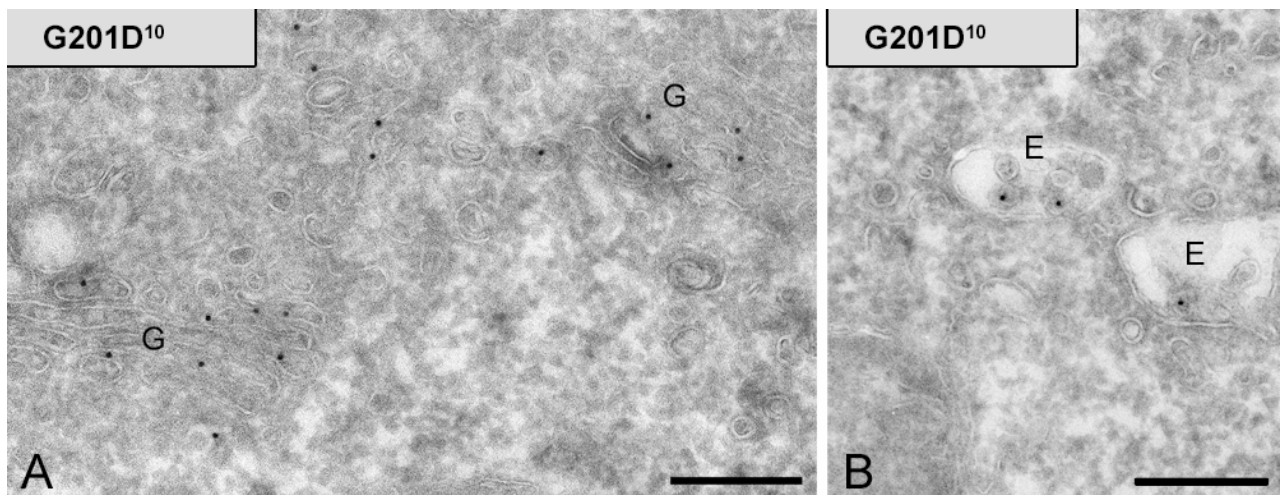


Abbildung 12: Immunogold-Elektronenmikroskopie von stabil transfizierten HEK 293 Zellen, die die V2R-Mutante G201D exprimieren. Es erfolgte eine Markierung von GFP (10 nm Goldpartikel) zur Detektion der Mutante G201D. Diese zeigte eine vermehrte Anreicherung im Golgi-Apparat (G in A). Zusätzlich wurden aber auch Rezeptoren im ER, dem trans-Golgi-Netzwerk, der Plasmamembran und in Endosomen (E in B) detektiert. Maßstab=200 nm.

Zusammenfassend zeigen die hier vorliegenden Ergebnisse, dass unterschiedliche V2R-Mutanten in verschiedenen Kompartimenten des intrazellulären Transportwegs eine Qualitätskontrolle erfahren. Man kann derzeit drei Klassen von Mutanten unterscheiden:

- 1) Mutanten, die ausschließlich im ER verbleiben (z.B. L62P),
- 2) Mutanten, die das ERGIC erreichen und von dort wieder ins ER zurück transportiert werden (z.B. Y205C),
- 3) Mutanten, die in geringem Umfang die Plasmamembran erreichen, aber auf dem Weg dorthin überwiegend im Golgi-Apparat akkumulieren (z.B. G201D).

Somit scheint nicht nur das ER sondern auch das ERGIC und der Golgi-Apparat eine Rolle für die Qualitätskontrolle des V2R zu spielen.

7 Diskussion

In dieser Arbeit wurden transportdefekte Mutanten des G-Protein-gekoppelten Vasopressin-V2-Rezeptors untersucht, die nephrogenen Diabetes insipidus verursachen können. Es konnten drei verschiedene Phänotypen dieser transportdefekten Mutanten charakterisiert werden. Die Mutante L62P wird ausschließlich im ER retiniert, die Mutante Y205C kann dagegen das ERGIC erreichen. Die Mutante G201D akkumuliert auf dem Weg zur Plasmamembran im Golgi-Apparat.

Bisher konnte nur für wenige Proteine gezeigt werden, dass das ERGIC und insbesondere der Golgi-Apparat relevante Kompartimente für die Qualitätskontrolle sind [47-48, 52, 55]. Es ist nicht eindeutig geklärt, ob es spezielle Voraussetzungen gibt, die den Transport einer Rezeptormutante aus dem ER heraus ermöglichen. Eine Überexpression der Rezeptoren in dem hier verwendeten Zellkulturmodell könnte zu einer Sättigung des ER-ständigen Qualitätskontrollsystems führen, so dass die dem ER nachgeschalteten Abschnitte des Transportwegs, wie das ERGIC und auch der Golgi-Apparat die Qualitätskontrolle übernehmen müssten. Auch wenn für Hefen eine Stress-induzierte Absättigung des ER-ständigen Degradationssystems (ERAD) gezeigt werden konnte [77], bleibt diese Erklärung für das hier verwendete Zellkulturmodell der HEK 293 Zellen unwahrscheinlich. Auch ein hohes Expressionsniveau der Mutante L62P führte zu einer ausschließlichen ER-Retention. Dagegen akkumulieren die Mutanten Y205C und G201D auch bei niedriger Expression im ERGIC bzw. Golgi-Apparat. Eine wahrscheinlichere Möglichkeit, für ein Entkommen aus dem ER könnte in den unterschiedlichen Faltungszuständen der jeweiligen Mutanten zu suchen sein. So könnten einige Proteine im ER nicht als defekt erkannt werden und eine Qualitätskontrolle in post-ER Kompartimenten hätte dann die Funktion eines zweiten Sicherheitsnetzes. Die Untersuchungen der limitierten Proteolyse unterstützen diese Hypothese. Im Vergleich zum Degradationsmuster der L62P Mutante, die im ER retiniert wird, zeigt die Mutante Y205C hinsichtlich der Degradationsprodukte eine wesentlich größere Übereinstimmung mit dem wildtypischen V2R. Dies konnte in weiteren Untersuchungen der Arbeitsgruppe auch für andere Mutanten verifiziert werden [57]. Es ergab sich ein nahezu spezifisches Degradationsmuster für ausschließlich im ER retinierte Mutanten (L62P, Δ L62-R64, S167L) und für Mutanten, die das ERGIC erreichen können (R143P, Y205C, V226E, InsQ292, R337X) [57]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die ERGIC-Mutanten sehr wahrscheinlich ein RXR-Retentionssignal in der dritten intrazellulären Schleife des V2R exponieren, das mit dem COP I-Komplex der retrograden

Transportvesikel interagiert und die Rezeptormutante so zum ER zurückführt [57].

Die L62P Mutation ist am Übergang der ersten transmembranären Domäne zur ersten intrazellulären Schleife lokalisiert (TMD1/ICL1) und scheint den stärksten Faltungsdefekt zu induzieren, da die Mutante ausschließlich im ER retiniert wird und der Transport auch nicht mit pharmakologischen Chaperonen wiederhergestellt werden kann [27, 32]. Im Falle des Rhodopsin, das zur gleichen Familie der GPCR wie der V2R gehört, interagiert der Übergang TMD1/ICL1 mit einer alpha-Helix im proximalen Anteil des C-Terminus des Rezeptors [78]. Entsprechend dem Modell von Risler et al. [79] gibt es eine 82%ige Ähnlichkeit des proximalen C-terminalen Abschnitts des V2R mit dem des Rhodopsin. Es ist daher gut nachvollziehbar, dass eine Mutation am Übergang TMD1/ICL1 des V2R (L62P) eine schwerwiegende Änderung der Struktur und damit eine gravierende Fehlfaltung hervorruft. Im Vergleich dazu ist die Y205C Mutation im C-terminalen Anteil der dritten extrazellulären Schleife lokalisiert, und induziert einen weniger schwerwiegenden Faltungsdefekt [57]. Der Übergangsbereich von der dritten extrazellulären Schleife zur fünften transmembranären Domäne ist für die Ligandenbindung und -spezifität wichtig [62, 80-81]. Tyrosin an der Position 205 und auch Glycin an der Position 201 sind hoch konservierte Aminosäuren innerhalb der Vasopressin-Rezeptor-Familie mit unterschiedlichen Liganden wie z.B. Vasopressin, Vasotocin, Isotocin, Mesotocin, Qxytocin [82-83]. Für Mutationen an der Position Y205 des V2R wird diskutiert, dass sie zu einer Fehlfaltung der Bindungstasche führen [82-83]. Dieser Defekt könnte bezüglich der Gesamtstruktur weniger schwerwiegend sein und vom ER-ständigen QCS nicht erkannt werden. Im Gegensatz zur Mutante Y205C kann die Mutante G201D den Golgi-Apparat und sogar in geringem Umfang die Plasmamembran erreichen. Dies führt in Übereinstimmung mit den hier gezeigten Bindungsstudien zu dem klinischen Phänotyp eines partiellen Diabetes insipidus [62]. Daher kann spekuliert werden, dass die Mutante G201D im Vergleich zur Mutante Y205C wiederum zu einem geringeren Faltungsdefekt führt und dass die Erkennung dieses Defekts erst in den späteren Stufen des QCS möglich ist.

Weitere Unterstützung erhält die Hypothese, dass die unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation der Mutanten durch unterschiedliche Faltungszustände bedingt ist, aus Untersuchungen mit pharmakologischen Chaperonen. So konnte gezeigt werden, dass nichtpeptidische V2R-Antagonisten, wie die Substanzen SR121463B (Satavaptan) und SR49059 (Relcovaptan) helfen können, einige der transportdefekten NDI-verursachenden V2R Mutanten an die Plasmamembran zu transportieren [26-27]. Jedoch konnte der Transport der ausschließlich im

ER retinierten Mutante L62P durch eine Behandlung mit SR121463B nicht wiederhergestellt werden [27]. Dies zeigt, dass hier die Ligandenbindungstasche offensichtlich nicht mehr korrekt gefaltet ist. Auch die von Oueslati et al. veröffentlichten Untersuchungen über CPPs unterstützen die Idee der intrazellulären Lokalisation in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Faltungszuständen [32]. Die CPPs Penetratin und KLAL können intrazellulär bereits in geringen Konzentrationen den Transport der Mutante Y205C positiv beeinflussen. Dagegen wird die intrazelluläre Lokalisation der Mutante L62P nicht beeinflusst. Penetratin und KLAL erreichen nach Endozytose und Translokation auf dem retrograden Transportweg den Golgi Apparat und schließlich auch das ERGIC, jedoch nicht das ER [32, 84-85]. Übereinstimmend mit den Lokalisationsdaten der Mutanten wurde die Mutante Y205C als post-ER-Mutante durch die Behandlung mit CPPs an die Plasmamembran transportiert. Als möglicher Mechanismus, der hinter dieser Chaperon-artigen Wirkung der CPPs steht, wird derzeit die Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration diskutiert [32].

Auch die Lokalisation der Mutation innerhalb des V2R (intra- vs. extrazellulär vs. TMD) könnte zu unterschiedlichen Phänotypen in Bezug auf die intrazelluläre Lokalisation der Mutanten führen. In Hefen zeigten Untersuchungen, dass Membranproteine mit luminalen Mutationen vom QCS erkannt werden, welches in diesem Fall erst im Golgi-Apparat wirksam wird [86]. Während des intrazellulären Transports des V2R sind die Positionen G201 und Y205 höchstwahrscheinlich luminal am Übergang zur fünften α -Helix gelegen. Die Fähigkeit einer Mutante, das ER zu verlassen, könnte ebenso durch die Lokalisation der Mutation im V2R in räumlicher Nähe zum N- oder C-Terminus des Rezeptors bedingt sein. So könnte die Nähe der Mutation zur Glykosylierung im N-Terminus (an Position N22) eine Rolle spielen. Denkbar wäre in diesem Fall eine leichtere Detektion der Mutationen durch die Lektin-Chaperone Calnexin/Calreticulin/ERp57 als Komponenten des ER-ständigen QCS [87]. Dies bestätigten Untersuchungen von Vogelbein et al. [88]. Eine Interaktion von V2R-Mutanten mit Calnexin und HSP70 wurde umso unwahrscheinlicher, je näher die Mutation im Bereich des C-Terminus lag. Gleichzeitig wurde jedoch eine Retention im ER umso wahrscheinlicher je weiter sich die Mutationen im Bereich der transmembranären Domänen befanden (im Vergleich zu den intra-/extrazellulären bzw. luminalen/cytoplasmatischen Bereichen der Rezeptoren).

Die Notwendigkeit einer Behandlung mit Baf A1 zur Darstellung der ERGIC-Lokalisation der Mutante Y205C lässt darauf schließen, dass diese Mutante im *steady state* normalerweise in das ER zurücktransportiert wird. Bafilomycin A1 bewirkt über eine Hemmung der V-ATPase die

Blockade des retrograden Transportwegs [89]. Ein Alternativweg vom ERGIC aus wäre die Degradation auf einem bis jetzt nicht bekannten Weg. Sollte ein solcher Weg ebenfalls Baf A1-sensitiv sein, so würde dies zu einer Anreicherung im ERGIC nach Behandlung mit Baf A1 führen. Eine Behandlung mit Baf A1 bewirkte dagegen keine Akkumulation der Mutante G201D im Golgi-Apparat. Die Qualitätskontrolle der Mutante G201D scheint also nicht den retrograden Transportweg zu beinhalten. Zudem zeigte sich nach der Behandlung mit Brefeldin A eine Abnahme der Kollokalisierung des 58K Golgi-Markers mit der Mutante G201D. BFA bewirkt über eine ARF-Inhibierung die Dissoziation von β -COP von den Golgi-Membranen. Dadurch kommt es zu einer Reduktion der Membranstabilität und Auflösung des Golgi-Apparats sowie einer Umverteilung von Golgi-Proteinen zurück ins ER [74]. Nach Behandlung mit BFA bilden sich außerdem so genannte *Golgi remnants*, die sich punktförmig in der Zellperipherie anordnen [75-76]. Es konnte gezeigt werden, dass diese vesikelartigen *Golgi remnants* positiv für die Formiminotransferase-Cyclodeaminase sind, die in den vorliegenden Experimenten als 58K Golgi-Marker verwendet wurde [75-76]. Damit wäre die reduzierte Kollokalisierung der Mutante G201D mit dem 58K Golgi-Marker erklärbar durch eine jeweils unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation nach Behandlung mit Brefeldin A. Während der 58K Golgi-Marker am wahrscheinlichsten in den *Golgi remnants* zu finden wäre, könnte die Mutante G201D in das ER zurücktransportiert oder auch zu den Lysosomen für eine nachfolgende Degradation transportiert worden sein. Jedoch ist bisher nicht bekannt, ob eine lysosomale Degradation von Proteinen aus dem Golgi-Apparat auch nach Behandlung mit Brefeldin A und damit Zerstörung des Golgi-Apparats möglich ist.

In der Elektronenmikroskopie konnte die Mutante G201D neben dem Golgi-Apparat, der Plasmamembran und dem ER auch in endosomalen Kompartimenten nachgewiesen werden. Diese endosomalen Signale könnten Rezeptoren entsprechen, die an der Plasmamembran konstitutiv internalisiert wurden, wie dies für den wildtypischen V2R bekannt ist. Nach Internalisierung wird der wildtypische V2R nicht erneut an die Plasmamembran gebracht (*Recycling*), sondern wird nach Polyubiquitinierung einer lysosomalen Degradation zugeführt [90-91]. Interessanterweise wurde vor kurzem für das WSc1p-Protein gezeigt, dass eine Qualitätskontrolle im Golgi-Apparat den Weg über die so genannten multivesikulären Körperchen als endolysosomales Kompartiment nimmt. Dieser Weg wird über die E3 Ubiquitin Ligase Rsp5p vermittelt [56]. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass eine Qualitätskontrolle der Mutante G201D einen ähnlichen Mechanismus beinhaltet und dass die Mutante direkt über den Golgi-Apparat oder aber über die Plasmamembran zum Lysosomen transportiert wird [52].

Für Hefen sind einige Faktoren in der Diskussion, die die Qualitätskontrolle im Golgi-Apparat vermitteln könnten. Dazu gehören die direkt im Golgi-Apparat lokalisierte E3 Ubiquitin Ligase Tul1p und auch der *vacuolar protein receptor* Vps10p [44]. Die V2R Mutante W164S rekrutiert, während sie an der Plasmamembran ist, Hitze-Schock-Proteine und den E2-E3 Komplex (Ubiquitinierungs-Komplex), um nachfolgend einer lysosomalen Degradation zugeführt zu werden [52]. Dies wird als Komponente des QCS an der Plasmamembran angesehen und könnte auch für die Mutante G201D eine Rolle spielen. Im Vergleich zum wildtypischen V2R war die Expression der Mutante G201D an der Plasmamembran stark reduziert, während die komplex glykosylierte Form des Rezeptors weiterhin zu einem substantiellen Anteil vorhanden war. Dies ist in Übereinstimmung mit Daten zur Mutante G201D, die für *Madin Darby Canine Kidney* (MDCK) Zellen erhoben wurden [92]. Die nun gezeigten Koloalisationsstudien mit dem 58K Golgi-Marker erweitern diese Befunde, da gezeigt werden konnte, dass die Mutante G201D im Golgi-Apparat von HEK 293 Zellen akkumuliert. Es ist aber auch nicht ausgeschlossen, dass die Akkumulation der Mutante G201D im Golgi-Apparat aufgrund eines durch die Mutation gestörten Golgi-Exit-Signals verursacht wird. Während es für das ER einige Hinweise für Exit-Signale gibt, ist diesbezüglich zum Golgi-Apparat nur sehr wenig bekannt [51]. Eine kürzlich erschienene Arbeit konnte zeigen, dass derartige Signale nicht durch ein einfaches Sequenzmotiv gebildet werden, sondern dass auch die Tertiärstruktur des Proteins hier eine entscheidende Rolle spielt [93].

Zusammenfassend zeigen die hier vorliegenden Daten in Säugerzellen, dass die Qualitätskontrolle des V2R nicht nur im ER sondern auch im ERGIC und im Golgi-Apparat stattfindet. Eine mögliche mechanistische Erklärung hierfür ist die unterschiedliche Faltung der Rezeptoren in Abhängigkeit von der jeweiligen Mutation. Diese Ergebnisse könnten auch für andere GPCR von Bedeutung sein.

8 Literatur

1. Stockand JD. Vasopressin regulation of renal sodium excretion. *Kidney Int.* 2010;78:849-56.
2. Cawley MJ. Hyponatremia: current treatment strategies and the role of vasopressin antagonists. *Ann Pharmacother.* 2007;41:840-50.
3. Tanoue A. New topics in vasopressin receptors and approach to novel drugs: Effects of vasopressin receptor on regulation of hormone secretion and metabolisms of glucose, fat, and protein. *J Pharmacol Sci.* 2009;109:50-2.
4. Volpi S, Rabadan-Diehl C, Aguilera G. Vasopressinergic regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis and stress adaptation. *Stress.* 2004;7:75-83.
5. Wersinger SR, Ginns EI, O'Carroll AM, Lolait SJ, Young WS, 3rd. Vasopressin V1b receptor knockout reduces aggressive behavior in male mice. *Mol Psychiatry.* 2002;7:975-84.
6. Wigger A, Sanchez MM, Mathys KC, et al. Alterations in central neuropeptide expression, release, and receptor binding in rats bred for high anxiety: critical role of vasopressin. *Neuropsychopharmacology.* 2004;29:1-14.
7. Kaufmann JE, Oksche A, Wollheim CB, et al. Vasopressin-induced von Willebrand factor secretion from endothelial cells involves V2 receptors and cAMP. *J Clin Invest.* 2000;106:107-16.
8. van Rhee AM, Jacobson KA. Molecular architecture of G protein-coupled receptors. *Drug Development Research.* 1996;37:1-38.
9. Lorenz D, Krylov A, Hahn D, et al. Cyclic AMP is sufficient for triggering the exocytic recruitment of aquaporin-2 in renal epithelial cells. *EMBO Rep.* 2003;4:88-93.
10. Rosenthal W, Seibold A, Antaramian A, et al. Molecular identification of the gene responsible for congenital nephrogenic diabetes insipidus. *Nature.* 1992;359:233-5.

11. Knoers N, Monnens LA. Nephrogenic diabetes insipidus: clinical symptoms, pathogenesis, genetics and treatment. *Pediatr Nephrol.* 1992;6:476-82.
12. Jakobsson B, Berg U. Effect of hydrochlorothiazide and indomethacin treatment on renal function in nephrogenic diabetes insipidus. *Acta Paediatr.* 1994;83:522-5.
13. Mouillac B, Chini B, Balestre MN, et al. The binding site of neuropeptide vasopressin V1a receptor. Evidence for a major localization within transmembrane regions. *J Biol Chem.* 1995;270:25771-7.
14. Fujiwara TM, Bichet DG. Molecular biology of hereditary diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16:2836-46.
15. Oksche A, Rosenthal W. The molecular basis of nephrogenic diabetes insipidus. *J Mol Med.* 1998;76:326-37.
16. Spanakis E, Milord E, C. G. AVPR2 variants and mutations in nephrogenic diabetes insipidus: review and missense mutation significance. *J Cell Physiol.* 2008;217:605-17.
17. Schülein R. The early stages of the intracellular transport of membrane proteins: clinical and pharmacological implications. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2004;151:45-91.
18. Aridor M, Hannan LA. Traffic jam: a compendium of human diseases that affect intracellular transport processes. *Traffic.* 2000;1:836-51.
19. Kopito RR. Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol Rev.* 1999;79:S167-73.
20. Rivolta C, Sharon D, DeAngelis MM, Dryja TP. Retinitis pigmentosa and allied diseases: numerous diseases, genes, and inheritance patterns. *Hum Mol Genet.* 2002;11:1219-27.
21. Jorgensen MM, Jensen ON, Holst HU, et al. Grp78 is involved in retention of mutant low density lipoprotein receptor protein in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 2000;275:33861-8.
22. Ficker E, Dennis AT, Obejero-Paz CA, et al. Retention in the endoplasmic reticulum as a mechanism of dominant-negative current suppression in human long QT syndrome. *J Mol Cell*

Cardiol. 2000;32:2327-37.

23. Rosenfeld RG, Rosenbloom AL, Guevara-Aguirre J. Growth hormone (GH) insensitivity due to primary GH receptor deficiency. *Endocr Rev.* 1994;15:369-90.
24. Pasyk EA, Foskett JK. Mutant (delta F508) cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel is functional when retained in endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Biol Chem.* 1995;270:12347-50.
25. Robben JH, Sze M, Knoers NV, Deen PM. Rescue of vasopressin V2 receptor mutants by chemical chaperones: specificity and mechanism. *Mol Biol Cell.* 2006;17:379-86.
26. Morello JP, Salahpour A, Laperriere A, et al. Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J Clin Invest.* 2000;105:887-95.
27. Wüller S, Wiesner B, Löffler A, et al. Pharmacochaperones post-translationally enhance cell surface expression by increasing conformational stability of wild-type and mutant vasopressin V2 receptors. *J Biol Chem.* 2004;279:47254-63.
28. Saliba RS, Munro PM, Luthert PJ, Cheetham ME. The cellular fate of mutant rhodopsin: quality control, degradation and aggresome formation. *J Cell Sci.* 2002;115:2907-18.
29. Noorwez SM, Kuksa V, Imanishi Y, et al. Pharmacological chaperone-mediated in vivo folding and stabilization of the P23H-opsin mutant associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *J Biol Chem.* 2003;278:14442-50.
30. Bernier V, Morello JP, Zarruk A, et al. Pharmacologic chaperones as a potential treatment for X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:232-43.
31. Fonseca SB, Pereira MP, Kelley SO. Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61:953-64.
32. Oueslati M, Hermosilla R, Schonenberger E, et al. Rescue of a nephrogenic diabetes insipidus-causing vasopressin V2 receptor mutant by cell-penetrating peptides. *J Biol Chem.* 2007;282:20676-85.

-
33. Lindgren M, Hallbrink M, Prochiantz A, Langel U. Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol Sci.* 2000;21:99-103.
 34. Lundberg P, Langel U. A brief introduction to cell-penetrating peptides. *J Mol Recognit.* 2003;16:227-33.
 35. Alves ID, Jiao CY, Aubry S, et al. Cell biology meets biophysics to unveil the different mechanisms of penetratin internalization in cells *Biochim Biophys Acta* 2010;1798:2231-9.
 36. Hammond C, Helenius A. Quality control in the secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol.* 1995;7:523-9.
 37. Sitia R, Braakman I. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature.* 2003;426:891-4.
 38. Trombetta ES, Parodi AJ. Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2003;19:649-76.
 39. Sommer T, Wolf DH. Endoplasmic reticulum degradation: reverse protein flow of no return. *FASEB J.* 1997;11:1227-33.
 40. Brodsky JL, McCracken AA. ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation. *Semin Cell Dev Biol.* 1999;10:507-13.
 41. Pahl HL. Signal transduction from the endoplasmic reticulum to the cell nucleus. *Physiol Rev.* 1999;79:683-701.
 42. Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol.* 1998;143:1883-98.
 43. Ouwendijk J, Moolenaar CE, Peters WJ, et al. Congenital sucrase-isomaltase deficiency. Identification of a glutamine to proline substitution that leads to a transport block of sucrase-isomaltase in a pre-Golgi compartment. *J Clin Invest.* 1996;97:633-41.
 44. Wang S, Ng DTW. Evasion of endoplasmic reticulum surveillance makes Wsc1p an obligate substrate of golgi quality control. *Mol Biol Cell.* 2010;21:1153-65.

-
45. Saraste J, Dale HA, Bazzocco S, Marie M. Emerging new roles of the pre-Golgi intermediate compartment in biosynthetic-secretory trafficking. *FEBS Lett.* 2009;583:3804-10.
 46. Minogue PJ, Liu X, Ebihara L, Beyer EC, Berthoud VM. An aberrant sequence in a connexin46 mutant underlies congenital cataracts. *J Biol Chem.* 2005;280:40788-95.
 47. Lotti LV, Torrisi MR, Erra MC, Bonatti S. Morphological analysis of the transfer of VSV ts-045 G glycoprotein from the endoplasmic reticulum to the intermediate compartment in vero cells. *Exp Cell Res.* 1996;227:323-31.
 48. Yamamoto K, Fujii R, Toyofuku Y, et al. The KDEL receptor mediates a retrieval mechanism that contributes to quality control at the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 2001;20:3082-91.
 49. Hauri HP, Kappeler F, Andersson H, Appenzeller C. ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway. *J Cell Sci.* 2000;113 (Pt 4):587-96.
 50. Aridor M, Bannykh S, Rowe T, Balch W. Sequential coupling between COPII and COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J Cell Biol.* 1995;131:875-93.
 51. Dong C, Filipeanu CM, Duvernay MT, Wu G. Regulation of G protein-coupled receptor export trafficking. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1768:853-70.
 52. Apaja PM, Xu H, Lukacs GL. Quality control for unfolded proteins at the plasma membrane. *J Cell Biol.* 2010;191:553-70.
 53. Sato M, Sato K, Nakano A. Endoplasmic reticulum quality control of unassembled iron transporter depends on Rer1p-mediated retrieval from the golgi. *Mol Biol Cell.* 2004;15:1417-24.
 54. Caldwell SR, Hill KJ, Cooper AA. Degradation of endoplasmic reticulum (ER) quality control substrates requires transport between the ER and Golgi. *J Biol Chem.* 2001;276:23296-303.
 55. Arvan P, Zhao X, Ramos-Castaneda J, Chang A. Secretory pathway quality control operating in Golgi, plasmalemmal, and endosomal systems. *Traffic.* 2002;3:771-80.

-
56. Wang S, Thibault G, Ng DT. Routing misfolded proteins through the multivesicular body (MVB) pathway protects against proteotoxicity. *J Biol Chem.* 2011;286:29376-87.
57. Hermosilla R, Oueslati M, Donalies U, et al. Disease-causing V(2) vasopressin receptors are retained in different compartments of the early secretory pathway. *Traffic.* 2004;5:993-1005.
58. Schülein R, Hermosilla R, Oksche A, et al. A dileucine sequence and an upstream glutamate residue in the intracellular carboxyl terminus of the vasopressin V2 receptor are essential for cell surface transport in COS.M6 cells. *Mol Pharmacol.* 1998;54:525-35.
59. Sample V, Newman RH, Zhang J. The structure and function of fluorescent proteins. *Chem Soc Rev.* 2009;38:2852-64.
60. Schülein R, Lorenz D, Oksche A, et al. Polarized cell surface expression of the green fluorescent protein-tagged vasopressin V2 receptor in Madin Darby canine kidney cells. *FEBS Lett.* 1998;441:170-6.
61. van den Ouweland AM, Dreesen JC, Verdijk M, et al. Mutations in the vasopressin type 2 receptor gene (AVPR2) associated with nephrogenic diabetes insipidus. *Nat Genet.* 1992;2:99-102.
62. Sadeghi H, Robertson GL, Bichet DG, Innamorati G, Birnbaumer M. Biochemical basis of partial nephrogenic diabetes insipidus phenotypes. *Mol Endocrinol.* 1997;11:1806-13.
63. Knoers NV, van den Ouweland AM, Verdijk M, Monnens LA, van Oost BA. Inheritance of mutations in the V2 receptor gene in thirteen families with nephrogenic diabetes insipidus. *Kidney Int.* 1994;46:170-6.
64. Tsukaguchi H, Matsubara H, Aritaki S, et al. Two novel mutations in the vasopressin V2 receptor gene in unrelated Japanese kindreds with nephrogenic diabetes insipidus. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;197:1000-10.
65. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: A laboratory manual.* ed. Cold Spring Harbor, New York: Harbor Laboratory Press, 2001.
66. Alken M, Rutz C, Kochl R, et al. The signal peptide of the rat corticotropin-releasing

factor receptor 1 promotes receptor expression but is not essential for establishing a functional receptor. *Biochem J.* 2005;390:455-64.

67. Slot JW, Geuze HJ. Cryosectioning and immunolabeling. *Nat Protoc.* 2007;2:2480-91.

68. Krause G, Hermosilla R, Oksche A, et al. Molecular and conformational features of a transport-relevant domain in the c-terminal tail of the vasopressin V2 receptor. *Mol Pharmacol.* 2000;57:232-42.

69. Sadeghi H, Birnbaumer M. O-Glycosylation of the V2 vasopressin receptor. *Glycobiology.* 1999;9:731-7.

70. Bouley R, Lin HY, Raychowdhury MK, et al. Downregulation of the vasopressin type 2 receptor after vasopressin-induced internalization: involvement of a lysosomal degradation pathway. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;288:C1390-401.

71. Robben JH, Knoers NV, Deen PM. Regulation of the vasopressin V2 receptor by vasopressin in polarized renal collecting duct cells. *Mol Biol Cell.* 2004;15:5693-9.

72. Bouley R, Hawthorn G, Russo LM, et al. Aquaporin 2 (AQP2) and vasopressin type 2 receptor (V2R) endocytosis in kidney epithelial cells: AQP2 is located in 'endocytosis-resistant' membrane domains after vasopressin treatment. *Biol Cell.* 2006;98:215-32.

73. Lázaro-Diéguez F, Jiménez N, Barth H, et al. Actin filaments are involved in the maintenance of golgi cisternae morphology and intra-golgi pH. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 2006;63:778-91.

74. Dinter A, Berger EG. Golgi-disturbing agents. *Histochem Cell Biol.* 1998;109:571-90.

75. Burman JL, Hamlin JN, McPherson PS. Scyl1 regulates Golgi morphology. *PLoS One.* 2010;5:e9537.

76. Gao YS, Alvarez C, Nelson DS, Sztul E. Molecular cloning, characterization, and dynamics of rat formiminotransferase cyclodeaminase, a Golgi-associated 58-kDa protein. *J Biol Chem.* 1998;273:22825-34.

-
77. Spear ED, Ng DT. Stress tolerance of misfolded carboxypeptidase Y requires maintenance of protein trafficking and degradative pathways. *Mol Biol Cell*. 2003;14:2756-67.
78. Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, et al. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*. 2000;289:739-45.
79. Risler JL, Delorme MO, Delacroix H, Henaut A. Amino acid substitutions in structurally related proteins. A pattern recognition approach. Determination of a new and efficient scoring matrix. *J Mol Biol*. 1988;204:1019-29.
80. Conner M, Hawtin SR, Simms J, et al. Systematic analysis of the entire second extracellular loop of the V(1a) vasopressin receptor: key residues, conserved throughout a G-protein-coupled receptor family, identified. *J Biol Chem*. 2007;282:17405-12.
81. Postina R, Ufer E, Pfeiffer R, Knoers NV, Fahrenholz F. Misfolded vasopressin V2 receptors caused by extracellular point mutations entail congenital nephrogenic diabetes insipidus. *Mol Cell Endocrinol*. 2000;164:31-9.
82. Sangkuhl K, Rompler H, Busch W, Karges B, Schöneberg T. Nephrogenic diabetes insipidus caused by mutation of Tyr205: a key residue of V2 vasopressin receptor function. *Hum Mutat*. 2005;25:505.
83. Wildin RS, Antush MJ, Bennett RL, Schoof JM, Scott CR. Heterogeneous AVPR2 gene mutations in congenital nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Hum Genet*. 1994;55:266-77.
84. Drin G, Cottin S, Blanc E, Rees AR, Temsamani J. Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides. *J Biol Chem*. 2003;278:31192-201.
85. Fischer R, Kohler K, Fotin-Mleczek M, Brock R. A stepwise dissection of the intracellular fate of cationic cell-penetrating peptides. *J Biol Chem*. 2004;279:12625-35.
86. Vashist S, Ng DT. Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *J Cell Biol*. 2004;165:41-52.
87. Molinari M, Helenius A. Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum. *Science*. 2000;288:331-3.

-
88. Vogelbein S, Schüle R. Das Qualitätskontrollsystem in post-ER Kompartimenten eukaryotischer Zellen am Beispiel des Vasopressin-V2-Rezeptors. http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000012980.
89. Palokangas H, Ying M, Vaananen K, Saraste J. Retrograde transport from the pre-Golgi intermediate compartment and the Golgi complex is affected by the vacuolar H⁺-ATPase inhibitor bafilomycin A1. *Mol Biol Cell*. 1998;9:3561-78.
90. Martin NP, Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Regulation of V2 vasopressin receptor degradation by agonist-promoted ubiquitination. *J Biol Chem*. 2003;278:45954-9.
91. Schmidt A, Wiesner B, Weißhart K, et al. Use of Kaede fusions to visualize recycling of G protein-coupled receptors. *Traffic*. 2009;10:2-15.
92. Robben JH, Knoers NV, Deen PM. Characterization of vasopressin V2 receptor mutants in nephrogenic diabetes insipidus in a polarized cell model. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289:F265-72.
93. Ma D, Taneja TK, Hagen BM, et al. Golgi export of the Kir2.1 channel is driven by a trafficking signal located within its tertiary structure. *Cell*. 2011;145:1102-15.

9 Publikationen der Dissertation

1. Hermosilla R, Oueslati M, Donalis U, **Schönenberger E**, Krause E, Oksche A, Rosenthal W, Schülein R.
Disease-causing V(2) vasopressin receptors are retained in different compartments of the early secretory pathway.
Traffic. 2004 Dec;5(12):993-1005.
2. Oueslati M, Hermosilla R, **Schönenberger E**, Oorschot V, Beyermann M, Wiesner B, Schmidt A, Klumpermann J, Rosenthal W, Schülein R.
Rescue of a nephrogenic diabetes insipidus-causing vasopressin V2 receptor mutant by cell-penetrating peptides.
J Biol Chem. 2007 Jul 13;282(28):20676-85.

10 Weitere Publikationen

1. **Schönenberger E**, Becker JU, Bröcker V, Lehner F, Helfritz F, Schwarz A, Marquardt S, Schiffer M.
Early Recurrence of pANCA-associated vasculitis within the first week after kidney transplantation. eingereicht
2. Haghikia A, Hiss M, Ringe KI, **Schönenberger E**, Fischer D, Haller H, Gwinner W.
Organ transplants do not escape paradoxical embolism.
Transpl Int. 2012 Mar;25(3):e34-7
3. **Schönenberger E**, Ehrich JH, Haller H, Schiffer M.
The podocyte as a direct target of immunosuppressive agents.
Nephrol Dial Transplant. 2011 Jan;26(1):18-24. Epub 2010 Oct 11. Review.
4. **Schönenberger E**, Mühler M, Dewey M.
Complications due to contrast agent administration: What has been confirmed in prevention?
Internist (Berl). 2010 Dec;51(12):1516-24. Review. German.
5. Lorenzen JM, **Schönenberger E**, Hafer C, Hoepfer M, Kielstein JT.
Failed rescue therapy with rapamycin after paraquat intoxication.
Clin Toxicol (Phila). 2010 Jan;48(1):84-6.
6. **Schönenberger E**, Karliova M, Dewey M.
Jaundice and itching in a 57-year-old patient.
Dtsch Med Wochenschr. 2009 Nov;134(48):2459-60. Epub 2009 Nov 18.
7. Peukert D, Kaufels N, Laule M, Schnorr J, Carme S, Farr T, **Schönenberger E**, Taupitz M, Hamm B, Dewey M.
Improved evaluation of myocardial perfusion and viability with the magnetic resonance blood pool contrast agent p792 in a nonreperfused porcine infarction model.
Invest Radiol. 2007 Apr;42(4):248-55.

8. **Schönenberger E**, Schnapauff D, Teige F, Laule M, Hamm B, Dewey M.
Patient acceptance of noninvasive and invasive coronary angiography.
PLoS ONE. 2007 Feb 28;2(2):e246

9. Dewey M, Schagen U, Eckart WU, **Schönenberger E**.
Ernst Ferdinand Sauerbruch and his ambiguous role in the period of National Socialism.
Ann Surg. 2006;244(2):315-21.

10. **Schönenberger E**, Major S, Dewey M.
Questionnaire study on the acceptance of a student initiative for computer-based medical education.
Gesundheitswesen. 2006;68(5):328-32.

11. Dewey M, **Schönenberger E**, Schnapauff D, Zimmermann E.
Medizinische Dissertation: Auf die Betreuung kommt es an.
Dtsch Ärztebl. 2004;101(36):A2370. www.aerzteblatt.de/aufsaetze/0401

12. Dewey M, **Schönenberger E**, Zimmermann E.
Peer-Education-Workshop zur Vorbereitung von Studenten auf die medizinische Dissertation. Ergebnisse einer Befragung von Teilnehmern.
Med Klin. 2003;98(8):424-7.

13. Dewey M, Petruschke I, Lasch A, Zimmermann E, **Schönenberger E**.
Computerbasierte Ausbildung: Medizinstudenten ergriffen Initiative.
Dtsch Ärztebl 2001;98:A3180-1

11 Lebenslauf

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

12 Erklärung

„Ich, Eva Schönenberger, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:
Intrazelluläre Qualitätskontrolle des Vasopressin-V2-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

13 Danksagung

Aufrichtig danken möchte ich Herrn Professor Dr. W. Rosenthal und Priv. Doz. Dr. R. Schülein. Beide haben als Betreuer den Fortgang dieser Arbeit in vielfältiger Weise gefördert. Besonders möchte ich mich für die mir während des gesamten Zeitraums der Dissertation entgegengebrachte Offenheit und Hilfe bei der Lösung verschiedenster Fragestellungen danken. Ich hatte immer das Gefühl, die Türen offen vorzufinden.

Dr. R. Hermosilla danke ich für die Unterstützung und Anleitung der Arbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe „Protein Trafficking“. Außerdem möchte ich allen weiteren Mitarbeitern dieser Arbeitsgruppe herzlich danken. Namentlich sind dies: Dr. C. Rutz, D. Michl, Dr. M. Oueslati, Dr. A. Schmidt, Dr. S. Vogelbein und K. Schulz. Herzlichen Dank geht auch an Dr. E. Klausenz und B. Mohs aus dem Sequenzierungslabor, Dr. G. Papsdorf für die Unterstützung mit den Zellkulturen, Dr. J. Furkert und J. Eichhorst für die Unterstützung bei der Arbeit im Radioaktivitätslabor und Dr. B. Wiesner für die großartige Unterstützung und seine Ideen zur Lösung von Problemen mit dem Laser Scanning Mikroskop. Auch möchte ich den Kollegen aus Utrecht danken, namentlich sind dies J. Klumperman und V. Oorschot, ohne deren Zusammenarbeit die elektronenmikroskopischen Aufnahmen nicht entstanden wären. Für die Erstellung der Zeichnung in Abb. 1 danke ich Frau S. Kreutzer aus der Grafikabteilung der Charité.