

### 3. EINLEITUNG

Zellen werden von einer Plasmamembran umgeben, die eine Grenze zwischen dem Zellinneren und dem sie umgebenden Milieu darstellt. Äußere Signale werden von Rezeptoren in der Zellmembran erkannt und in das Zellinnere geleitet. Diese Signaltransduktion kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Die Rezeptoren der meisten Hormone und Neurotransmitter vermitteln das Signal über die Aktivierung heterotrimerer GTP-bindender Proteine (G-Proteine) an Effektoren der Zelle.

Die Superfamilie dieser G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) gehört zu der größten proteinkodierenden Gen-Familie beim Menschen (McPHERSON et al: International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Mehr als 1200 verschiedene Rezeptoren sind bisher identifiziert worden. Ihre Liganden reichen von biogenen Aminen, Peptiden, Glykoproteinen, Lipiden, Nukleotiden, bis hin zu Ionen und Proteasen. Auch exogene Stimuli, wie Geschmack, Geruch und Licht werden durch diese Rezeptorfamilie vermittelt.

#### 3.1. Einteilung der GPCR

Die GPCR werden aufgrund von Sequenzhomologien in fünf Klassen eingeteilt. Allen gemeinsam ist der Aufbau aus sieben transmembranären Domänen (TMD), die durch intra- und extrazelluläre Schleifen (IZS und EZS) miteinander verbunden sind. Der N-Terminus ist extrazellulär und das C-terminale Ende im Inneren der Zelle lokalisiert. Eine Disulfidbrücke, die die 1.EZS und 2.EZS kovalent miteinander verbindet, ist bei vielen GPCR konserviert. Aufgrund von Sequenzhomologien, die die Rezeptoren vor allem in den sieben TMD aufweisen, werden die GPCR in drei große und zwei kleinere Familien eingeteilt:

Familie A:

Die Familie der Rhodopsin /  $\beta_2$ -adrenerger Rezeptor- ähnlichen Rezeptoren ist die größte und die am besten untersuchte Gruppe. Auch der in dieser Arbeit untersuchte Vasopressin V2-Rezeptor gehört in diese Familie. Die Sequenzhomologie innerhalb der Familie ist nicht groß, aber es sind einige hochkonservierte Aminosäuren vorhanden, die eine entscheidende Rolle für die Rezeptorstruktur und -funktion haben. Das DRY-Motiv am cytoplasmatischen Ende der 3. TMD ist bei allen Mitgliedern der Familie A hoch konserviert und ist an der G-Protein-Aktivierung beteiligt (WILBANKS et al., 2002). Die meisten konservierten Positionen liegen jedoch innerhalb der transmembranären Domänen.

Ein weiteres konserviertes Motiv innerhalb der Familie A ist das NPXXY-Motiv am Ende der 7. TMD vor dem Übergang zum intrazellulären C-Terminus (siehe Abb. 1). Die meisten Rezeptoren der Familie A haben innerhalb des C-Terminus, ca. 12-20 Reste nach dem Ende der 7. TMD, ein oder mehrere Cysteinreste, die häufig palmitoyliert werden. Durch diese zusätzliche Membranverankerung wird eine 4. intrazelluläre Schleife gebildet, die den C-Terminus in einen proximalen und distalen Bereich teilt.

In der Aufsicht betrachtet sind die  $\alpha$ -Helizes der transmembranären Domänen entgegen dem Uhrzeigersinn angeordnet (UNGER et al., 1997). Dabei liegt die 3.TMD fast im Zentrum des Moleküls, und die 1. TMD und die 7.TMD liegen relativ nah beieinander (LIU et al., 1995; MIZOBE et al., 1996).

Die Mitglieder der Familie A können noch in drei Untergruppen eingeteilt werden (Review: GETHER, 2000).. Die erste Gruppe hat kleine Liganden und die Ligandenbindungsstelle liegt innerhalb der transmembranären Helizes (wie z.B. beim Rhodopsin, den adrenergen Rezeptoren und ATP-Rezeptor).

Die zweite Gruppe wird von vielen Peptidhormon-bindenden Rezeptoren gebildet, wie dem Thrombin-Rezeptor, den Endothelin-Rezeptoren und den Vasopressin-Rezeptoren. Hier sind neben den transmembranären Domänen auch extrazelluläre Bereiche und der N-Terminus an der Ligandenbindung beteiligt.

Die dritte Gruppe, die Glykoprotein-Hormon-Rezeptoren, wie der Luteotropin/Choriogonadotropin-Rezeptor (LH/CGR), der Thyrotropin-Rezeptor (TSHR) und der Follikel-stimulierende-Hormon-Rezeptor (FSHR), binden ihren

Liganden vor allem durch den N-Terminus, aber auch unter Beteiligung der 1. EZS und der 2.EZS (siehe Review BOCKAERT und PIN, 1999).

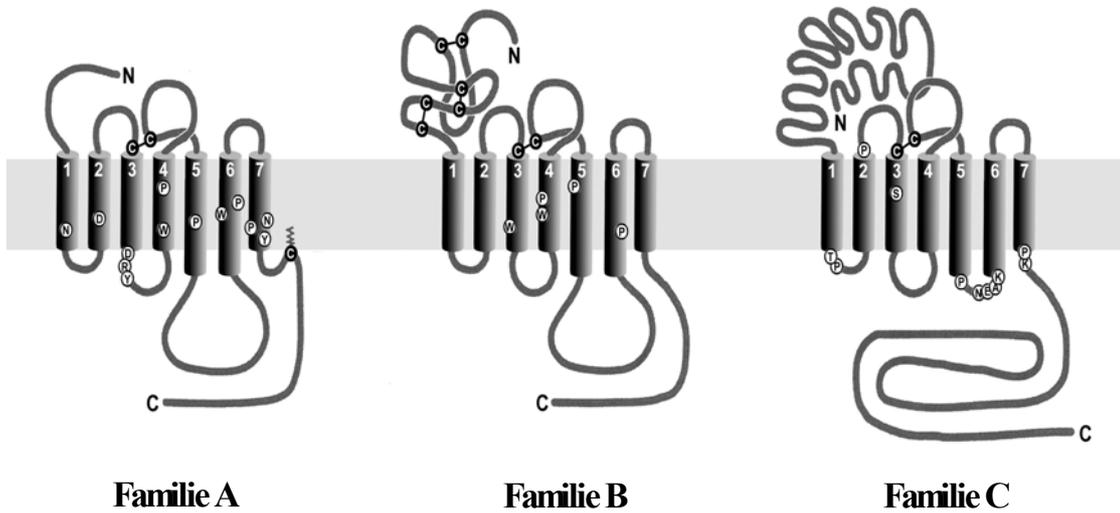
### Familie B:

Die Gruppe der Calcitonin/Glucagon-ähnlichen Rezeptoren besteht aus ca. 20 verschiedenen Rezeptoren, wie z.B. den Corticotropin-Releasing-Factor-Rezeptoren (CRFR), dem Parathyroidhormon-Rezeptor (PTHr) und den Sekretin-Rezeptoren. Alle Vertreter haben einen Liganden mit relativ hohem Molekulargewicht. Außer der Disulfidbrücke zwischen der 1.EZS und der 2.EZS haben sie keinerlei Sequenzhomologien mit anderen GPCR. Das DRY-Motiv fehlt und die konservierten Reste innerhalb der transmembranären Bereiche liegen an anderen Positionen als bei der Familie A (siehe Abb. 1). Die Rezeptoren der Familie B haben einen relativ großen N-Terminus (ca. 100 Aminosäuren), der über mehrere Disulfidbrücken verfügt (ULRICH et al., 1998). Man geht davon aus, dass der Ligand durch den N-Terminus unter Beteiligung der transmembranären Bereiche gebunden wird.

### Familie C:

Die Mitglieder dieser Gruppe, die metabotropen GABA-Rezeptoren und Glutamat-Rezeptoren, sowie die Ca<sup>2+</sup>-Rezeptoren, verfügen über einen sehr langen N-Terminus (500-600 AS).

Auch sie zeigen als gemeinsames Merkmal eine Disulfidbrücke zwischen der 1.EZS und der 2.EZS, haben aber ansonsten keine mit der Familie A und B übereinstimmenden konservierten Positionen. Der N-Terminus ist auffällig homolog zu den im Periplasma von gramnegativen Bakterien lokalisierten Bindungsproteinen (PBP) (O'HARA et al., 1993). Es wird vermutet, dass die Ligandenbindungsstelle der Rezeptoren innerhalb des N-Terminus liegt. Ein weiteres Charakteristikum der Familie C ist die sehr kurze und hoch konservierte 3.IZS (siehe Abb. 1).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der drei großen GPCR-Familien (A, B, C).** Hoch konservierte Positionen (weiße Kreise), die konservierten Disulfidbrücken (schwarze Kreise) und die Palmitoylierungsstelle im C-Terminus der Familie A sind gekennzeichnet (aus GETHER, 2000).

Pheromonrezeptoren aus der Hefe formen zwei weitere kleine GPCR-Familien: die Familie D (STE2) und die Familie E (STE3). Vier verschiedene cAMP-Rezeptoren aus Schleimpilzen (*Dictyostelium discoideum*) bilden eine weitere kleine, aber eigenständige Gruppe, die Familie F.

### 3.2. Funktion des Vasopressin V2-Rezeptors

Der Vasopressin V2-Rezeptor (V2R) gehört zur Familie A der GPCR. Er besteht aus 371 Aminosäuren und gehört nach der Klassifikation von SPIESS (1995) zu den Typ III Membranproteinen, die einen extrazellulären N-Terminus, einen intrazellulären C-Terminus und keine abspaltbare Signalsequenz aufweisen.

Der V2R wird in den epithelialen Prinzipalzellen des Sammelrohrs der Niere exprimiert. Weitere Expressionsorte sind der dünne und dicke aufsteigende Teil der Henleschen Schleife (KIM et al., 1999) und die Arkaden des Nierenkortex (KISHORE et al., 1996). Der V2-Rezeptor wird in den Epithelzellen vorwiegend an die basolaterale Membran, also zur Blutseite transportiert (NONOGUCHI et al., 1995). Dies ist physiologisch sinnvoll, denn der Ligand des V2-Rezeptors, das 8-Arginin-Vasopressin (AVP) (auch antidiuretisches Hormon, ADH genannt), gelangt über das Blut an seinen Zielort.

AVP ist ein zyklisches Nonapeptid. Nur das Hausschwein und Beuteltiere haben an Position 8 des Peptids ein Lysin, anstatt einem Arginin. AVP wird als Prärohormon in den magnozellulären Neuronen der *Nuclei supraopticus et paraventricularis* im Hypothalamus gebildet und an ein Trägerprotein gebunden. Nach Abspaltung des Signalpeptids wird das Vorläuferpeptid zusammen mit Enzymen, die für die Prozessierung zum aktiven Peptid verantwortlich sind, in Vesikeln im Hypophysenhinterlappen gespeichert. Bei Wassermangel, bzw. einem Anstieg der Plasmaosmolarität auf  $\geq 2\%$ , wird AVP von der Neurohypophyse freigesetzt (Review: OKSCHE und ROSENTHAL, 1998). AVP bewirkt dann im Sammelrohr eine regulierte Wasserrückresorption. Diese Fähigkeit, den Urin zu konzentrieren, ist besonders für landlebende Säugetiere von entscheidender, evolutionärer Bedeutung.

Die hochaffine Bindung von AVP an den V2-Rezeptor führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und auf der cytosolischen Seite zur Aktivierung des G<sub>s</sub>-Proteins. Es erfolgt eine Stimulation der membranständigen Adenylzyklase, die aus ATP den intrazellulären Botenstoff cAMP bildet. Die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) wird aktiviert und das Wasserkanalprotein Aquaporin 2 (AQP 2) phosphoryliert. AQP 2 liegt in Vesikeln

vor. Die Phosphorylierung führt schließlich zur Fusion der Vesikel mit der apikalen Membran der Sammelrohrzelle (Review: KLUSSMANN et al., 2000). An der Urinseite ermöglichen die Wasserkanäle den Einstrom von Wassermolekülen aus dem Urin in die Zelle und damit die Konzentration des Primärharns. Das Wasser wird von der Zelle basolateral durch konstitutiv exprimierte AQP3- und AQP4-Kanäle ins Interstitium geleitet. Die treibende Kraft ist dabei der osmotische Gradient zwischen dem Lumen des Sammelrohrs und dem Interstitium.

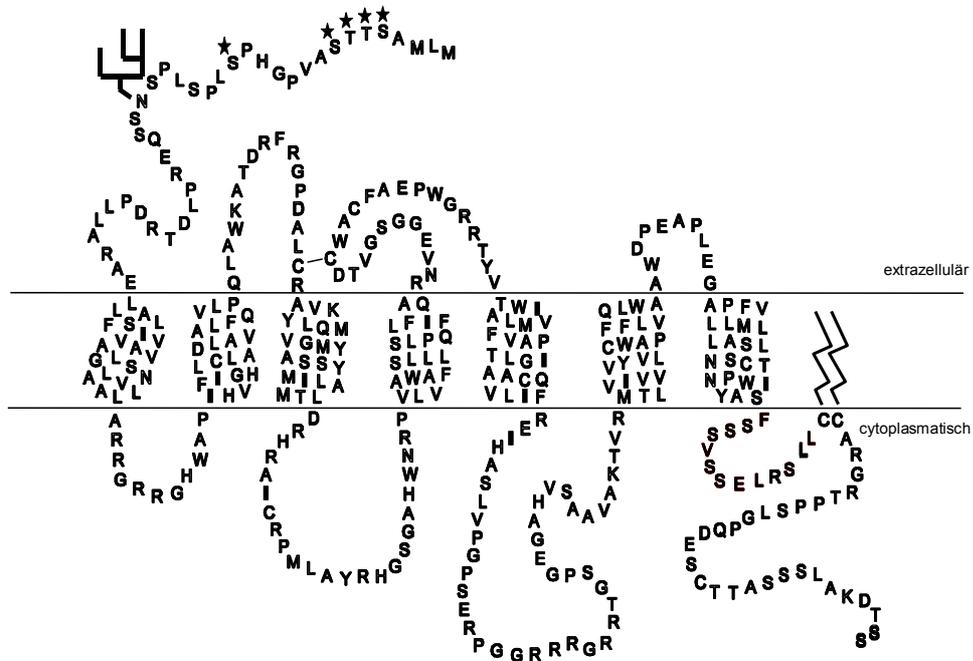
Das Gen für den Vasopressin V2-Rezeptor ist auf dem X-Chromosom lokalisiert. Defekte im V2R-Gen führen zum x-chromosomalen nephrogenen *Diabetes insipidus* (NDI) (OKSCHE et al., 1996; Review: BICHET, et al., 1997; OKSCHE und ROSENTHAL, 1998). Bei dieser Krankheit reagiert die Niere verringert oder nicht mehr auf AVP-Ausschüttung. Die Krankheit ist durch eine erhöhte Urinausscheidung (Polyurie), verstärkten Durst (Polydipsie) und eine verminderte Harnkonzentration (Hypothenurie) gekennzeichnet. Für das V2R-Gen sind inzwischen mehr als 150 NDI-verursachende Mutationen in über 240 Familien beschrieben worden (BICHET et al., 1998). Darunter sind Mutationen, die Defekte in der Ligandenbindung und/oder in der G-Protein-Kopplung verursachen. Die meisten Mutationen führen allerdings zu Proteinen, die im Zellinneren retiniert werden (SADEGHI et al., 1997; OKSCHE et al., 1998; ALA et al., 1998).

Mutationen im Gen des AQP<sub>2</sub>-Proteins führen zum autosomalen NDI. Diese Mutationen können dominant oder rezessiv vererbt werden (Review: OKSCHE und ROSENTHAL, 1998).

### **3.3. Ko- und postranslationale Modifikationen des V2-Rezeptors und anderen GPCR**

Als integrales Membranprotein wird der V2-Rezeptor kotranslational, also während der Proteinbiosynthese in die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) integriert. Die Orientierung der einzelnen Rezeptordomänen wird durch diese Insertion festgelegt. Noch während der Translation, aber auch posttranslational, finden Modifikationen am Protein statt (siehe Abb. 2).

Im ER werden Membranproteine gefaltet. Das Kompartiment enthält zahlreiche Proteine, die diesen Prozess unterstützen. Diese molekularen Chaperone gewährleisten die so genannte „Qualitätskontrolle“ des endoplasmatischen Retikulums. Nach dem Konzept von ELLIS, 1990 verhindern die molekularen „Anstandsdamen“ (engl.: chaperonin) unerwünschte Interaktionen und Aggregationen. Chaperone beinhalten selbst keine Information für die Faltung von Proteinen, sondern erleichtern durch die transiente Bindung an die neusynthetisierten Proteine einen langsamen und korrekten Faltungs- und Assemblierungsprozess.



**Abbildung 2: Zweidimensionales Topologiemodell des humanen V2-Rezeptors.** Folgende posttranslationale Modifikationen sind gekennzeichnet: eine N-Glykosylierung am Asparagin N22; potentielle O-Glykosylierungsstellen der Serine und Threonine S5, T6, T7, S8 und S15; eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen C112 und C192; Palmitoylierungen an den Cysteinen C341 und C342.

Beim V2-Rezeptor wird der extrazelluläre N-Terminus im ER am Asparagin 22 glykosyliert (SCHÜLEIN et al., 1996). Die N-Glykosylierung spielt eine wichtige Rolle bei der Qualitätskontrolle von Glykoproteinen im ER. Diese wird durch die nicht-klassischen Chaperone Calnexin/Calreticulin vermittelt (HELENIUS und AEBI, 2001; PARODI et al., 2000). Initiiert wird die N-Glykosylierung durch die Anheftung einer mannosereichen Glykangruppe (auch Kern-Glykosylierung genannt) mit drei Glukose-Resten an den Stickstoff des Asparagins im Lumen des ER. Durch die Glukosidasen I und II werden nacheinander zwei der drei Glukosereste wieder abgespalten. Die resultierende monoglykosylierte Form des Glykoproteins wird spezifisch durch die lektinähnlichen Chaperone Calnexin und/oder Calreticulin erkannt und gebunden.

Proteine mit einer korrekten Faltung werden dem Calnexin/Calreticulin-System durch die Abspaltung des letzten Glukose-Restes entzogen, ein Prozess, der durch die Glukosidase II katalysiert wird. Fehlgefaltete oder nicht gefaltete Proteine werden durch das Enzym UDP-Glukose-Glykoprotein-Glykosyltransferase (UGGT) erneut monoglykosyliert und dadurch dem Calnexin/Calreticulin-System wieder zugeführt. Die UGGT spielt damit in diesem Zyklus eine Schlüsselrolle, da dieses Enzym auf bisher unerklärte Weise den Faltungszustand des Proteins erkennt. Proteine, die die Qualitätskontrolle im ER überwunden haben, werden später im Golgi-Apparat komplex glykosyliert.

Die Funktion der Glykosylierung bei GPCR ist nicht völlig verstanden. Der FSH-Rezeptor, der LH-Rezeptor und auch der V2-Rezeptor interagieren mit membranständigem Calnexin (ROZELL et al., 1998; MORELLO et al., 2001). Bei faltungsdefekten V2-Rezeptor-Mutanten ist die Interaktion mit Calnexin fünf Mal länger als bei wildtypischen Rezeptoren. Allerdings hat die Mutagenese der N-Glykosylierungsstelle beim V2-Rezeptor keinen Effekt auf den Transport, die Faltung oder die Funktion des Rezeptors (INNAMORATI et al., 1996; SADEGHI et al., 1997). Auch beim Rhodopsin, dem  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor und dem Dopamin D1-Rezeptor hat eine fehlende N-Glykosylierung keinen Einfluss auf den Transport oder die Funktion der Rezeptoren (KARPA et al., 1999; RANDS et al., 1990; KAUSHAL et al., 1994). Es wurden auch GPCR beschrieben, die keine Glykosylierungen aufweisen ( $\alpha_{2B}$ -adrenerge Rezeptor: WEINSHANK et al., 1990). Möglicherweise kann BiP, ein lumenales Chaperon, beim Wegfall der

Glykosylierungen die Funktion des Calnexin/Calreticulin-Systems übernehmen (MOLINARI and HELENIUS, 2000).

Dagegen konnte für den Dopamin D5-Rezeptor, den LH-Rezeptor (LIU et al., 1993), aber auch für nicht verwandte Membranproteine, wie den Norepinephrin-Transporter (NGUYEN und AMAN et al., 1996) gezeigt werden, dass eine durch Tunicamycin unterbundene N-Glykosylierung den Oberflächentransport der Proteine stört. Ein Verdau der N-Glykosylierungen zeigt, das D5-Rezeptoren, die einmal an die Oberfläche transportiert worden sind, diese nicht mehr für ihre Funktion benötigen (KARPA et al., 1999). Auch bei faltungsdefekten Mutanten des Rhodopsin, bei denen zusätzlich die Glykosylierungsstelle fehlt, führt dies zu einer wesentlich längeren ER-Retention. Vermutlich spielt die N-Glykosylierung vor allem bei faltungsdefekten Mutanten, und weniger bei wildtypischen Proteinen eine Rolle (SALIBA et al., 2002).

Neben der N-Glykosylierung findet unter den oxidativen Bedingungen im Lumen des endoplasmatischen Retikulums eine weitere Modifikation des V2-Rezeptors statt. Zwischen zwei konservierten Cysteinen, C112 der ersten und C192 der zweiten extrazellulären Schleife, wird eine Disulfidbrücke geknüpft. Diese Disulfidbrücke ist bei vielen GPCR konserviert. Mutationen der Cysteine führen zu funktionsunfähigen V2-Rezeptoren, die im ER der Zelle retiniert werden (SCHÜLEIN et al., 2000).

Ob andere Chaperone an der Faltung und Reifung des V2R beteiligt sind, ist bisher nicht bekannt. Bei GPCR wurden bisher nur für Rhodopsin-Mutanten Interaktionen mit lumenalen Chaperonen BiP und grp94 nachgewiesen (ANUKANTH und KHORANA, 1994). Auch über Chaperone, die auf cytosolischer Seite mit GPCR interagieren, ist bisher noch sehr wenig bekannt. CHAPPLE und CHEETHAM (2003) zeigten, das die cytoplasmatischen Chaperone hdj-1b (hsp40) und hsp70 den Faltungsprozess von Rhodopsin beeinflussen. Für andere Membranproteine, wie den „Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ (CFTR) konnte ebenfalls eine Beteiligung von hsc70 und hdj-2 an der Faltung auf cytosolischer Seite beschrieben werden (STRICKLAND et al., 1997; MEACHAM et al., 1999).

Eine weitere Modifikation des V2-Rezeptors ist die Anheftung von langkettigen Fettsäuren an die beiden Cysteine C341 und C342 im intrazellulären C-Terminus (SCHÜLEIN et al., 1996). Dadurch wird der C-Terminus erneut mit der Membran verbunden und es bildet sich eine 4. intrazelluläre Schleife, die den proximalen Teil des C-Terminus umfasst. Bisher konnte das Kompartiment, in dem diese Palmitoylierung stattfindet nicht direkt identifiziert werden. Es wird vermutet, dass diese Modifikation im ER/Golgi-intermediären-Kompartiment (ERGIC) stattfindet (Review: QANBAR und BOUVIER, 2003)

Die meisten Rezeptoren der Rhodopsin-Familie haben eine potentielle Palmitoylierungsstelle in ihrem C-Terminus. Eine fehlende Palmitoylierung hat bei den verschiedenen GPCR unterschiedliche Effekte. Beim V2-Rezeptor führt die fehlende Palmitoylierung wahrscheinlich zu einem instabileren Protein und dadurch zu einem weniger effektiven Transport (SCHÜLEIN et al., 1996; SADEGHI et al., 1997). Bei anderen Rezeptoren hat eine fehlende Palmitoylierungsstelle keinen Effekt auf den Transport (LH/CG-Rezeptor, MUNSHI et al., 2001; V<sub>1a</sub>-Rezeptor, HAWTIN et al., 2001; Rhodopsin, KARNIK et al., 1993). Beim LH/CG-Rezeptor wird vermutet, dass die Depalmitoylierung zum Prozess der Internalisierung beiträgt (MUNSHI et al., 2001). Beim  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor führt eine fehlende Palmitoylierung zu einem Defekt in der Adenylyl-Zyklase-Aktivierung (O'DOWD et al., 1989) und beim Endothelin A-Rezeptor zum Verlust der Phospholipase C-Stimulierung; (HORSTMAYER et al., 1996).

Im Golgi-Apparat erfährt der V2-Rezeptor zusätzliche O-Glykosylierungen an einem Serin/Threonin-Cluster (S5, T6, T7, S8 und S15) im N-Terminus. Die genaue Lokalisation der O-Glykosylierung ist bisher unbekannt. (SADEGHI und BIRNBAUMER, 1999). O-Glykosylierungen sind auch beim  $\delta$ -Opioid-Rezeptor und beim Oktopus-Rhodopsin beschrieben worden (PETAJA-REPO et al., 2000; GPCR unbekannt. Die Mutagenese der Glykosylierungsstellen führt beim V2-Rezeptor zu keiner Veränderung der Rezeptorexpression und -funktion. Es gibt Hinweise, dass Glykosylierungen generell die Löslichkeit von Proteinen im extrazellulären Milieu erhöhen und dadurch zu einer größeren Stabilität führen (WORMALD und DWEK, 1999; RUDD et al., 2001). Bei sekretorischen Proteinen könnten N- und O-Glykosylierungen zu einer effizienteren Sortierung beitragen (SCHEIFFELE und FULLEKRUG, 2000; HUET et al., 2003).

Um die Signalübertragung nach einer Aktivierung des V2-Rezeptors durch den Liganden zu beenden, wird der Rezeptor phosphoryliert. Diese Modifikation findet an einem Serin-Cluster (S362, S363 und S364) im distalen C-Terminus statt und wird durch die GPCR-Kinase (GRK) vermittelt (INNAMORATI et al., 1997 und 1998). V2-Rezeptoren werden auf diese Weise desensitiviert und die Internalisierung in Clathrin-Vesikeln eingeleitet (PFEIFFER et al., 1998).

### **3.4. Intrazellulärer Transport von GPCR**

Der intrazelluläre Transport von GPCR verläuft analog dem Transport von anderen Membranproteinen. Membranproteine, die an die Plasmamembran, zu Lysosomen oder zu Endosomen transportiert werden, gelangen über das endoplasmatische Retikulum, das ERGIC und den Golgi-Apparat zu ihrem Zielkompartiment. Größere Membranproteine werden in Säugerzellen kotranslational, also während der Proteinbiosynthese in die ER-Membran eingefädelt. Im ER faltet sich das Protein und wird posttranslational modifiziert. Proteine, die die Qualitätskontrolle des ER überwunden haben, werden in der Membran von Transportvesikeln zu ihrem Zielkompartiment transportiert.

Das ERGIC, auch bekannt als VTCs (vesicular tubular clusters), ist ein tubovesikuläres Intermediat zwischen ER und Golgi-Apparat. Es dient wahrscheinlich der Sortierung und Konzentration der zu transportierenden Proteine und der Rückführung von ER-ständigen Proteinen (HAURI et al., 2000: a und b).

Bedingung für das Verlassen des ER ist die korrekte Faltung eines Proteins. Sekretorische Proteine, die in großen Mengen produziert werden, können wahrscheinlich ohne spezifisches Signal aus dem ER heraustransportiert werden („bulk flow“ Modell, WIELAND et al., 1987; MARTINEZ-MÉNARJEZ et al., 1999).

Für Membranproteine, die nur in geringen Mengen produziert werden, scheint es dagegen von Vorteil, dass sie Signale besitzen, die das Einsortieren in

Vesikel und damit den Transport erleichtern. Der Export aus dem endoplasmatischen Retikulum scheint für den Proteintransport eine Art Nadelöhr zu bilden. Daten für den  $\delta$ -Opioid-Rezeptor, aber auch für andere Membranproteine zeigen, dass manchmal ein großer Anteil des neusynthetisierten, wildtypischen Proteins das ER nicht verlassen kann und abgebaut wird (PETÄJÄ-REPO et al., 2000 und 2001; SCHUBERT et al., 2000).

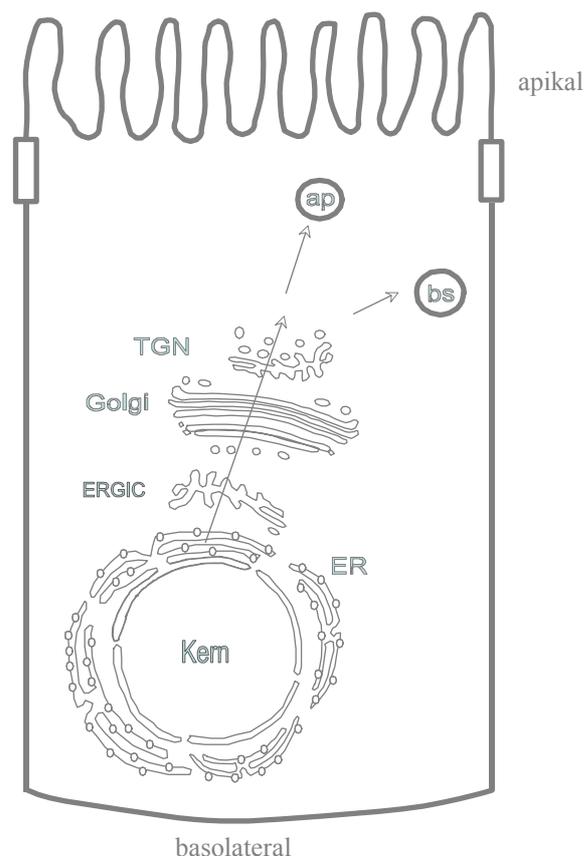
Bisher sind nur wenige ER-Export-Signale für Membranproteine beschrieben worden (NUFER et al., 2002; MA et al., 2001). Es handelt sich dabei um kurze Aminosäuresequenzen im cytoplasmatischen Bereich. Man geht davon aus, dass diese Signale von cytosolischen Proteinen erkannt werden, die das Einsortieren in die richtigen Vesikel steuern. Der vesikuläre Transport zwischen ER, ERGIC und Golgi wird von COP-Proteinen (coat-Proteinen) gesteuert.

COPII-Proteine bestehen bei Säugetieren aus dem Sec13-Komplex (Sec13p:  $\sim$  34 kDa und Sec31p:  $\sim$  150 kDa), dem Sec23-Komplex (Sec23p:  $\sim$  85 kDa und Sec24p:  $\sim$  105 kDa) und Sar1, einer  $\sim$  21 kDa großen GTPase (WIELAND und HARTER, 1999). COPII-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei dem ER-zu-Golgi-Transport. Sie interagieren mit kurzen hydrophoben Sequenzen der Membranproteine, wie FF oder LL (FIEDLER et al., 1996; KAPPELER et al., 1997; HAURI et al., 2000b). Das Glykoprotein des vesikulären Stomatitis Virus (VSV) wird dagegen mit Hilfe von einem Tyrosin und zwei sauren Resten aus dem ER geleitet (SEVIER et al., 2000).

COPI-Proteine bestehen bei Säugetieren aus einem Coatomer-Komplex ( $\alpha$ -Cop:  $\sim$  140 kDa,  $\beta$ -Cop:  $\sim$  107 kDa,  $\beta'$ -Cop:  $\sim$  102 kDa,  $\gamma$ -Cop:  $\sim$  97 kDa,  $\delta$ -Cop:  $\sim$  57 kDa,  $\epsilon$ -Cop:  $\sim$  35 kDa,  $\zeta$ -Cop:  $\sim$  20 kDa) und ARF 1, einer  $\sim$  20 kDa großen GTPase (ROTHMAN et al., 1994). COPI-Proteine ermöglichen den bidirektionalen Transport innerhalb des Golgi-Apparates und den retrograden Transport vom Golgi und/oder ERGIC zum ER (ORCI et al., 1997). ER-ständige Proteine, die ins ERGIC gelangt sind, werden mit Hilfe eines KDEL- oder eines Dilysin-Motivs durch COPI-Vesikel in das ER zurückgeführt (KAPPELER et al., 1997; LETOURNEUR et al., 1994). Ferner können fehlgefaltete Proteine, die ins ERGIC gelangt sind, durch COPI-Vesikel wieder in das ER zurückgeführt werden (CFTR: GILBERT et al., 1998; T-Zell-Antigen-Rezeptoren: YAMAMOTO et al., 2001).

Vom ER/ERGIC aus erreichen die Proteine zunächst den cis-Golgi-Apparat. Hier und im medialen Golgi finden weitere Modifikationen zur Reifung der neusynthetisierten Proteine statt. N-Glykosylierungen werden verändert und vollendet (siehe oben). Ferner werden O-Glykosylierungen neu angefügt. Im Trans-Golgi-Network (TGN) werden die Proteine je nach Zielkompartiment in verschiedene Vesikel sortiert.

Der Vasopressin V2 Rezeptor wird in vivo in polarisierten Epithelzellen exprimiert. Epithelzellen bilden zwei funktionell voneinander getrennte Oberflächenkompartimente aus: die apikale und die basolaterale Membran. Diese sind durch tight junctions voneinander getrennt. Das Zielkompartiment des V2-Rezeptors ist die basolaterale Plasmamembran (NONOGUCHI et al., 1995). Auch in Zellkultur wird der V2-Rezeptor in MDCKII-Zellen vorwiegend basolateral exprimiert (SCHÜLEIN et al., 1998; ANDERSEN-BECKH et al., 1999).



**Abbildung 3: Überblick über den intrazellulären Transport eines Membranproteins in einer polarisierten Epithelzelle.** ER, endoplasmatisches Retikulum; ERGIC, ER/Golgi-intermediäres Kompartiment; Golgi, Golgi-Apparat; TGN, trans-Golgi-Network; ap, apikale Transportvesikel; bl, basolaterale Transportvesikel; tj, tight junctions.

Eine überwiegende Expression in der basolateralen Membran ist für mehrere andere GPCR beschrieben worden, die ebenfalls Botenstoffe aus dem Blut binden, wie den  $\alpha$ -adrenergen Rezeptoren, den LH-Rezeptor, den TSH-Rezeptor und den FSH-Rezeptor (WOZNIAK und LIMBIRD, 1996; BEAU et al., 1997 und 1998). Signale für den basolateralen Transport sind an nicht mit GPCR verwandten Membranproteinen untersucht worden. Sie liegen auf der cytosolischen Seite, wie z.B. ein Dileuzin-Motiv beim IgG-Fc-Rezeptor (HUNZIKER und FUMEY, 1994), zwei hydrophobe Reste beim CD44-Protein (SHEIKH und ISACKE, 1996) und ein Tyrosin-Motiv beim Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor (LDLR) (MATTER et al., 1992). Bei GPCR scheinen beim FSH-Rezeptor ein Tyrosin- und ein Leuzin-Rest im intrazellulären distalen Bereich des C-Terminus für den basolateralen Transport verantwortlich zu sein (BEAU et al., 1998). Beim  $\alpha_{2A}$ -adrenergen Rezeptor stabilisiert die dritte intrazelluläre Schleife den Rezeptor in der basolateralen Membran (SAUNDERS et al., 1998). Es konnte allerdings kein spezifisches Signal für diese Stabilisierung gefunden werden. Bisher geht man davon aus, dass die Länge dieser Schleife zu einer basolateralen Sortierung führt.

Zu den apikal exprimierten GPCR gehören z.B. das Rhodopsin und der Adenosin A1-Rezeptor (CHUANG und SUNG, 1998; SAUNDERS et al., 1996). Über apikale Sortierungssignale ist wenig bekannt. Beim Rhodopsin bestimmen die letzten fünf Aminosäuren des C-Terminus die apikale Sortierung (DERETIC et al., 1998). Experimente mit verkürzten V2-Rezeptor-Mutanten, die die verschiedenen intrazellulären Schleifen exprimieren, lassen den Schluss zu, dass der C-Terminus des V2R ebenfalls ein bislang nicht näher identifiziertes apikales Sortierungssignal enthält. Dieses Signal wird wahrscheinlich im vollständigen Rezeptor durch ein basolaterales Signal in der zweiten IZS suprimiert (HERMOSILLA und SCHÜLEIN, 2001). Apikale Signale können auch auf der extrazellulären Seite des Proteins lokalisiert sein. So konnte gezeigt werden, dass Glykosylierungen den apikalen Transport eines Proteins festlegen können (RODRIGUEZ-BOULAN und ZURZOLO, 1993; GUT et al., 1998).

Ein weiterer wichtiger Transportweg der GPCR ist die Agonisten-gesteuerte Internalisierung/Sequestrierung der Rezeptoren. Hierbei werden aktivierte Rezeptoren nach einer Phosphorylierung vesikulär der Zelloberfläche entzogen. Die

meisten GPCR werden über die Bindung von Arrestin vom G-Protein entkoppelt und über Clathrin-Vesikel in frühe Endosomen transportiert (LUTTRELL und LEFKOWITZ, 2002). Auch der aktivierte V2-Rezeptor wird relativ schnell phosphoryliert und über Clathrin-Vesikel internalisiert (PFEIFFER et al., 1998).

Es gibt „recyclingfähige“ Rezeptoren, die nach Dissoziation des Arrestins, vom Liganden getrennt und von einer membranassoziierten Phosphatase dephosphoryliert und zurück an die Oberfläche transportiert werden. Es gibt aber auch Rezeptoren, die stabile Komplexe mit Arrestin bilden und wahrscheinlich nicht in der Lage sind mit den endosomalen Phosphatasen zu interagieren. Diese Rezeptoren gelangen in die späten endosomalen Kompartimente und werden in den Lysosomen abgebaut (OKSCHE et al., 2000; OAKLEY et al., 2000; INNAMORATI et al., 2001). Der V2-Rezeptor bildet einen stabilen Komplex mit  $\beta$ -Arrestin. Es konnte kein schnelles Recycling beobachtet werden, so dass er zu den Rezeptoren gerechnet wird, die lysosomal als Rezeptor-Ligand-Komplex abgebaut werden (BOWEN-PIDGEON et al., 2001; TOHGO et al., 2003).

Auch das Signal für die Internalisierung eines Rezeptors muss in der Sequenz des Proteins selbst zu finden sein. Bei GPCR konnten bisher wenige Motive identifiziert werden, die einen regulatorischen Effekt auf die Internalisierung haben. Der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor verfügt in seinem proximalen C-Terminus über zwei Leuzine direkt vor den beiden Palmitoylierungsstellen, welche für eine effektive Internalisierung notwendig sind (GABILONDO et al., 1997). Der LH/CG-Rezeptor hat ebenfalls im proximalen C-Terminus zwei zusätzliche Leuzine mit einem davorliegenden Glutamat. Mutagenesen zeigten, dass dieses Motiv die Internalisierung des Rezeptors inhibiert (NAKAMURA et al., 1999).

### **3.5. Der intrazelluläre C-Terminus als transportrelevante Domäne des V2-Rezeptors**

Über die Mechanismen, die den Transport von GPCR regulieren, ist relativ wenig bekannt. Um Sequenzen zu bestimmen, die für einen effektiven Oberflächentransport von GPCR notwendig sind, wurden C-terminale Trunkierungen benutzt. Beim Ratten Glucagon Rezeptor sind Fragmente mit einer,

drei oder fünf transmembranären Domänen transportdefizient und werden im endoplasmatischen Retikulum retiniert. Es wird angenommen, dass alle sieben TMD für einen Oberflächentransport des Rezeptors vorhanden sein müssen (UNSON et al., 1995). Auch Versuche mit Rhodopsinfragmenten, bestehend aus den ersten fünf TMD, zeigten, dass diese verkürzten Moleküle nicht in der Lage sind, das ER zu verlassen (HEYMANN und SUBRAMANIAM, 1997).

Für den V2-Rezeptor konnte gezeigt werden, dass die 4.IZS, also der proximale Bereich des C-Terminus vor den Palmitoylierungen, eine wesentliche Rolle beim Oberflächentransport spielt. Mutagenesen der Palmitoylierungsstellen C341S und C342S führen zu einem erheblich reduzierten Transport des Rezeptors (SCHÜLEIN et al., 1996). Trunkierungen vor den beiden palmitoylierten Cysteinen, also im proximalen Bereich des C-Terminus führen zu vollständig im Zellinneren retinierten Rezeptoren. Die natürlich vorkommende Trunkierung R337X (Stopcodon an der Position R337) führt bei Patienten zu einem voll ausgebildeten nephrogenen *Diabetes insipidus* (BICHET, 1994). Auch in vitro führen Trunkierungen am R337, aber auch die Trunkierung L339X zu einem Transportdefekt (SADEGHI et al., 1997, OKSCHE et al., 1998). Dagegen haben Verkürzungen nach den Palmitoylierungsstellen, also im distalen Bereich des C-Terminus, kaum einen Einfluss auf den Transport (OKSCHE et al., 1998).

In der Folge wurde gezeigt, dass ein Glutamat-Dileuzin-Motiv (E<sup>335</sup>LRSL<sup>339</sup>L<sup>340</sup>) vor den beiden palmitoylierten Cysteinen für einen effizienten Transport des Rezeptors essentiell ist (SCHÜLEIN et al., 1998). Allerdings handelt es sich hierbei möglicherweise nicht um ein unabhängiges Transportsignal des Rezeptors, sondern um Aminosäuren, die wichtig für die transportkompetente Faltung des Gesamtrezeptors sind (KRAUSE et al., 2000).

Der proximale C-Terminus konnte auch bei anderen GPCR für einen effektiven Oberflächentransport verantwortlich gemacht werden. Trunkierungen innerhalb des proximalen C-Terminus führen meist zu einem vollständig im ER retinierten und funktionsunfähigen Rezeptor (LH/CG-Rezeptor, RODRIGUEZ et al., 1992;  $\alpha_{1B}$ -adrenogener Rezeptor: WANG et al., 2000; ET<sub>A</sub>-Rezeptor, CYR et al., 1993; Histamin H<sub>2</sub>-Rezeptor, FUKUSHIMA et al., 1997).

Auch bei Rezeptoren ohne Palmitoylierungsstellen, wie dem Angiotensin II AT1-Rezeptor, dem Thyrotropin-Rezeptor, dem Parathyroidhormon-Rezeptor und dem Ratten-Substanz P-Rezeptor, ist eine bestimmte Länge des C-Terminus für die Expression eines funktionellen Rezeptors an der Oberfläche notwendig (THOMAS et al., 1995; CHAZENBALK et al., 1990; SCHNEIDER et al., 1994; SASAKAWA et al., 1994). Auch beim Rhodopsin ist die Anwesenheit von mindestens fünf Aminosäuren des proximalen C-Terminus für einen funktionellen Rezeptor essentiell. Dabei scheint die Länge des C-Terminus wichtiger zu sein, als eine spezifische Aminosäuresequenz. Vermutlich führen Verkürzungen des C-Terminus beim Rhodopsin zu strukturellen Veränderungen des Proteins und zur Retention im endoplasmatischen Retikulum (WEISS et al., 1994).

### **3.6. Ziel dieser Arbeit**

Angesichts der pharmakologischen Bedeutung der großen Familie der GPCR, ist das Wissen über den intrazellulären Transport der Rezeptoren noch unzureichend.

Für den V2-Rezeptor konnte gezeigt werden, dass ein Glutamat-Dileuzin-Motiv im proximalen C-Terminus essentiell für den Transport ist.

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob das Glutamat-Dileuzin-Motiv Teil einer größeren transportrelevanten Domäne ist. Ferner sollte endgültig die Frage beantwortet werden, ob diese Domäne ein Transportsignal darstellt, oder ob sie für den Rezeptor faltungsrelevant ist.