

5. ERGEBNISSE

Für einen effizienten Oberflächentransport des humanen Vasopressin V2 Rezeptors ist die Anwesenheit des proximalen C-Terminus notwendig. Trunkierungen am R337 und am L339 führen zu einer vollständigen Retention des Rezeptors im Zellinneren (SADEGHI et al., 1997, OKSCHE et al., 1998). Dagegen haben Trunkierungen des Proteins nach den Palmitoylierungsstellen einen geringen Effekt auf die Effizienz des Transport (OKSCHE et al., 1998). Abbildung 4 zeigt das Topologiemodell des V2-Rezeptors. Der transportrelevante Bereich des proximalen C-Terminus ist rot hervorgehoben. Das hydrophobe Phenylalanin F328 ist wahrscheinlich der Übergang zwischen der 7.TMD und dem cytoplasmatischen C-Terminus. Der proximale C-Terminus wird somit von 12 Aminosäuren gebildet und wird durch die beiden palmitoylierten Cysteine C341 und C342 begrenzt. Durch diese Verankerung wird eine 4. intrazelluläre Schleife ausgebildet. Innerhalb des proximalen C-Terminus konnten bereits transportrelevante Aminosäurereste identifiziert werden: die benachbarten Leuzine L339 und L340 und das vorgelagerte negativ geladene Glutamat E335 (SCHÜLEIN et. al., 1998).

Welche Bedeutung haben die anderen Aminosäuren des proximalen C-Terminus für die Faltung und den Transport des V2-Rezeptors, und wie groß ist der transportrelevante Bereich? Diese weiterhin noch offenen Fragen, versucht die vorliegende Arbeit zu beantworten.

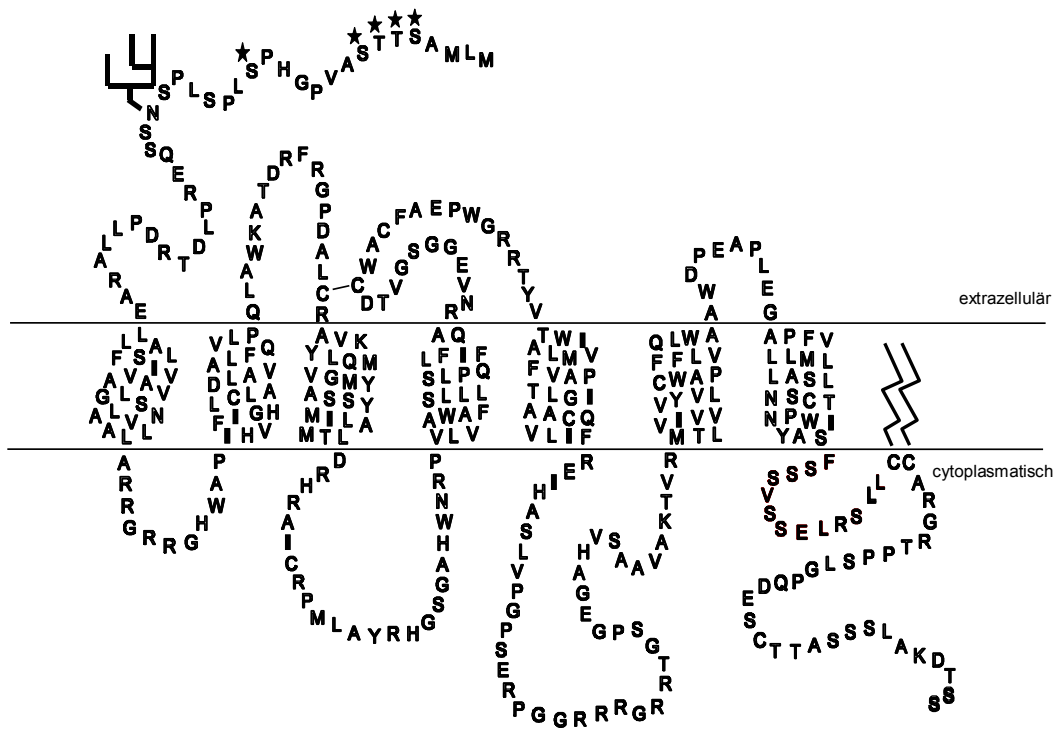


Abbildung 4: Zweidimensionales Topologiemodell des humanen V2-Rezeptors.

Der proximale C-Terminus ist rot hervorgehoben. Folgende posttranslationale Modifikationen sind gekennzeichnet: die N-Glykosylierung am Asparagin N22; potentielle O-Glykosylierungsstellen an den Serinen und Threoninen S5, T6, T7, S8 und S15; die Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen C112 und C192; Palmitoylierungen an den Cysteinen C341 und C342.

5.1. Herstellung eines anti-GFP-Antiserums zur spezifischen Präzipitation und Detektion des GFP-markierten V2-Rezeptors

In dieser Arbeit sollten V2-Rezeptoren als GFP-Fusionsproteine detektiert werden. Neben dem Nachweis der Fluoreszenzsignale, sollte auch ein biochemischer Nachweis mit Hilfe von Immuno-Blots erfolgen. Zu diesem Zweck musste zunächst ein polyklonales Antiserum gegen das GFP-Protein hergestellt werden. Hierfür wurde die gesamte kodierende Sequenz von GFP mit GST in dem

bakteriellen Expressionsvektor pGEX kloniert. Das Plasmid wurde von U. Vinkemaier, FMP, zur Verfügung gestellt. Das Fusionsprotein wurde in *E.coli* BL-21 exprimiert, mit Glutathion-Sepharose aus dem Zell-Lysat gereinigt und lyophilisiert. Mit dem gereinigten Protein wurden zwei Kaninchen immunisiert. Die Antiseren überschritten im ELISA-Test einen Antikörper-Titer von 1:200.000 und wurden wie folgt auf ihre Spezifität getestet.

5.1.1. Das polyklonale Kaninchen-anti-GFP-Antiserum erkennt spezifisch GFP-markierte V2-Rezeptoren im Western-Blot

HEK293-Zellen, die den wildtypischen, C-terminal mit GFP fusionierten V2-Rezeptor (V2R-GFP) stabil exprimieren, wurden in 60er-Schalen ausgesät. Die Gesamtmembranen wurden präpariert und mit *PNGaseF* verdaut. Dieses Enzym verdaut vollständig die N-Glykosylierungen eines Glykoproteins. Die Membranproteine wurden mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und auf einem Western-Blot mit unterschiedlichen Verdünnungen der beiden Antiseren inkubiert. Gebundene Antikörper wurden mit einem anti-Kaninchen-Peroxidase-IgG detektiert (siehe Abb. 5).

Beim unbehandelten wildtypischen V2-Rezeptor wurden mit beiden Antiseren zwei spezifische Banden nachgewiesen. Eine 60-65 kDa große Bande und eine 75-88 kDa große Bande. Die 75-88 kDa große Bande (*) repräsentiert den komplex glykosylierten V2R-GFP (siehe 5.3.3.). Bei komplex glykosylierten Proteinen handelt es sich um reife Proteine, die das ER verlassen haben und deren Glykosylierungen im medialen Golgi modifiziert und vervollständigt wurden. Die Bande zwischen 60-65 kDa (#) repräsentiert die kern- oder mannosereich-glykosylierten Rezeptoren, also Proteine, die sich noch im ER befinden (siehe 5.3.3.). Der *PNGaseF*-Verdau verringerte die apparente Masse der komplex glykosylierten Proteine auf ca. 70 kDa. Die verdauten Proteine werden nicht auf die unglykosylierte Größe von 60 kDa reduziert. Dies liegt an der zusätzlichen O-Glykosylierung des V2-Rezeptors (SADEGHI et al., 1999). Die mannosereich-glykosylierten Proteine werden dagegen durch den *PNGaseF*-Verdau auf die

unglykosylierte Größe von 60 kDa (>) reduziert, da die O-Glykosylierung im Golgi-Apparat stattfindet.

Das Antiserum 1 erkennt sowohl den komplex glykosylierten V2-Rezeptor als auch den unmodifizierten Rezeptor schon in der 1:2000 Verdünnung. Das Antiserum 2 ebenfalls, allerdings sind die Banden wesentlich schwächer gefärbt. Deutliche Banden sind hier bei gleicher Expositionszeit erst in der 1:500 Verdünnung erkennbar. Das Antiserum 1 ist daher für Western-Blot-Analysen des V2-Rezeptors wesentlich sensibler als das Antiserum 2.

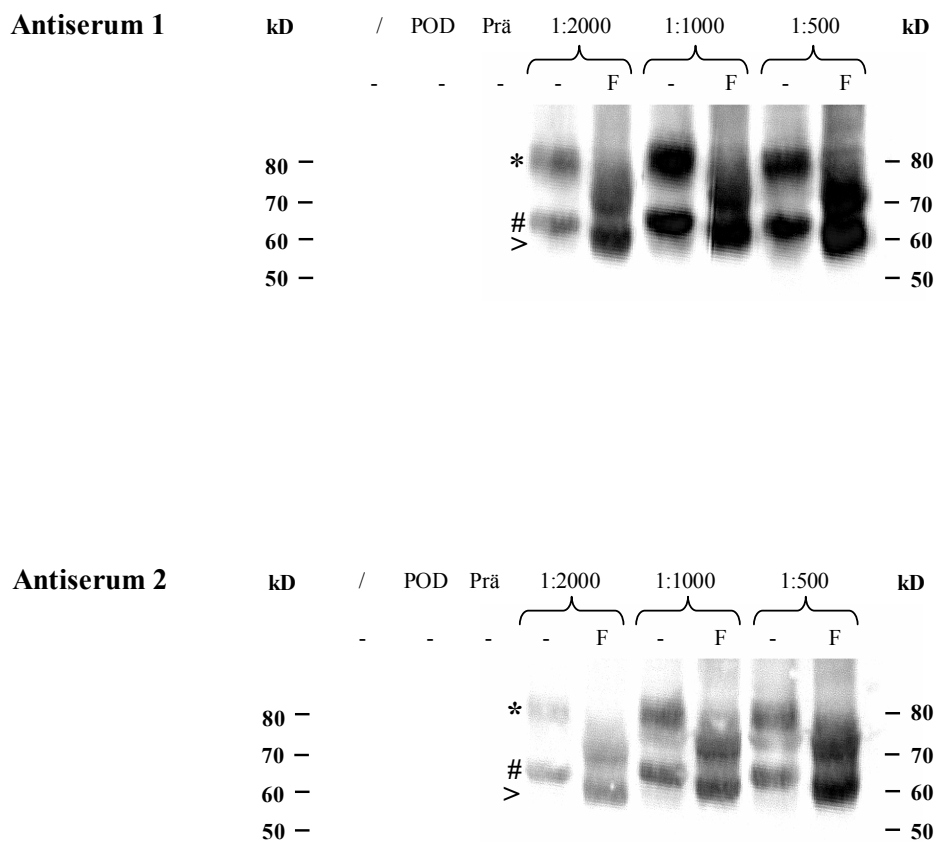


Abbildung 5: Das Kaninchen-anti-GFP-Antiserum erkennt spezifisch den V2-Rezeptor. Stabil transfizierte HEK293-Zellen, die ein V2R-GFP-Fusionsprotein exprimieren, wurden in 60er-Schalen ausgesät. Die Gesamtmembranen wurden präpariert und mit *PNGaseF* verdaut (F); unbehandelte Kontrolle = (-). Die SDS-PAGE und Immuno-Blot-Analyse erfolgte mit je 50 µg Protein der Membranpräparationen. Der Western-Blot wurde mit unterschiedlichen Verdünnungen der beiden Antiseren inkubiert (1:2000, 1:1000, 1:500). Gebundene Antikörper wurden mit Peroxidase konjugiertem Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper detektiert. Als Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen (/); nur der Zweit-Antikörper (POD) und das Präimmunserum (Prä) eingesetzt.

* = komplex glykosyliert; # = kern-glykosyliert; > = unmodifiziert

5.1.2. Das polyklonale Kaninchen-anti-GFP-Antiserum präzipitiert spezifisch V2R-GFP-Fusionsproteine

Bisher gab es keinen anti-GFP-Antikörper, der GFP-Fusionsproteine präzipitieren kann. Für zukünftige Arbeiten sollte getestet werden, ob die gewonnenen Antiseren hierfür geeignet sind. Um dies zu überprüfen, wurden HEK293-Zellen, die stabil V2R-GFP-Fusionsproteine exprimieren, in 60er-Schalen ausgesät. Die Zellen wurden lysiert und mit unterschiedlichen Mengen des an Protein-A-Sepharose immobilisierten Antiserums 1 bzw. 2 inkubiert. Die Präzipitate wurden mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und die präzipitierten V2R-GFP-Fusionsproteine auf einem Immuno-Blot mit einem kommerziell erhältlichen monoklonalen Anti-GFP-Antikörper detektiert (siehe Abb. 6).

Beide Antiseren präzipitieren spezifisch den GFP-markierten komplex glykosylierten V2-Rezeptor (75-88 kDa; (*)). Erstaunlicherweise präzipitieren beide Seren nicht den kern-glykosylierten Rezeptor. Möglicherweise lässt der Faltungszustand, den das GFP-Fusionsprotein im ER hat, keine Bindung der entsprechenden Antikörper zu.

Wenn man bei der Präzipitation das Antigen GST-GFP im Überschuss dazugibt, verschwindet die Bande des GFP-markierten V2-Rezeptors. Unter diesen Bedingungen wird der V2R-GFP verdrängt und stattdessen das Antigen präzipitiert (Bande bei ca. 52 kDa (#)). Bei der Präzipitation mit nicht transfizierten Zellen erscheint im Immunoblot eine scharfe Bande knapp unter 60 kDa. Diese Bande ist nicht zu erklären, da sie bei den transfizierten Zellen nicht zu sehen ist. Es kann sich somit nicht um die unspezifische Präzipitation eines Proteins aus dem Zelllysate handeln.

Zusammengefasst erkennen beide Antiseren den GFP-markierten V2-Rezeptor im nativen und im denaturierten Zustand sehr gut, dabei ist das Antiserum 1 sensitiver als das Antiserum 2. Damit steht für zukünftige Arbeiten erstmals ein GFP-Antikörper zu Verfügung, der für die Immunpräzipitation geeignet ist.

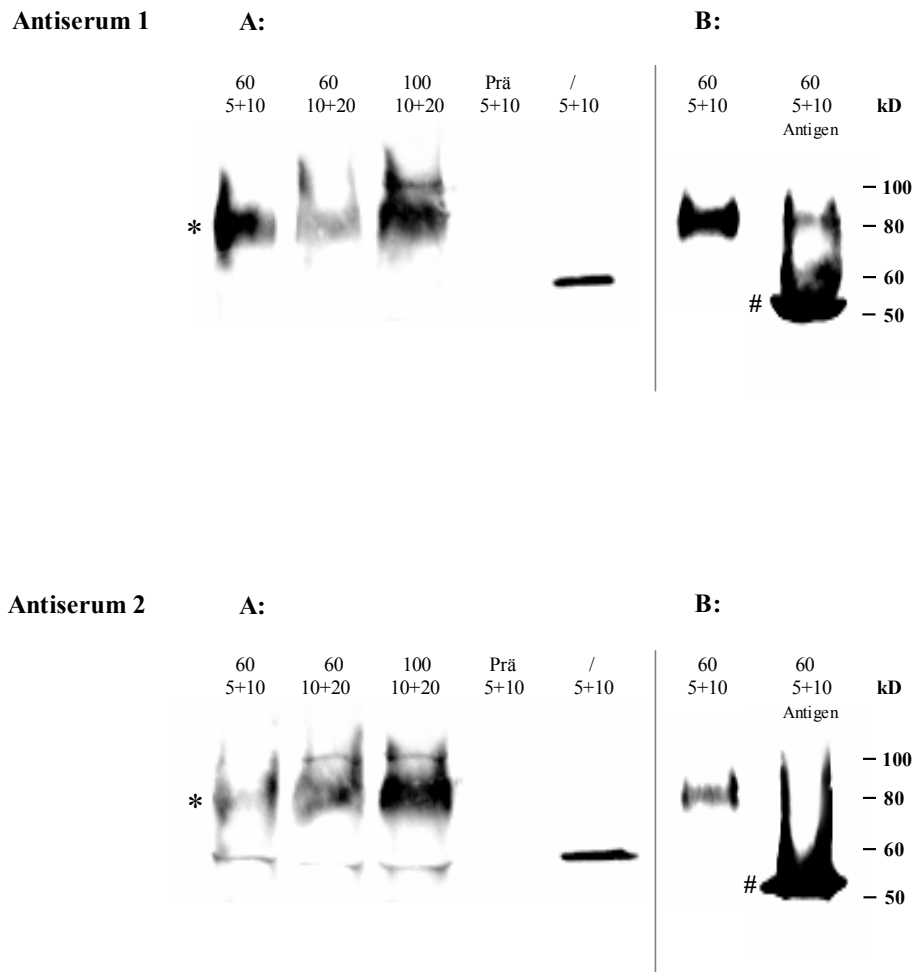


Abbildung 6: Das polyklonale Kaninchen-anti-GFP-Antiserum präzipitiert spezifisch den GFP-markierten V2-Rezeptor. **A:** Stabil transfizierte HEK293-Zellen wurden in 60er- oder 100er Schalen ausgesät (60, 100). Die Zellen wurden lysiert und die Zelltrümmer abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit unterschiedlichen Mengen an Protein-A-Sepharose immobilisiertem Antiserum 1 bzw. 2 inkubiert (5 µl Sepharose + 10 µl Antiserum = 5+10; 10 µl Sepharose + 20 µl Antiserum = 10+20). Die Präzipitate wurden auf einem Immuno-Blot mit einem monoklonalem Maus-anti-GFP-Antikörper und mit Peroxidase konjugiertem Ziege-anti-Maus-IgG detektiert. Als Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen (/) und das Präimmunserum (Prä) eingesetzt. **B:** Zusätzlich wurde in einem parallelen Ansatz 1 µg des Fusionsprotein GST-GFP zugegeben (Antigen).
* = komplex glykosyliert; # = GST-GFP (Antigen)

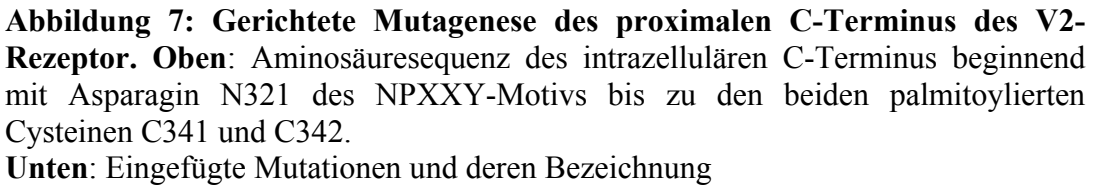
5.2. Die Serine S330, S331, S333, S334 und S338 des proximalen C-Terminus haben keinen Einfluss auf den Transport des V2-Rezeptors zur Plasmamembran.

5.2.1. Gerichtete Mutagenese des proximalen C-Terminus

Um die Bedeutung der einzelnen Aminosäuren des proximalen C-Terminus für den Transport zu untersuchen, wurden diese durch gerichtete Mutagenese ersetzt und in ihrem Transportverhalten untersucht. Die Serine S329, S330, S331, S333, S334 und S338 wurden gegen die ähnlich große Aminosäure Alanin ausgetauscht. Die hydrophoben Aminosäuren F328, V332 und L336 wurden durch die hydrophile Aminosäure Threonin ersetzt (siehe Abb. 7).

Für die gerichteten Mutagenesen wurde experimentell wie folgt vorgegangen: Die wildtypische V2-Rezeptor c-DNA lag als BamHI/XbaI-Fragment im eukaryontischen Expressionsvektor pcDNAI.Neo (Invitrogen®) vor. Dieses Plasmid kodiert den wildtypischen Vasopressin V2-Rezeptor (pRCDN2, SCHÜLEIN et al., 1996). Alle Mutagenesen wurden mit dem QuikChange™ Mutagenesis System durchgeführt. Die hierfür benutzten Oligonukleotide waren PF328A, PS329A, PS330A, PS331A, PV332T, PS333A, PS334A, PL336T, PS338A (siehe 4.1.3.3.). Die eingeführten Mutationen wurden durch Sequenzierungen der cDNA bestätigt. Es entstanden folgende Plasmide: pF328T, pS329A, pS330A, pS331A, pV332T, pS333A, pS334A, pL336T und pS338A.

Um die Rezeptormutanten C-terminal mit dem GFP-Protein zu fusionieren, wurde die V2R-cDNA mit den beschriebenen Mutationen als EcoRI/HindIII-Fragment in den Expressionsvektor pEGFPN1 kloniert. Die entstandenen Plasmide waren: pEU367.GFP, pF328T.GFP, pS329A.GFP, pS330A.GFP, pS331A.GFP, pV332T.GFP, pS333A.GFP, pS334A.GFP, pL336T.GFP und pS338A.GFP



Die gehäuft auftretenden Serine im proximalen C-Terminus stellen potentielle Phosphorylierungsstellen dar. Um die Bedeutung der einzelnen Serine für den Transport zu untersuchen, wurde die Fähigkeit der einzelnen Rezeptormutanten den Radioliganden [³H]AVP zu binden, in intakten, transient transfizierten COS.1-Zellen untersucht. Die Zellen wurden in 24 mm well-Platten ausgesät und mit den Plasmiden pRCDN2, pS330A, pS331A, pS333A, pS334A und pS338A transient transfiziert. Eine Verringerung der [³H]AVP-Bindung im Sättigungsbereich der Bindungskurve weist auf einen Transportdefekt hin, wenn der

K_D -Wert des Rezeptors und damit die Affinität des Rezeptors zu seinem Liganden unverändert gegenüber dem wildtypischen Rezeptor ist. Normalerweise gibt man den Sättigungswert einer Bindungskurve als $B_{\max}$ -Wert an. In dieser Arbeit wurden viele Mutanten untersucht und miteinander verglichen. Dies war aus methodischen Gründen nicht parallel in einem Versuch möglich. Deshalb werden hier keine absoluten Werte angegeben, sondern die spezifische Bindung von [^3H]AVP in Prozent zur jeweiligen Wildtypkontrolle im Experiment. Dadurch werden Schwankungen in der Transfektionsrate und damit in der Expression der Rezeptoren ausgeglichen.

Abb. 8 zeigt jeweils unten, dass der Austausch der Serine S330A, S331A, S333A, S334A und S338A die K_D -Werte der einzelnen Mutanten gegenüber dem wildtypischen Rezeptor nicht wesentlich verändert (WT: 2,80 nM, S330A: 7,25 nM, S331A: 2,60 nM, S333A: 1,76 nM, S334A: 1,39 nM, S338A: 4,20 nM), d.h. die Mutationen der Serine des proximalen C-Terminus führen beim V2-Rezeptor nicht zu einer Veränderung in der Ligandenaffinität. Daher korreliert die jeweils beobachtete [^3H]AVP-Bindung in der Sättigung mit dem intrazellulären Transport. Die relative Zahl der bindungsfähigen Rezeptoren war nach dem Austausch von S330A, S331A, S333A, S334A und S338A nicht verringert. Man kann daraus folgern, dass diese Serine des proximalen C-Terminus keine Rolle für den Transport des Rezeptors an die Oberfläche spielen.

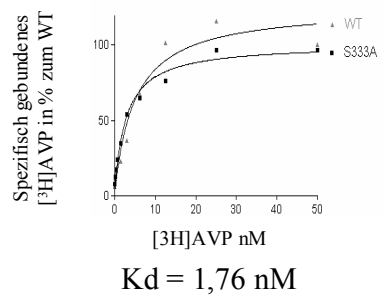
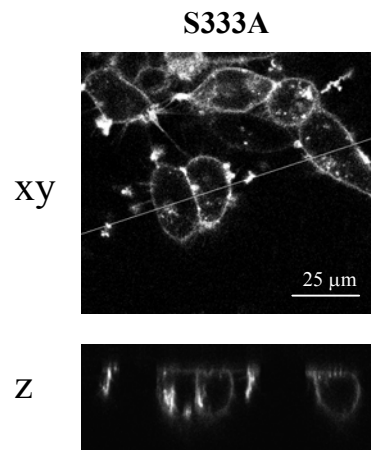
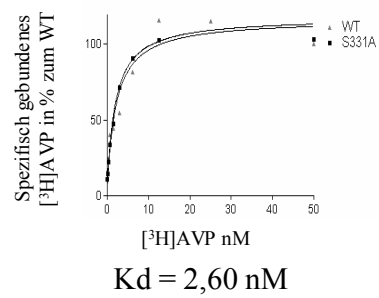
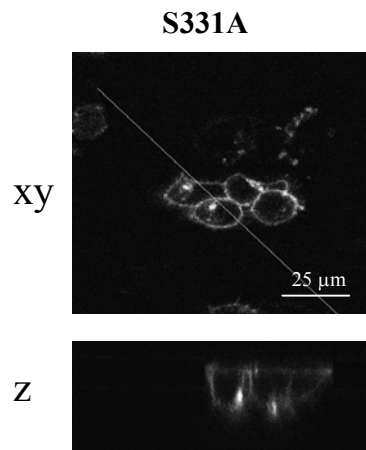
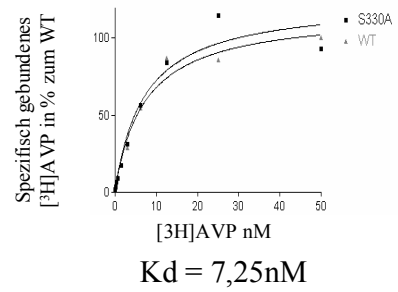
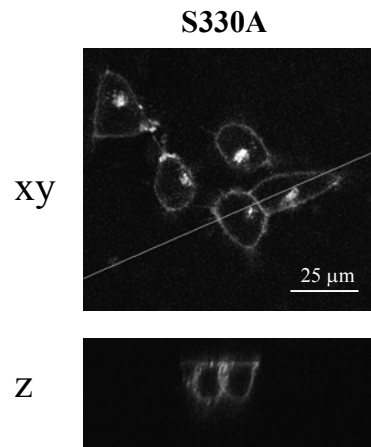
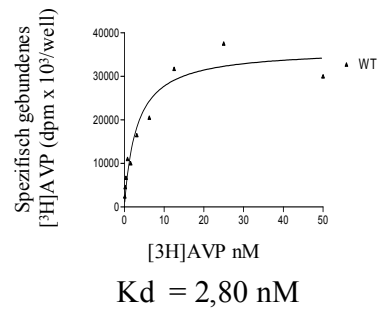
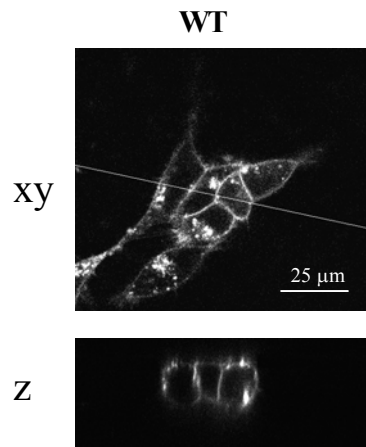
5.2.3. Lokalisation der GFP-markierten V2-Rezeptormutanten in HEK293-Zellen

Um die Ergebnisse der Bindungsstudien zu bestätigen, wurden die Rezeptormutanten am C-terminalen Ende mit GFP fusioniert und mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie innerhalb der Zelle lokalisiert. Der GFP-markierte V2-Rezeptor wurde bereits in früheren Arbeiten pharmakologisch charakterisiert. Die Fusion des Rezeptors mit GFP führt zu keiner Änderung der pharmakologischen Eigenschaften des Rezeptors (HERMOSILLA, 2000).

Für die Lokalisation der GFP-Fluoreszenzsignale wurden HEK293-Zellen in 35 mm Schalen auf Deckgläser gesät und mit den Plasmiden pEU367.GFP, pS330A.GFP, pS331A.GFP, pS333A.GFP, pS334A.GFP und pS338A.GFP transient transfiziert. Die GFP-Fluoreszenzsignale wurden mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie (LSM) detektiert. Für die mikroskopischen Aufnahmen wurden im Gegensatz zu den Bindungsexperimenten HEK293-Zellen verwendet, die für die Mikroskopie wesentlich besser geeignet sind. (COS.1-Zellen sind aufgrund ihrer Adhärenz sehr gut für Bindungsexperimente geeignet, bilden aber viele Einschlüsse innerhalb der Zellen, die die Mikroskopie stören.) Die pharmakologischen Eigenschaften des V2-Rezeptors sind in beiden Zelltypen gleich (K_D -Werte in [^3H]-AVP-Bindungsassays; EC_{50} -Wert in der Adenylylzyklase-Aktivitätsmessung, Daten nicht gezeigt).

Bei der Lokalisation im LSM zeigt der wildtypische V2-Rezeptor vorwiegend membranständige Fluoreszenzsignale (siehe Abb. 8, jeweils oben), d.h. er wird erwartungsgemäß an die Oberfläche transportiert. Gleichzeitig finden sich auch Signale im Inneren der Zelle. Diese Signale sind wahrscheinlich Rezeptoren auf dem Weg vom endoplasmatischen Retikulum an die Oberfläche.

Die Serinmutanten S330A, S331A, S333A, S334A und S338A zeigen wie der Wildtyp eine vorwiegend membranständige Fluoreszenz. Die mikroskopischen Daten zeigen, dass die Serine S330, S331, S333, S334 und S338 keinen Einfluss auf das Transportverhalten des V2-Rezeptors haben und bestätigen damit die Ergebnisse der Bindungsstudien.



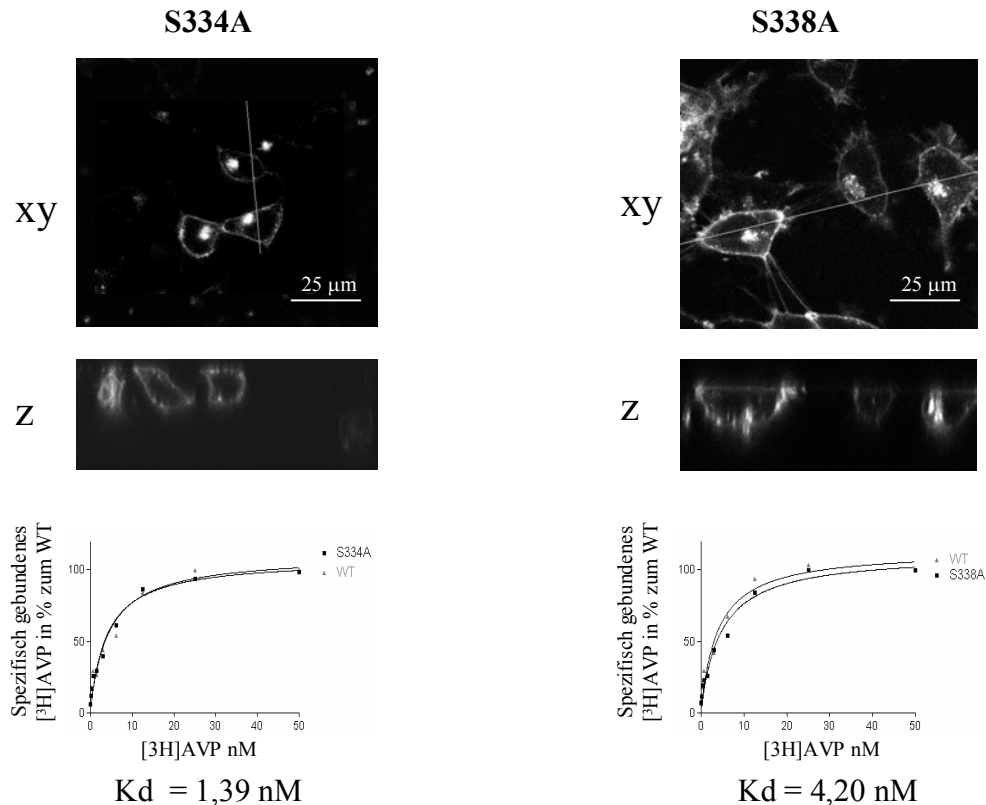


Abbildung 8: jeweils oben: Lokalisation von GFP-markierten V2-Rezeptoren in lebenden, transient transfizierten HEK293-Zellen mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie (LSM). HEK293-Zellen wurden in 35 mm Schalen auf Deckgläser ausgesät und mit folgenden Plasmiden transient transfiziert: pEU367.GFP, pS330A.GFP, pS331A.GFP, pS333A.GFP, pS334A.GFP und pS338A.GFP. Die Bilder zeigen oben x/y-Scans (xy) und unten z-Scans (z) der Zellen. Maßstab: 25 μ m

jeweils unten: Spezifische Bindung von [3 H]AVP an intakten, transient transfizierten COS1-Zellen. COS.1-Zellen wurden in 24 mm well-Platten ausgesät und mit den Plasmiden pRCDN2, pS330A, pS331A, pS333A, pS334A und pS338A transfiziert. Anschließend wurden Bindungsexperimente mit [3 H]AVP durchgeführt. Die K_D -Werte wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism (Version 3.00) berechnet. Die Datenpunkte entsprechen Mittelwerte von Duplikaten und sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

5.3. Die hydrophoben Aminosäuren F328, V332 und L336, sowie das Serin 329 des proximalen C-Terminus sind für den effizienten Transport des V2-Rezeptors zur Plasmamembran notwendig

5.3.1. Bindungsstudien an intakten COS.1-Zellen

Im proximalen C-Terminus spielen die beiden hydrophoben Aminosäuren Leuzin 339 und Leuzin 340 für den Transport des Gesamt Rezeptors eine wichtige Rolle (SCHÜLEIN et al., 1998). Um zu untersuchen, ob diese Reste Teil einer größeren hydrophoben Domäne sind, sollte die Bedeutung der anderen hydrophoben Aminosäuren F328, V332 und L336 des proximalen C-Terminus für den intrazellulären Transport untersucht werden. Ferner sollte die Transportrelevanz von S329 untersucht werden, da diese Position wahrscheinlich die Austrittsstelle der 7.TMD ist und dort strukturell relevant sein könnte. Die hydrophoben Reste wurden, wie unter 5.2.1. beschrieben, durch polare Threonine ersetzt. S329 wurde wie die anderen Serine gegen ein Alanin ausgetauscht. Die Rezeptormutanten wurden anschließend wieder auf ihr Transportverhalten untersucht.

Die Fähigkeit der einzelnen Mutanten ihren Liganden zu binden, wurde in transient transfizierten COS.1-Zellen untersucht. Die Zellen wurden in 24 mm well-Platten ausgesät und mit den Plasmiden pF328T, pS329A, pV332T und pL336T transient transfiziert. Anschließend wurden Bindungsexperimente mit [³H]AVP mit den intakten Zellen durchgeführt (siehe Abb. 9) (siehe auch 5.2.2.).

Der Austausch von F328T verringert ebenso wie der Austausch von L336T die spezifische Bindung von [³H]AVP in der Sättigung um ca. 90% im Vergleich zum WT. Diese beiden Reste spielen damit eine ebenso große Rolle für den Transport des V2-Rezeptors, wie das zuvor beschriebene L339 (SCHÜLEIN et al., 1998). Der Austausch von V332T führt zu einer Verringerung der spezifischen Bindung um ca. 50%, der Austausch von S329A zu einer Verringerung um ca. 70% im Vergleich zum WT. Die K_D-Werte aller hier beschriebenen Mutanten ähnelten dem K_D-Wert des wildtypischen Rezeptors (WT: 2,80 nM; F328T: 3,36 nM;

S329A: 2,62 nM; V332T: 2,06 nM; L336T: 2,21 nM) (siehe Abb. 9, unten). Diese Daten zeigen, dass die beobachteten Bindungsdefekte der Rezeptormutanten tatsächlich auf Transportdefekte zurückzuführen sind.

5.3.2. Lokalisation der GFP-markierten V2-Rezeptormutanten in HEK293-Zellen

Um die Expression der Mutanten zu überprüfen und um die Bindungsstudien zu bestätigen, wurden die entsprechenden GFP-markierten Mutanten wieder mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie innerhalb der Zelle lokalisiert (siehe auch 5.2.3.). Hierfür wurden HEK293-Zellen in 35 mm Schalen auf Deckgläsern ausgesät und mit den Plasmiden pF328T.GFP, pS329A.GFP, pV332T.GFP und pL336T.GFP transient transfiziert.

Für die Rezeptor-Mutanten F328T und L336T wurden überwiegend diffus verteilte Fluoreszenzsignale innerhalb der Zelle detektiert (siehe Abb. 9, oben). Diese Rezeptormutanten werden also in der Zelle retiniert. Die mikroskopischen Aufnahmen unterstützen somit die Ergebnisse der Bindungsstudien.

Die Mutanten V332T und S329A, zeigen neben intrazellulären Fluoreszenzsignalen auch membranständige Fluoreszenzsignale. Die Bindungsstudien zeigten bei V332T eine Reduzierung der spezifischen Bindung in der Sättigung für [³H]AVP um ca. 50% im Vergleich zum WT (S329A: 70%). Die mikroskopischen Aufnahmen bestätigen hier ebenfalls die Ergebnisse der Bindungsstudien: Die Mutanten S329A und V332T werden zur Plasmamembran transportiert, aber mit einer geringeren Effizienz als der wildtypische Rezeptor.

Zusammengefasst zeigen die Daten, dass die Rezeptormutanten S329A, F328T, V332T und L336T fast vollständig (F328T und L336T) oder teilweise (S329A und V332T) in der Zelle retiniert werden.

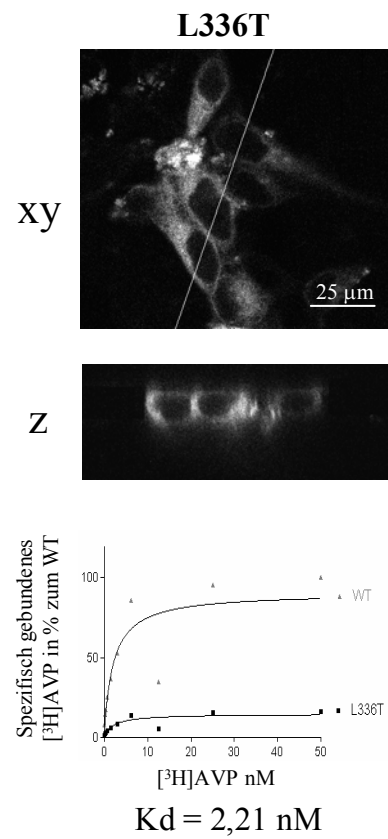
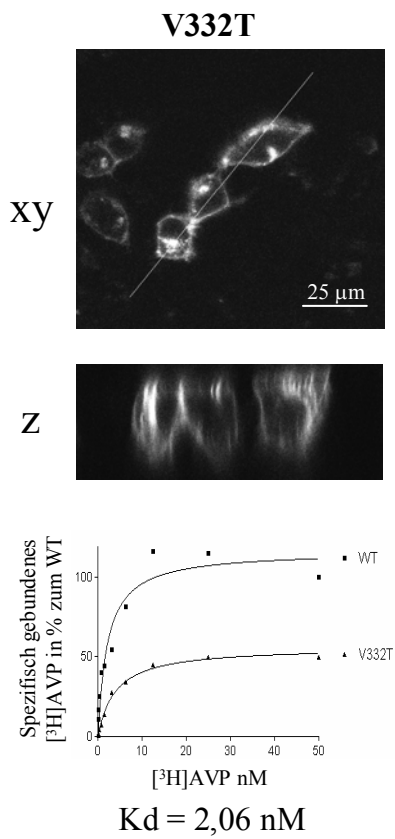
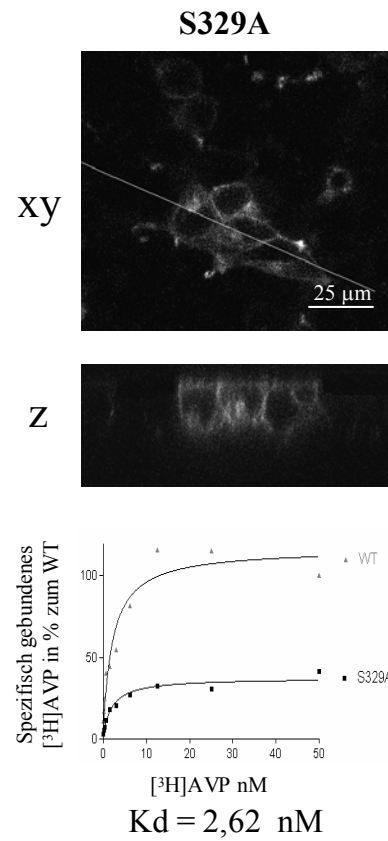
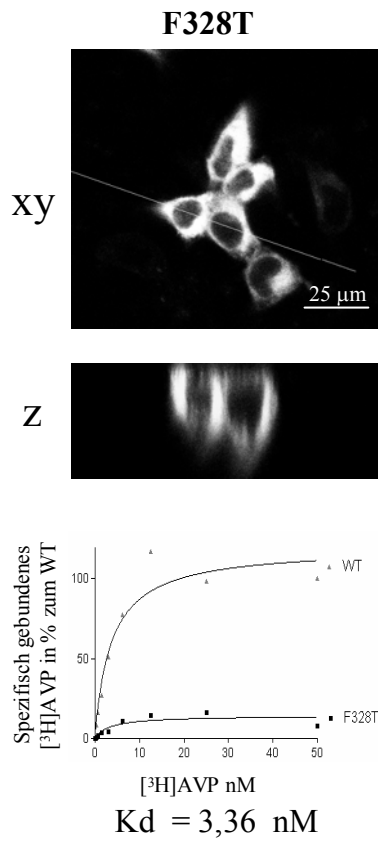


Abbildung 9: jeweils oben: Lokalisation von GFP-markierten V2-Rezeptormutanten in lebenden, transient transfizierten HEK293-Zellen mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie (LSM). HEK293-Zellen wurden in 35 mm Schalen auf Deckgläser gesät und mit den Plasmiden pF328T.GFP, pS329A.GFP, pV332T.GFP und pL336T.GFP transient transfiziert. Die Bilder zeigen oben x/y-Scans (xy) und unten z-Scans (z) der Zellen. Maßstab: 25 µm.

jeweils unten: Spezifische Bindung von [³H]AVP an transient transfizierten COS.1-Zellen. COS.1-Zellen wurden in 24 mm well-Platten ausgesät und mit den Plasmiden pF328T, pS329A, pV332T und pL336T transient transfiziert. Anschließend wurden Bindungsexperimente mit [³H]AVP durchgeführt. Die K_D-Werte wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism (Version 3.00) berechnet. Die Datenpunkte entsprechen Mittelwerte von Duplikaten und sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente, (Bindungskurve von F328T mit n = 2).

5.3.3. Analyse des Glykosylierungsstatus der GFP-markierten V2-Rezeptormutanten in HEK293-Zellen

Um die Lokalisation der Rezeptormutanten biochemisch zu untersuchen, wurde der Glykosylierungsstatus der transportdefekten Mutanten untersucht. Der V2-Rezeptor wird am Asparagin 22 glykosyliert (INNAMORATI et al., 1996). N-Glykosylierungen sind posttranslationale Modifikationen, die während der Reifung und des Transportes des Rezeptors stattfinden. Die ersten Schritte zum mannosereichen Glykan erfolgen im endoplasmatischen Retikulum und sind Bestandteil der Qualitätskontrolle. Die vollständige oder komplexe Glykosylierung findet erst im Golgi-Apparat statt. Die mannosereichen Glykosylierungen der ER-Formen können mit dem Enzym *EndoH* vollständig verdaut werden. Komplexe Glykosylierungen sind dagegen *EndoH*-resistent. Das Enzym *PNGaseF* verdaut sowohl mannosereiche als auch komplexe N-Glykosylierungen vollständig.

Zur Untersuchung des Glykosylierungsstatus der Rezeptormutanten wurden HEK293-Zellen in 60 mm Schalen mit den Plasmiden pEU367.GFP, pS338A.GFP, pL336T.GFP, pV332T.GFP und pL62P.GFP transient transfiziert. Da die Ergebnisse der Bindungsstudien und der mikroskopischen Aufnahmen nur bestätigt werden sollten, wurde nur eine Auswahl von Mutanten untersucht: S338A, die keinen Transportdefekt zeigt, die nahezu vollständig transportdefekte Mutante L336T und die zu ca. 50% transportdefekte Mutante V332T. Der wildtypische

Rezeptor diene als Positivkontrolle und die L62P-Mutante als Negativkontrolle für den ER-Export (Mutante L62P als transportdefekt beschrieben bei KRAUSE et al., 2000). Von den Zellen wurden die Gesamtmembranen isoliert und mit *EndoH* und *PNGaseF* behandelt. Die Fusionsproteine wurden im Western-Blot mit anti-GFP-Antiserum und [¹²⁵I]-markierten Esel-anti-Kaninchen-IgG detektiert (siehe Abb. 10).

Beim unbehandelten wildtypischen V2-Rezeptor wurde die 60-65 kDa große mannosereiche Form (#) und die 75-88 kDa große komplex glykosylierte Form (*) detektiert (siehe auch 5.1.1.). Nach *EndoH*-Behandlung wird die 60-65 kDa große Bande zu einer 60 kDa großen Bande, dem unmodifizierten Protein (>), reduziert. Die komplex glykosylierte Bande ist *EndoH*-resistent. Der *PNGaseF*-Verdau reduziert die komplex glykosylierte 75-88 kDa große Bande zu einer 70 kDa großen Bande, der O-glykosylierten Form des Rezeptors (SADEGHI et al., 1999).

Die transportkompetente Mutante S338A zeigt sehr ähnliche Banden wie der wildtypische Rezeptor. Die Mutante L336T zeigt dagegen eine dickere mannosereiche Bande und nur eine sehr schwache Bande auf der Höhe des komplex-glykosylierten Proteins. Dieses Verhältnis korreliert mit den Ergebnissen der Bindungsstudien und den mikroskopischen Untersuchungen.

Bei der V332T-Mutante zeigt das Verhältnis von komplex-glykosyliertem Protein zur unreifen mannosereichen Form, dass diese Position einen geringen Einfluss auf den Oberflächentransport hat. Die L62P-Mutante wird vollständig im endoplasmatischen Retikulum retiniert und zeigt keinerlei komplexe Glykosylierung. Diese Daten unterstützen die Bindungsexperimente und die LSM-Experimente. Sie zeigen, dass die Retention der Mutanten auf ER-Ebene stattfindet und somit die transportdefekten Rezeptoren höchstwahrscheinlich vom Qualitätskontrollsystem erkannt und zurückgehalten werden.

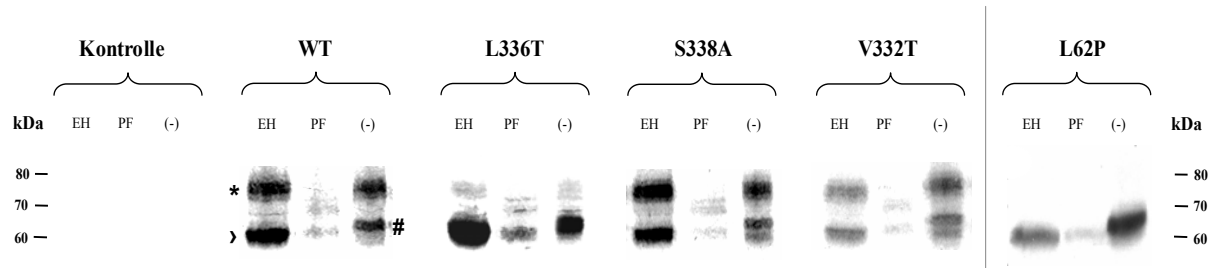


Abbildung 10: Analyse des Glykosylierungsstatus der GFP-markierten V2-Rezeptormutanten. HEK293-Zellen wurden in 60 mm Schalen ausgesät und mit den Plasmiden pEU367.GFP, pS338A.GFP, pL336T.GFP, pV332T.GFP und pL62P.GFP transient transfiziert. Die Gesamtmembranen wurden isoliert und mit *EndoH* und *PNGaseF* behandelt. Je 50 µg Protein wurde per SDS-PAGE aufgetrennt. Die Fusionsproteine wurden im Western-Blot mit polyklonalem Kaninchen-anti-GFP-Antiserum und [¹²⁵I]-markierten Esel-anti-Kaninchen-IgG detektiert. Als Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen (Kontrolle), der wildtypische Rezeptor (WT), die transportkompetente Mutante S338A und die vollständig im ER retinierte L62P-Mutante verwendet.

EH = *EndoH*, PF = *PNGaseF*, (-) = unverdaut

* = komplex-glykosyliert, > = unmodifiziert, # = kern-glykosyliert

5.3.4. Lokalisation der GFP-markierten Rezeptormutanten in HEK293-Zellen im LSM mit Hilfe der Rhodamin 6G-Färbung

Eine weitere Möglichkeit, GFP-Fusionsproteine innerhalb von lebenden Zellen genauer zu lokalisieren, ist die Kolokalisation der Fluoreszenzsignale mit angefärbten Zellstrukturen. Die ER-Lokalisation eines Proteins kann mit Rhodamin 6G gezeigt werden: Rhodamin 6G färbt zunächst Mitochondrien und dann nach weiterer Verteilung das ER. Eine Kolokalisation der Rhodamin-Fluoreszenz mit Rezeptor-GFP-Signalen weist dann auf eine ER-Retention der entsprechenden

Mutanten hin. Für die Kolokalisations-Experimente wurde die gleiche Auswahl an Mutanten wie bei den Glykosylierungsstudien verwendet: die transportkompetente Mutante S338A, die nahezu vollständig transportdefekte Mutante L336T und die zu ca. 50% transportdefekte Mutante V332T. Der wildtypische Rezeptor und die L62P-Mutante dienten wiederum als Positiv-, bzw. Negativkontrolle für den ER-Export.

HEK293-Zellen wurden in 35 mm Schalen auf Deckgläsern ausgesät. Die Zellen wurden mit den Plasmiden pEU367.GFP, pS338A.GFP, pL336T.GFP, pV332T.GFP und pL62P.GFP transient transfiziert und die GFP-Fluoreszenz mit Hilfe des LSM lokalisiert (siehe Abb. 11, links). Nach Aufnahme der GFP-Fluoreszenz wurden dieselben Zellen mit Rhodamin 6G angefärbt und die Rhodamin-Fluoreszenz auf einem zweiten Kanal in Rot aufgenommen (siehe Abb. 11, Mitte). Eine Überlagerung der beiden Bilder zeigt bei einer Kolokalisation der beiden Fluoreszenzen gelbe oder orange Signale (siehe Abb. 11, rechts).

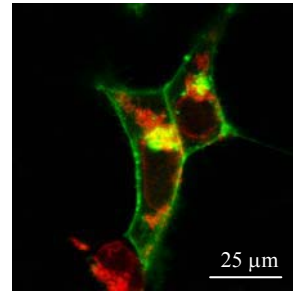
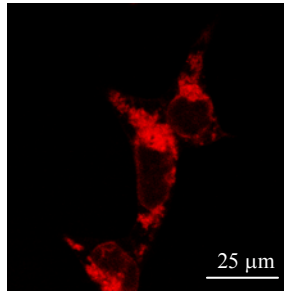
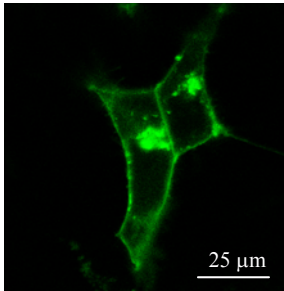
Die GFP-Fluoreszenzsignale sind beim wildtypischen Rezeptor, sowie der S338A-Mutante sowohl an der Plasmamembran als auch in der Zelle detektierbar. Bei der computergestützten Überlagerung der GFP-Fluoreszenzsignale und der Rhodamin 6G-Fluoreszenzen, rechts in der Abbildung, zeigen sich beim WT und der S338A-Mutante nur wenige Überlagerungen. Diese sind wahrscheinlich auf Transportintermediate zurückzuführen.

Die Mutante L336T zeigt wie die Negativkontrollmutante L62P ausschließlich intrazelluläre GFP-Signale, die fast vollständig mit den Rhodamin 6G-Signalen kolokalisieren.

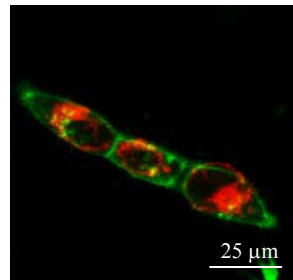
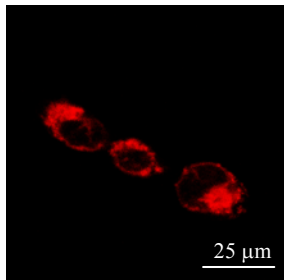
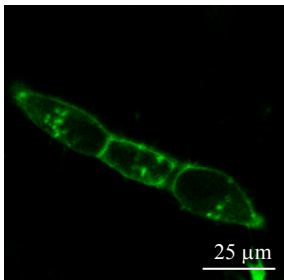
Die Mutante V332T, die in den Bindungsstudien eine um 50% reduzierte [³H]AVP-Bindung an der Oberfläche aufweist, zeigt im Vergleich zum WT schwächere GFP-Signale an der Plasmamembran und stärkere intrazelluläre GFP-Signale, die mit der Rhodamin 6G-Fluoreszenz kolokalisieren.

Die Rhodamin 6G Färbungen bestätigen damit die biochemischen Experimente. Die Mutante S338A wird wie der WT transportiert, die L336T-Mutante wird vollständig und die V332T-Mutante teilweise im ER retiniert.

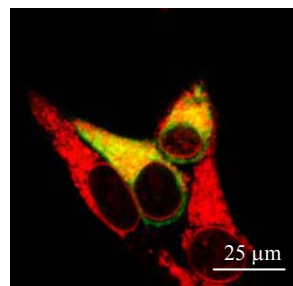
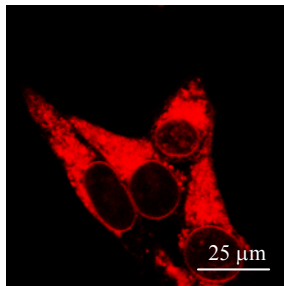
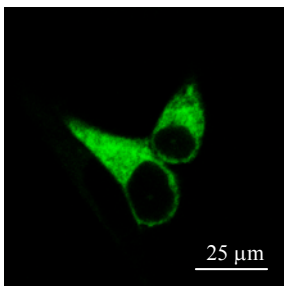
WT



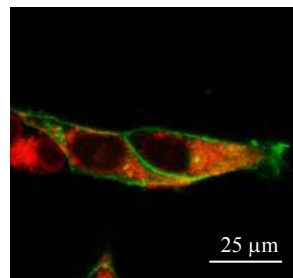
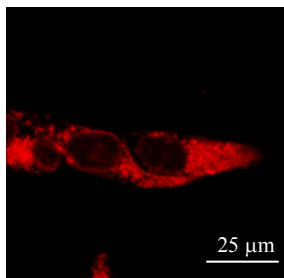
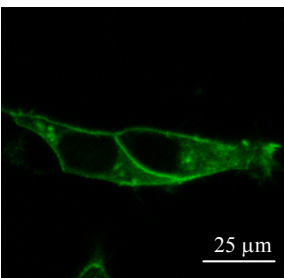
S338A



L336T



V332T



L62P

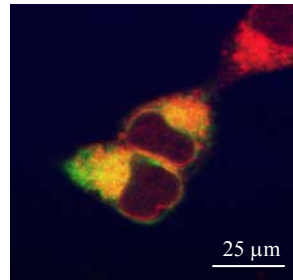
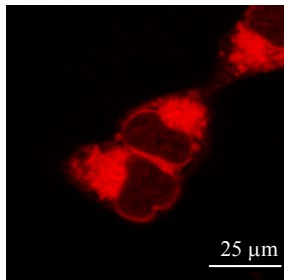
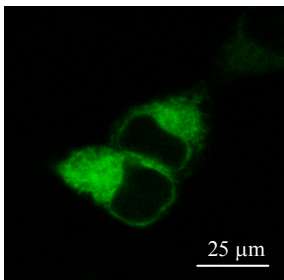


Abbildung 11: Lokalisation von GFP-markierten V2-Rezeptormutanten im ER von lebenden, transient transfizierten HEK293-Zellen. Auf Deckgläsern gewachsene HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden pEU367.GFP, pS338A.GFP, pL336T.GFP, pV332T.GFP und pL62P.GFP transient transfiziert. Die Bilder zeigen die x/y-Scans der Zellen. **Links:** Die GFP-Fluoreszenzen der Rezeptoren sind grün dargestellt. **Mitte:** Nach Aufnahme der GFP-Fluoreszenzen wurde das ER derselben Zellen mit Rhodamin 6G angefärbt und die Fluoreszenzen auf einem anderen Kanal aufgenommen. Die Rhodamin 6G-Signale sind rot dargestellt. **Rechts:** Computergestützte Überlagerung der linken und mittleren Bilder. Eine gelbe Färbung zeigt Kolokalisation an, d.h. die Rezeptoren, die im ER retiniert werden. Maßstab: 25 µm.

5.4. Der proximale C-Terminus ist in einem verkürzten Transportsystem, das unabhängig von der Gesamtrezeptorfaltung ist, nicht transportrelevant

Die bisher gezeigten Daten zeigen, dass die hydrophoben Aminosäuren F328, V332 und L336, sowie das S329 einen Einfluss auf den Oberflächentransport haben. Mutanten an diesen Positionen werden mehr oder weniger stark im ER retiniert. Dieser negative Einfluss der Mutationen auf den Transport kann mehrere Ursachen haben.

Zum einen kann durch die Mutation ein Transportsignal zerstört worden sein. Ein Transportsignal sollte definitionsgemäß unabhängig von der Gesamtproteinfaltung und auf andere Proteine übertragbar sein.

Die Mutationen könnten aber auch zu Faltungsdefekten geführt haben. Nicht korrekt gefaltete Rezeptoren würden vom Qualitätskontrollsystem des endoplasmatischen Retikulums erkannt und retiniert werden.

Die bisherigen Ergebnisse liefern keine Aussage darüber, ob die untersuchten transportrelevanten Aminosäuren F328, S329, V332 und L336 des proximalen C-Terminus Teil eines Transportsignals oder faltungsrelevant sind. Um

diese Unterscheidung zu ermöglichen, wurde ein verkürztes Rezeptorfragment konstruiert, das die Gesamtfaltung eines 7TMD-Proteins umgeht (siehe Abb. 12). Dieses Konstrukt besteht aus dem N-Terminus, der 1.TMD, der 1.IZS und dem C-Terminus des V2-Rezeptors. Zur Detektion wurde dieses Konstrukt C-terminal mit GFP fusioniert. Frühere Daten zeigen, dass dieses Rezeptorfragment in HEK293-Zellen exprimiert und an die Oberfläche transportiert wird (SCHÜLEIN et al., 1998). Sollten die bisher untersuchten Reste Teil eines Transportsignals sein, sollten die Mutationen im proximalen C-Terminus hier erneut zu einem Transportdefekt führen. Wenn die Mutationen dagegen faltungsrelevant sind, sollten sie in diesem System keinen Einfluss auf den Oberflächentransport haben.

5.4.1. Konstruktion der GFP-markierten V2-Rezeptorfragmente

Das Plasmid pEU71.GFP kodiert für die ersten 71 Aminosäuren des V2-Rezeptors, den extrazellulären N-Terminus, die 1. TMD und die 1.IZS (SCHÜLEIN et al., 1996). In dieses Konstrukt wurden die Fragmente mit den mutierten C-Termini kloniert. Hierzu wurde die Sequenz des C-Terminus der eukaryontischen pEU367.GFP-Plasmide mit Primern PCR-amplifiziert, die am 5'-Ende eine BglII-Schnittstelle einführen (an Position 972 der V2R-Rezeptor-Sequenz). Folgende Primer wurden verwendet: P71F328T, P71S329A, P71S330A, P71S331A, P71BglII.5', P71BamHI.3' (siehe 4.1.3.3.). Die PCR-Produkte wurden mit BglII/BamHI gespalten und in das Plasmid pEU71.GFP, welches mit den gleichen Enzymen geschnitten wurde, kloniert. Die Enzyme BglII und BamHI erkennen unterschiedliche Sequenzen, erzeugen aber identische Einzelstrangüberhänge, die miteinander ligieren können. Die Klonierungen wurden durch Sequenzierungen bestätigt. Es entstanden folgende Plasmide: p71.F328T.GFP, p71.S329A.GFP, p71.S330A.GFP, p71.S331A.GFP, p71.V332T.GFP, p71.S333A.GFP, p71.S334A.GFP, p71.L336T.GFP und p71.S338A.GFP.

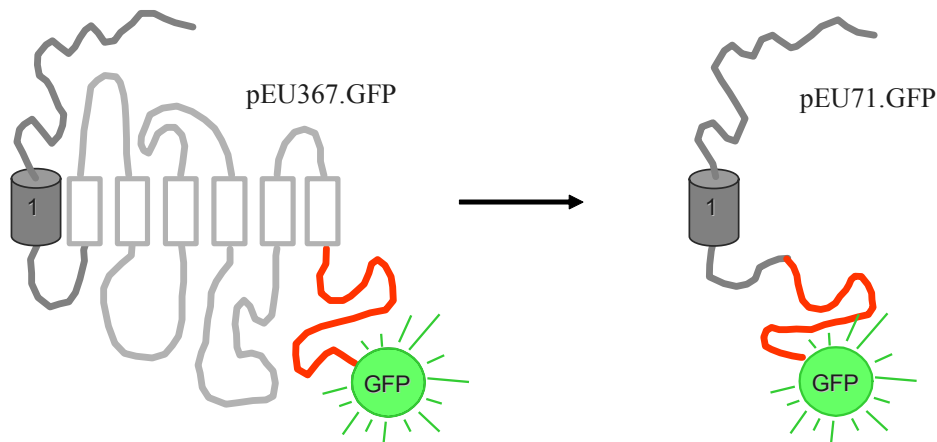


Abbildung 12: Konstruktion des verkürzten V2-Rezeptorfragments durch Fusion des C-Terminus mit der 1.IZS. Der N-Terminus, die 1.TMD und die 1.IZS sind dunkelgrau dargestellt. Der C-Terminus ist rot und GFP grün hervorgehoben.

5.4.2. Lokalisation der GFP-markierten V2-Rezeptorfragmente in HEK293-Zellen

Um die Expression und den Transport der Mutanten des verkürzten Rezeptorfragments zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen in 35 mm Schalen auf Deckgläsern mit den Plasmiden pEU71.CT.GFP, p71.F328T.GFP, p71.S329A.GFP, p71.S330A.GFP, p71.S331A.GFP, p71.V332T.GFP, p71.S333A.GFP, p71.S334A.GFP, p71.L336T.GFP und p71.S338A.GFP transient transfiziert. Die GFP-Fluoreszenzsignale der V2-Rezeptor-Fragmente wurden mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie lokalisiert (siehe Abb. 13).

Das verkürzte Konstrukt mit dem wildtypischen C-Terminus zeigt vorwiegend membranständige Fluoreszenzsignale, wird also an die Oberfläche transportiert (siehe Abb. 13, oben). Wie beim vollständigen Rezeptor finden sich

auch hier Signale im Inneren der Zelle, die wahrscheinlich Transportintermediate darstellen.

Alle Mutanten des proximalen C-Terminus zeigen ebenfalls eine vorwiegend membranständige Fluoreszenz. Die Rezeptorkonstrukte werden also unabhängig von ihrer Mutation im C-Terminus exprimiert und an die Oberfläche transportiert.

Das bedeutet, dass die Mutationen, die im ganzen Rezeptor zu einem Transportdefekt führen, höchstwahrscheinlich kein Transportsignal darstellen, sondern für den Rezeptor faltungsrelevant sind.

5.4.3. Analyse des Glykosylierungsstatus der GFP-markierten V2-Rezeptorfragmente in HEK293-Zellen

Um die Lokalisation der verkürzten Rezeptormutanten mit einer weiteren Methode zu bestätigen, wurde der Glykosylierungsstatus der Mutanten untersucht. Für diese Versuche wurden HEK293-Zellen in 60 mm Schalen mit den Plasmiden pEU71.CT.GFP, p71.F328T.GFP, p71.S329A.GFP, p71.S330A.GFP, p71.S331A.GFP, p.V332T.GFP, p71.S333A.GFP, p71.S334A.GFP, p71.L336T.GFP und p71.S338A.GFP transient transfiziert. Die Gesamtmembranen wurden isoliert und mit *EndoH* und *PNGaseF* behandelt (siehe 5.1.1.). Die Fusionsproteine wurden mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit anti-GFP-Antiserum und [¹²⁵I]-markierten Esel-anti-Kaninchen-IgG detektiert (die Mutante pEU71.F328T.GFP wurde im Western-Blot mit anti-GFP-Antiserum und Peroxidase-konjugiertem Ziege-anti-Kaninchen-IgG detektiert).

Beim unbehandelten Konstrukt mit dem wildtypischen C-Terminus wurden drei spezifische Banden nachgewiesen (siehe Abb. 13, siehe Mutante S338A): eine schmale 42 kDa große Bande (>), eine 45 kDa Bande (#) und eine breitere 55-60 kDa große Bande (*). Nach *EndoH*-Behandlung wird die 45 kDa Bande zu einer 42 kDa Bande reduziert. Das heißt, die 45 kDa Bande stellt die mannosereichglykosylierte Form des Proteins dar; die 42 kDa Bande repräsentiert die unmodifizierten Rezeptorfragmente. Die 55-60 kDa Bande ist *EndoH*-resistent. Diese Bande repräsentiert also die Rezeptorfragmente mit komplexer

Glykosylierung. *PNGaseF* reduziert die 55-60 kDa große Bande zu einer 48-52 kDa großen Bande. Das verdaute Protein wird nicht auf die Höhe der unmodifizierten Proteine von 42 kDa reduziert, sondern läuft im SDS-Gel höher, weil im N-Terminus des V2-Rezeptors im Golgi-Apparat zusätzliche O-Glykosylierungen eingefügt werden (SADEGHI et al., 1999). Die Konstrukte mit den Mutationen im C-Terminus zeigen in der Verteilung der Banden keinen signifikanten Unterschied zum Konstrukt mit dem wildtypischen C-Terminus nach dem Glykosidase-Verdau. Diese Ergebnisse unterstützen die LSM-Studien: Keine der untersuchten Aminosäuren ist in einem Transportsystem, das unabhängig von der Gesamtzeptorfaltung ist, transportrelevant.

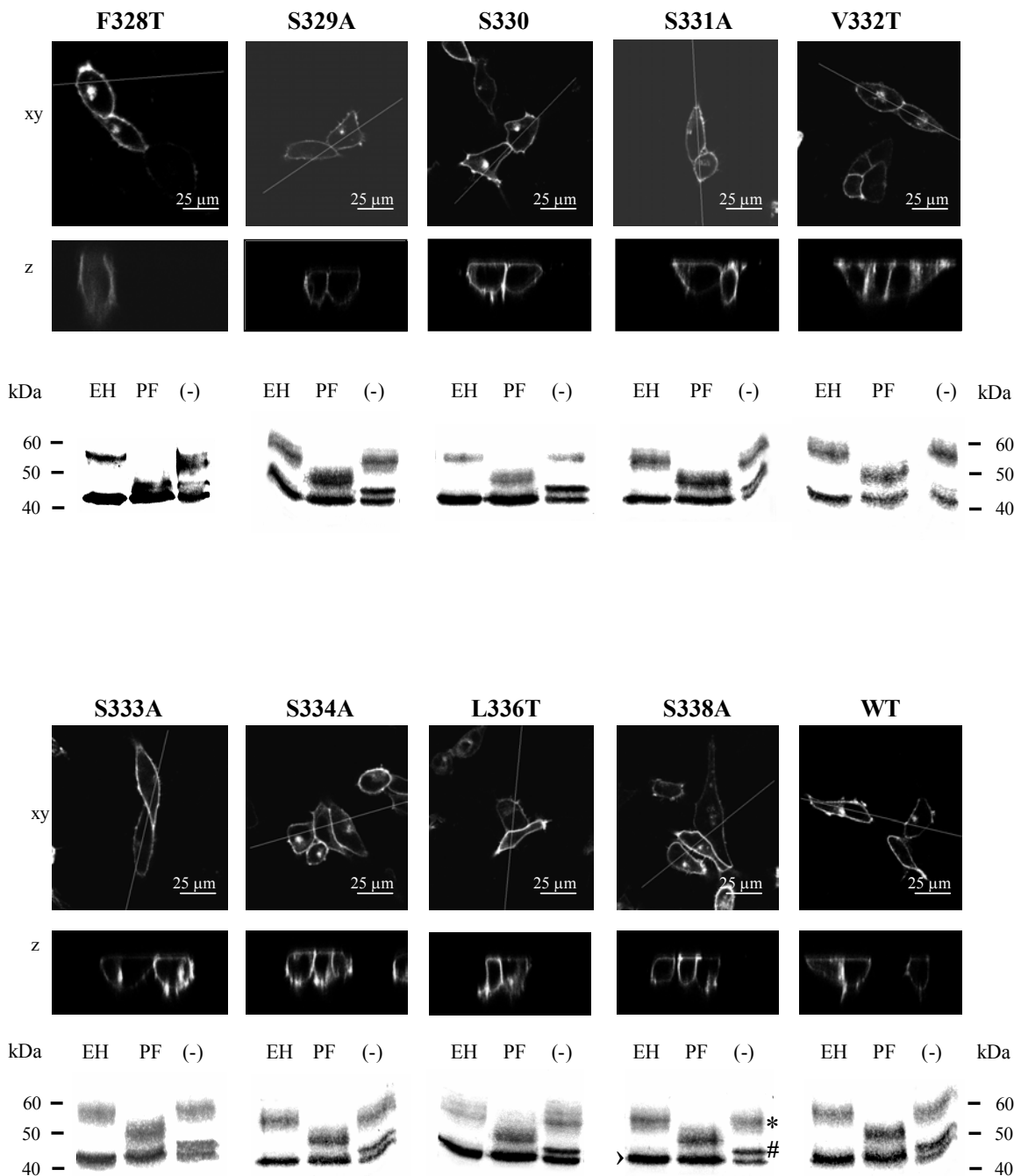


Abbildung 13: jeweils oben: Lokalisation von GFP-markierten V2-Rezeptoren in lebenden transient transfizierten HEK293-Zellen mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie. HEK293-Zellen wurden in 35 mm Schalen auf Deckgläser gesät und mit den Plasmiden pEU71.CT.GFP, p71.F328T.GFP, p71.S329A.GFP, p71.S330A.GFP, p71.S331A.GFP, p71.V332T.GFP, p71.S333A.GFP, p71.S334A.GFP, p71.L336T.GFP und p71.S338A.GFP transient transfiziert. Die Bilder zeigen oben die x/y-Scans (xy) und unten die z-Scans (z) der Zellen. Maßstab: 25 µm.

jeweils unten: Analyse des Glykosylierungsstatus der GFP-markierten V2-Rezeptorfragmente. HEK293-Zellen wurden in 60 mm Schalen ausgesät und mit den Plasmiden pEU71.CT.GFP, p71.F328T.GFP, p71.S329A.GFP, p71.S330A.GFP, p71.S331A.GFP, p71.V332T.GFP, p71.S333A.GFP, p71.S334A.GFP, p71.L336T.GFP und p71.S338A.GFP transient transfiziert. Die Gesamtmembranen wurden isoliert und mit *EndoH* und *PNGaseF* behandelt. Je 50 µg Protein wurden per SDS-PAGE aufgetrennt. Die Fusionsproteine wurden im Western-Blot mit polyklonalem Kaninchen-anti-GFP-Antiserum und [¹²⁵I]-markierten Esel-anti-Kaninchen-IgG detektiert (Die Mutante p71.F328T.GFP wurde im Western-Blot mit polyklonalem Kaninchen-anti-GFP-Antiserum und Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen-IgG detektiert).

EH = *EndoH*; PF = *PNGaseF*; (-) = unverdaut

* = komplex-glykosyliert, > = unmodifiziert, # = kern-glykosyliert

5.5. Die hydrophoben Aminosäuren im proximalen C-Terminus stellen kein Transportmotiv dar

Die bisherigen Daten legen nahe, dass der proximale C-Terminus kein lineares Transportsignal enthält. Diese Aussage beruht aber auf dem Austausch einzelner Aminosäuren, deren Mutationen zu Transportdefekten des Gesamt Rezeptors führen. Es ist nicht auszuschließen, dass die Summe der hydrophoben Reste ein Transportsignal darstellt. Es sollte daher überprüft werden, ob der gleichzeitige Austausch aller hydrophoben Aminosäuren im C-Terminus bei dem verkürzten Konstrukt zu einem Transportdefekt führt. Beim Dopamin D1-Rezeptor führten analoge Experimente zur Identifizierung eines Transportsignals im proximalen C-Terminus (BERMAK et al., 2000).

5.5.1. Gerichtete Mutagenese der GFP-markierten V2-Rezeptorfragmente

Das unter 5.4.1. beschriebene Plasmid pEU71.CT.GFP kodiert für ein Fusionsprotein, das aus den ersten 71 Aminosäuren des V2-Rezeptors, dem C-Terminus und C-terminalen GFP besteht. Alle hydrophoben Aminosäuren des proximalen C-Terminus (F328, V332, L336, L339 und L340) wurden mit Hilfe des QuikChangeTM Mutagenese-Kits teilweise oder vollständig durch Alanine bzw. Threonine ersetzt (siehe unten). Die Aminosäure Alanin hat die Eigenschaft helikale Strukturen zu stabilisieren, so dass die Aufrechterhaltung der Sekundärstruktur gegeben sein sollte (ROHL et al., 1999).

Folgende Primer wurden verwendet: P71F28/V32/L36-T, P71F28/V32/L36-A, P71F28/V32/L36/L39/L40-T und P71F28/V32/L36/L39/L40-A. Die Mutagenesen wurden durch Sequenzierungen bestätigt. Es entstanden die Plasmide p71.F28/V32/L36-T.GFP, p71.F28/V32/L36-A.GFP, p71.F28/V32/L36/L39/L40-T.GFP und p71.F28/V32/L36/L39/L40A.GFP.

5.5.2. Lokalisation der GFP-markierten V2-Rezeptorfragmente in HEK293-Zellen

Die Expression und der Transport der Mutanten wurden mikroskopisch untersucht. HEK293-Zellen wurden in 35 mm Schalen auf Deckgläsern mit den Plasmiden p71.F28/V32/L36-T.GFP, p71.F28/V32/L36-A.GFP, p71.F28/V32/L36/L39/L40-T.GFP und p71.F28/V32/L36/L39/L40A.GFP transient transfiziert und die GFP-Signale mit Hilfe des LSM lokalisiert.

Alle Mehrfachmutanten des proximalen C-Terminus zeigen wie das wildtypische Rezeptorfragment eine vorwiegend membranständige Fluoreszenz (siehe Abb. 14). Das Ergebnis ist unabhängig davon, ob der Austausch der hydrophoben Aminosäuren zu Threoninen oder zu Alaninen erfolgte. Diese Daten beweisen, dass der proximale C-Terminus beim V2-Rezeptor, im Gegensatz zum D1-Rezeptor, für eine transportkompetente Faltung innerhalb des Gesamtproteins wichtig ist und kein eigenständiges Transport-Signal enthält.

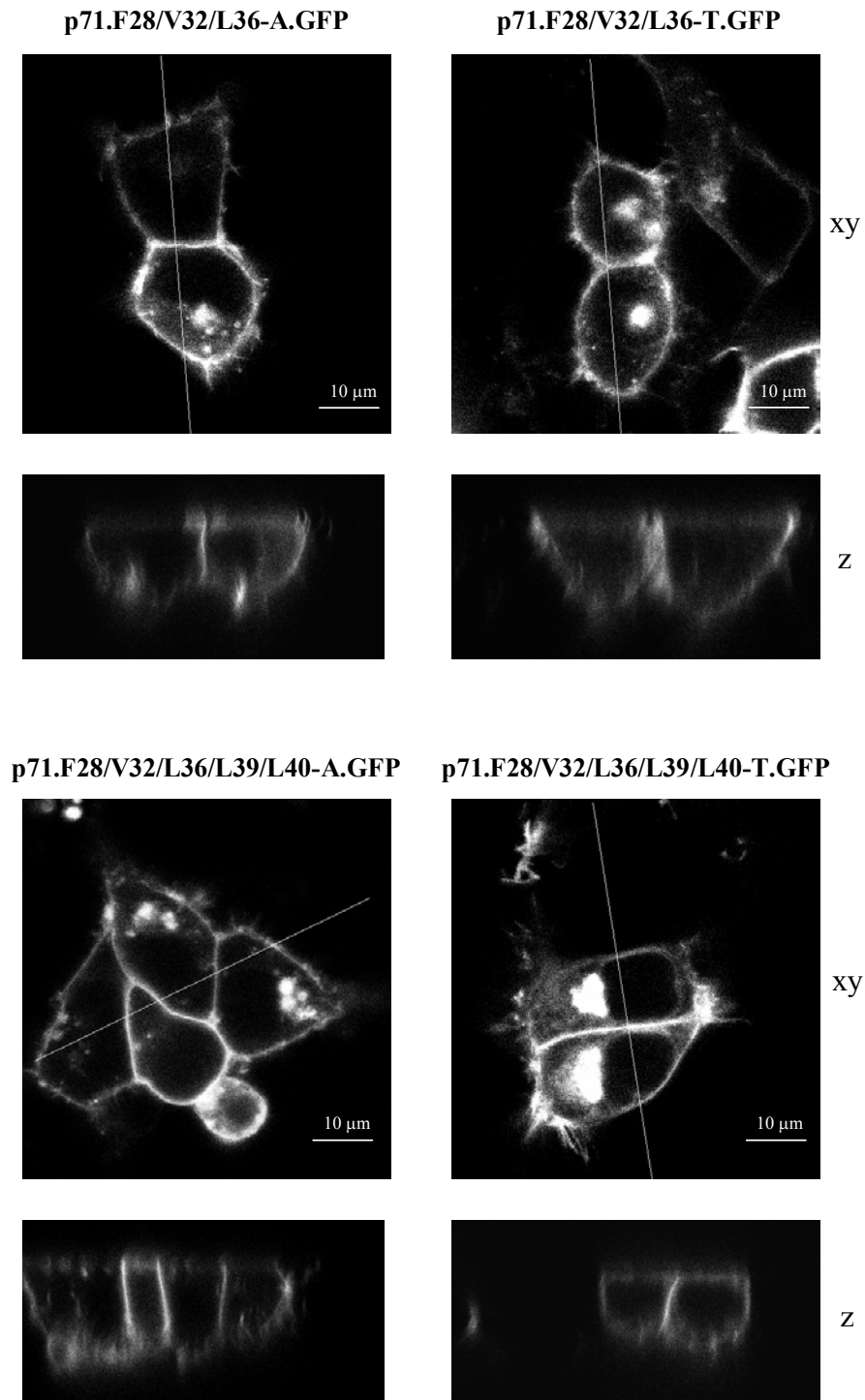


Abbildung 14: Lokalisation von GFP-markierten V2-Rezeptoren in lebenden, transient transfizierten HEK293-Zellen mit Hilfe des LSM. HEK293-Zellen wurden in 35 mm Schalen auf Deckgläser gesät und mit den Plasmiden p71.F28/V32/L36-T.GFP, p71.F28/V32/L36-A.GFP, p71.F28/V32/L36/L39/L40-T.GFP und p71.F28/V32/L36/L39/L40A.GFP transient transfiziert. Die Bilder zeigen oben die x/y-Scans (xy) und unten die z-Scans (z) der Zellen. Maßstab: 10 µm.

5.5.3. Detektion der V2-Rezeptorfragmente an der Oberfläche von HEK293-Zellen

Der mit Hilfe der Mikroskopie beobachtete Oberflächentransport der Fragmente sollte biochemisch bestätigt werden. Hierzu wurden die an der Oberfläche exprimierten V2-Rezeptormutanten mit Hilfe eines Biotinylierungsassays detektiert. HEK293-Zellen wurden in 60 mm Schalen mit den Plasmiden p71.F28/V32/L36-T.GFP, p71.F28/V32/L36-A.GFP, p71.F28/V32/L36/L39/L40-T.GFP und p71.F28/V32/L36/L39/L40A.GFP transient transfiziert. Als Kontrolle für einen erfolgreichen Transport zur Plasmamembran wurden die Plasmide pEU71.CT.GFP mit der wildtypischen und zusätzlich die transportkompetenten Einzelmутanten p71.V332T.GFP und p71.L336T.GFP eingesetzt. Die Oberflächenproteine der intakten Zellen wurden mit Biotin markiert und nach Zell-Lyse mit Hilfe von Neutravidin-Sepharose präzipitiert. Dieses Präzipitat wurde per SDS-PAGE aufgetrennt. Die Rezeptorfragmente an der Plasmamembran wurden auf einem Western-Blot mit anti-GFP-Antiserum und Peroxidase-gekoppeltem anti-Kaninchen-IgG detektiert.

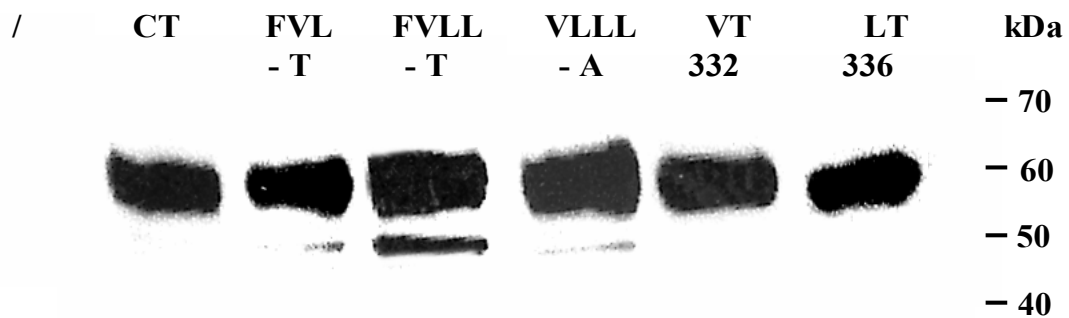


Abbildung 15: Biotinylierungsassay mit V2-Rezeptorfragmenten. HEK293-Zellen wurden in 60mm Schalen gesät und mit den Plasmiden pEU71.CT.GFP(= CT), p71.F28/V32/L36-T.GFP (= FVL-T), p71.F28/V32/L36-A.GFP (= FVL-A), p71.F28/V32/L36/L39/L40-T.GFP (= FVLLL-T) und p71.F28/V32/L36/L39/L40A.GFP (= FVLLL-A), p71.V332T.GFP (= V332T) und p71.L336T.GFP (= L336T) transient transfiziert. Als Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen eingesetzt. Biotinylierte Proteine wurden mit Neutravidin-Sepharose und mit anti-GFP-Antiserum präzipitiert. Die Präzipitate wurden mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und im Immuno-Blot mit anti-GFP-Antiserum und Peroxidase-gekoppeltem anti-Kaninchen-IgG analysiert.

Das Rezeptorfragment mit dem wildtypischen C-Terminus war mit einer apparenten Molmasse von 60 kDa an der Oberfläche detektierbar (siehe Abb. 15).

Diese Größe entspricht dem reifen Protein mit komplexer Glykosylierung (siehe auch 4.4.3.). Alle Rezeptorfragmente mit den mutierten hydrophoben Aminosäuren waren ebenfalls auf dieser Höhe und mit vergleichbarer Intensität detektierbar. Die Mutanten sind also sowohl in der LSM-Studie als auch im Biotinylierungsassay transportkompetent.

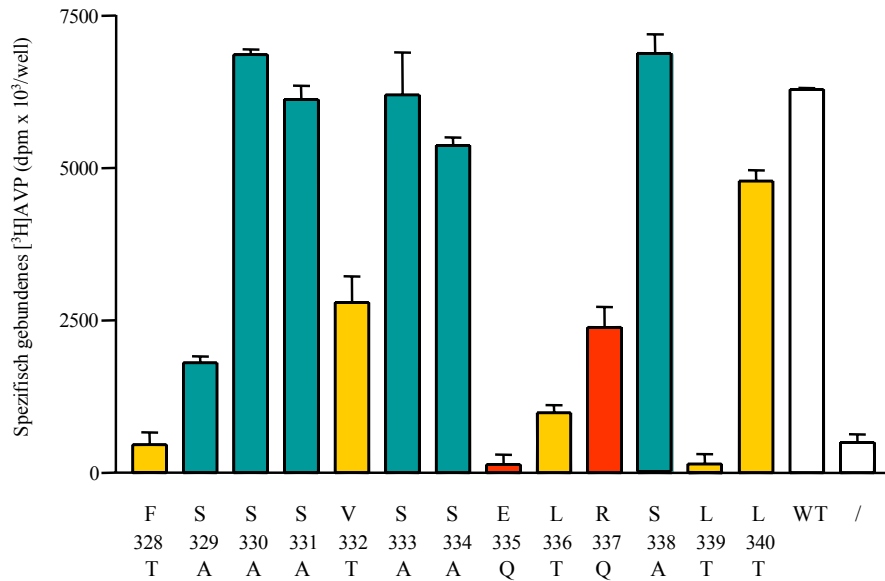
5.6. Zusammenfassung der Transportrelevanz der einzelnen Aminosäuren im proximalen C-Terminus des V2-Rezeptors:

Um einen besseren Überblick über die Faltungs- und Transportrelevanz der einzelnen Aminosäuren des proximalen C-Terminus zu erhalten, wurde nochmals mit allen Mutanten des proximalen C-Terminus ein Bindungsexperiment durchgeführt.

HEK293-Zellen wurden in 24-well-Platten ausgesät und mit den Plasmiden p.F328T, p.S329A, p.S330A, p.S331A, p.V332T, p.S333A, p.S334A, p.E335Q, p.L336T, p.R337Q, p.S338A, p.L339T, p.L340T und pRCDN2 transient transfiziert und die [³H]AVP-Bindung im Sättigungsbereich bestimmt.

Alle hydrophoben Aminosäuren im proximalen C-Terminus (in der Abb. 16 gelb dargestellt), F328, V332, L336, L339 und L340 sind für den Rezeptor transportrelevant. Die Rezeptormutanten F328T, L336T und L339T werden dabei zu 100% retiniert, während V332T und L340T zu einem partiellen Transportdefekt führen. Der Transportdefekt der Mutanten L339 und L340 wurde bei SCHÜLEIN et al., 1998 beschrieben. Serin 329 ist das einzige der insgesamt 6 Serine in diesem Bereich des Rezeptors (in der Abb. 16 blau dargestellt), dessen Austausch einen negativen Effekt auf den Transport hat. Hier ist vermutlich die relative Nähe zur 7. TMD der entscheidende Faktor für die Faltungsrelevanz. Die Mutation der geladenen Reste R337Q und E335Q (in der Abb. 16 rot dargestellt) führt ebenfalls zu einem Transportdefekt: R337Q zu einem partiellen (OKSCHE et al., 1998) und E335Q zu einem vollständigen Transportdefekt (SCHÜLEIN et al., 1998). Zusammengefasst scheint der proximale C-Terminus ein Faltungsmotiv zu bilden, zu dem neben den hydrophoben Resten auch die geladenen Aminosäuren beitragen, die Serine hingegen nicht.

A:



B:

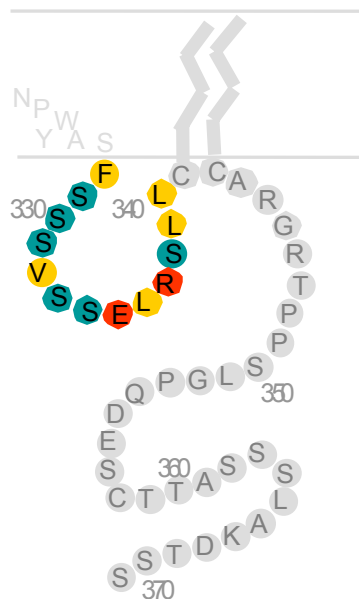


Abbildung 16: A: Spezifische [³H]AVP-Bindung an intakten, transient transfizierten HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden in 24-well-Platten ausgesät und mit den Plasmiden p.F328T, p.S329A, p.S330A, p.S331A, p.V332T, p.S333A, p.S334A, p.E335Q, p.L336T, p.R337Q, p.S338A, p.L339T, p.L340T und pRCDN2 (WT) transient transfiziert. Die [³H]AVP-Konzentration (10 nM) wurde nahe der Sättigung gewählt. Die Datenpunkte entsprechen Mittelwerten von Triplikaten und sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimenten. Hydrophobe Aminosäuren: gelb; Serine: blau; geladene Aminosäuren: rot; Kontrolle (/): weiß.

B: Detail des V2-Rezeptor-C-Terminus.

Die Aminosäuren des proximalen C-Terminus sind farblich hervorgehoben:
hydrophobe Aminosäuren: gelb; Serine: blau; geladene Aminosäuren: rot.

5.7. Erstellung eines Strukturmodells für den intrazellulären C-Terminus des V2-Rezeptors

Die Faltungsrelevanz des proximalen C-Terminus sollte sich in seiner Struktur widerspiegeln. In Zusammenarbeit mit G. Krause (FMP-Berlin) wurde ein 3D-Strukturmodell des V2-Rezeptors erstellt. Das Modell wurde auf der Basis der Kristallstrukturdaten des Rhodopsins berechnet (PALCZEWSKI et. al., 2000).

Der V2-Rezeptor gehört zur Familie A der GPCR und das Rhodopsin ist der prominenteste Vertreter dieser Familie.

Die Sequenzähnlichkeit zwischen dem V2-Rezeptor und dem Rhodopsin im Bereich des proximalen C-Terminus liegt bei 82% (Berechnung nach RISLER et al., 1988). Laut Kristallstruktur des Rhodopsins bildet der proximale C-Terminus eine amphipatische α -Helix. Die hydrophobe Seite dieser Helix 8 (H8) wird durch die hydrophoben Aminosäuren des proximalen C-Terminus gebildet und ist der Membran zugewandt. Die Helix wird durch das Prolin des NPXXY-Motivs am Ende der 7.TMD abgelenkt und liegt somit im 90 Grad-Winkel zu den transmembranären Helices 1-7 (Palczewski et. al., 2000).

Das aus den Rhodopsin-Daten berechnete 3D-Modell des V2-Rezeptors zeigt ein hohes Maß an Übereinstimmung mit dem Rhodopsin-Modell. Die hydrophobe Fläche der H8 wird beim V2-Rezeptor-Modell durch V332, L336 und L339 gebildet (siehe Abb. 17). Ein ähnliches hydrophobes Motiv (HxxxHxxxHH) ist im proximalen C-Terminus bei vielen GPCR konserviert (siehe Abb. 18). Die Aminosäuren F328, S329 und S330 bilden den Übergang der 7.TMD zur Helix 8. Die Serine und die geladenen Aminosäuren liegen auf den hydrophilen Seiten der Helix. Das berechnete Modell sagt eine Interaktion der 8. Helix mit Aminosäureresten aus der 1.IZS und der 1.TMD voraus. Mit Hilfe der aus dem Modell abgeleiteten intramolekularen Interaktionen ist die Faltungsrelevanz der Reste F328, S329, V332 und L336 des proximalen C-Terminus, sowie der Reste E335, L339 und L340, sehr gut zu interpretieren: Die transportrelevanten Mutationen könnten die Interaktion zwischen Helix 8 und 1.TMD/1.IZS aufheben und zur Erkennung durch das Qualitätskontrollsystem führen.

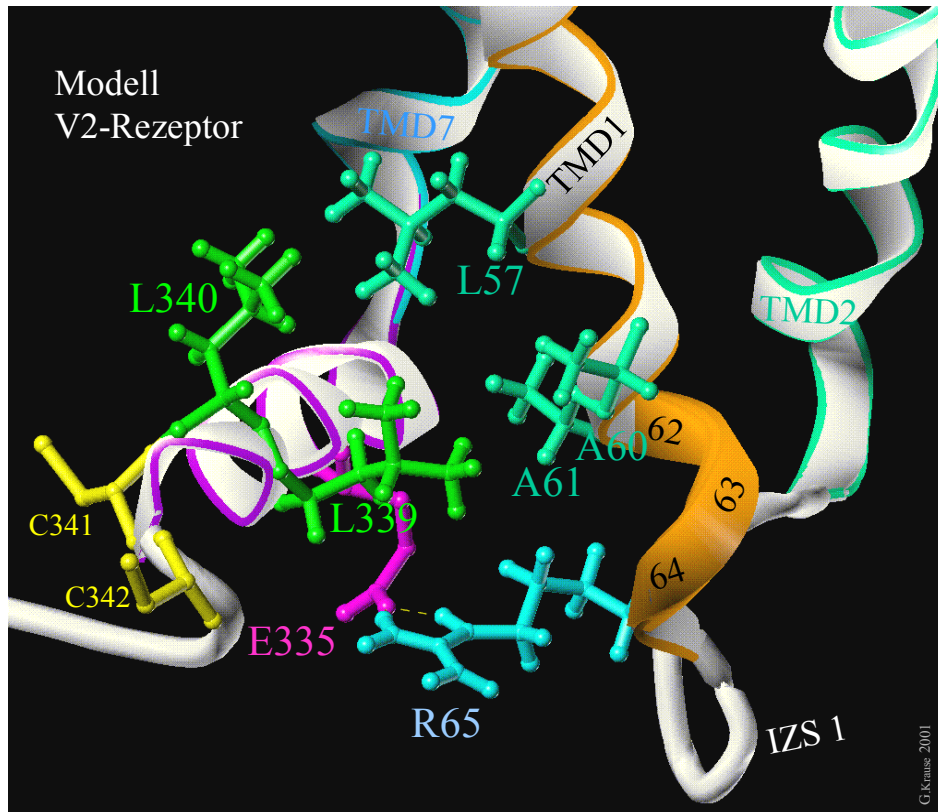


Abbildung 17: Detail des Strukturmodells des V2-Rezeptors. Das Bild zeigt die mögliche Interaktion zwischen dem C-Terminus und der 1.IZS und der 1.TMD. Es sind nur die 1.TMD, die 1.IZS, die 2.TMD, die 7.TMD und der C-Terminus dargestellt. Der proximale C-Terminus ist als α -Helix dargestellt. V332, L336 und L339 bilden die hydrophobe Ebene einer Helix (nur der Seitenarm von L339 gezeigt), die an Aminosäure-Resten aus der 1.TMD binden. E335 bildet eine Salzbrücke mit R65 aus der 1.IZS aus.

Das Modell legt nahe, die vorhergesagten intramolekularen Interaktionen experimentell zu überprüfen. Wenn die faltungsdefekten Mutanten keine Wechselwirkungen mit ihren Interaktionspartnern eingehen können, dann sollten diese Interaktionen durch die Einführung einer komplementären Mutation in der 1.TMD oder 1.IZS wiederhergestellt werden können. Im Folgenden werden entsprechende „Rescue“-Experimente beschrieben.



Protein	Sequence
V2A	.NPWIYASFSSSVSSELRSLCCARGR
V2_pig	.NPWIYASFSSSISSELRSLCCPRRR
V2_BOV	.NPWIYASFSSSISSELRSLCCTWRR
B1ADR	.NPIIY.CRSPDFRKAFOGLLCCARRA
B3ADR	.NPLIY.CRSPDFRSAFRRLLCRGRR
A1ADR	.NPLIYPCSSREFKRAFLRLRCQRR
A2bADR	.NPVIYTIFNQDFRRAFRRLCRP.WT
A2ciiADR	.NPVIYTVFNQDFRRSEKHLFRRRRR
H1	.NPLIYPLCNENFKTEKRLHIR...
D1	.NPIIYA.FNADFRKAFSTLLGCRLOP
ADORA2a	.NPFIYAYRIRERQTERKTIIRSHVLR
5HT1e	.NPLLYTSFNEDEKLAFFKLLIRCREHT
5HT1	.NPLIYTIFNEDEKKAFFQKLVRRCR~
5HT7	.NPFIYAFNRRDLRTTYRSLLCQYRN
5HT1c	.NPLVYTLFNKIYRRAFSNYLRONYKV
D2	.NPLIYTFNIEFRKAFLLKILH~~~~
MC5	.DPLIYAFRSQEMRKTKEIICCRGFR
MC	.DPLIYAFRSLELRNTEREILCGNGM
SST1	.NPILYGFLSDNFKRSFQRILCLSWMD
SST2	.NPILYAFSLDNFKKSEQNVLCLVKVS
SST3	.NPILYGFLSYRFKQGFRRVLRPSRR
SST4_RAT	.NPILYGFLSDNFRRSFQRVLCLRCCL
SST5	.NPVLYGFLSDNFRQSFQKVLCLRKGG
LHHCG	.NPFLYAIFTKTFQRDFLLSKFGCC
FSH	.NPFLYAIFTKNERRDEFILLSKGCY
TSH	.NPFLYAIFTKAFQRDVILLSKFGIC
US28 (CMV)	.NPLLYVFVGTKRQELHCLLAEFRQR
GPCRA	.NPFLYAFIGVKERNDFKLFKDLGCL
NPY1a	.NPIFYGFLNKNFQRLLQFFNFQDFR
D5	.NPVIYA.FNADFQKVEAQLLGCHFC
5HT1da	.NPIIYTVFNEEFQAFQKIVPFRKAS
EDG1	.NPIIYTLTNKEMRRAFIRIMSCCKCP
H2	.NPILYAAALNRDERTGYQLFCCLAN
CckK1	.NPVIYAFVGERFRKYLRLFHRRVAV
AT1a	.NPLFYGFLGKKFKRYELQLLYIPP
IL8a	.NPIIYAFIGQNERHGFLKILAMHGLV
THR	.DPLIYYYASSECRQYVYSILCKESS
HM1 (mACH)	.NPMCYALCNKAFRDTFRLLLLCRWD.
HM2 (mACH)	.NPACYALCNATEKTEKHLMLCHYKN
HM3 (mACH)	.NPACYALCNATEKTEKHLMLCOYRN
HM5 (mACH)	.NPICYALCNRTFRKTEKMLLLCRWKK
HM4 (mACH)	.NPVCYALCNKTERTEKMLLLCCCDK

Abbildung 18: Identifizierungen von potentiellen hydrophoben Faltungsmotiven in den C-Termini von GPCR. Die Daten wurden aus der SWISS-PROT- und EMBL- Datenbank entnommen. Hervorgehoben sind von links nach rechts: das hoch konservierte NPXXY-Motiv am Ende der 7.TMD, das hydrophobe Motiv HxxxHxxxHH und die potentiellen Palmitoylierungsstellen. Die Abkürzungen wurden aus der SWISS-PROT- und EMBL- Datenbank direkt übernommen: V2A, V2-Arginin-Vasopressin-Rezeptor; V2A_pig, Vasopressin-V2-Rezeptor des Schwein; V2_BOV, Vasopressin-V2-Rezeptor des Rindes, B1ADR, β_1 -adrenerger Rezeptor; B3ADR, β_3 -adrenerger Rezeptor; A1ADR, α_1 -adrenerger Rezeptor; A2bADR, α_{2b} -adrenerger Rezeptor; A2ciiADR, α_{2CII} -adrenerger Rezeptor; H1, Histamin-Rezeptor Typ 1; D1, Dopamin-Rezeptor Typ1; ADORA2a, Adenosin-Rezeptor Typ 2a; 5HT1e, Serotonin-Rezeptor Typ 1e; 5HT1e, Serotonin-Rezeptor Typ 1e; 5HT1, Serotonin-Rezeptor Typ 1; 5HT7, Serotonin-Rezeptor Typ 7; 5HT1c, Serotonin-Rezeptor Typ 1c; D2, Dopamin-Rezeptor Typ2; MC5, Melanocortin-5-Rezeptor; MC, Melanocortin-Rezeptor; SST1, Somatostatin-Rezeptor Typ 1; SST2, Somatostatin-Rezeptor Typ 2; SST3, Somatostatin-Rezeptor Typ 3; SST4_RAT, Somatostatin-Rezeptor Typ 4 der Ratte; SST5, Somatostatin-Rezeptor Typ 5; LHHCG, Luteotropin/humanes Choriogonadotropin-Rezeptor; FSH, follikelstimulierendes Hormon-Rezeptor; TSH, Thyreotropin-Rezeptor; US28 (CMV), Zytomegalovirus G-Protein-gekoppelter Rezeptor; GPCRA, humaner

putativer G-Protein-gekoppelter Rezeptor; NPY1a, Neuropeptid Y-Rezeptor; D5, Dopamin-Rezeptor Typ5; 5HT1da, Serotonin-Rezeptor Typ 1da; EDG1, G-Protein-gekoppelter Rezeptor Typ 1 der Epithelzelle; H2, Histamin-Rezeptor Typ 2; CckK1, C-C Chemokin-Rezeptor Typ1; AT1, vaskulärer Typ 1 Angiotensin II-Rezeptor; IL8a, Interleukin-8-Rezeptor; THR, Thrombin-Prorezeptor; HM1(mACH), muskarinerge Acetylcholin-Rezeptor HM1; HM2(mACH), muskarinerge Acetylcholin-Rezeptor HM2; HM3(mACH), muskarinerge Acetylcholin-Rezeptor HM3; HM4(mACH), muskarinerge Acetylcholin-Rezeptor HM4; HM5(mACH), muskarinerge Acetylcholin-Rezeptor HM5;

5.7.1. Einführung der verschiedenen Mutationen in der 1.IZS und der 1.TMD

Das Strukturmodell des V2-Rezeptors postuliert für den transportrelevanten proximalen C-Terminus eine helikale Struktur, welche intramolekulare Interaktionen mit Aminosäuren der 1.TMD und der 1.IZS eingeht. Die Mutationen der strukturelevanten Reste führen wahrscheinlich zu instabilen Rezeptoren, die das ER nicht verlassen können. Um die postulierten Interaktionen zu beweisen, sollten in der 1.IZS, bzw. der 1.TMD des V2-Rezeptors zuerst Mutationen eingeführt werden (bzw. bereits vorhandene Mutationen genutzt werden), die diese Wechselwirkungen zerstören. In einem zweiten Schritt sollte dann durch Mutagenese der entsprechenden komplementären Positionen diese Wechselwirkung wieder hergestellt werden. Eine Übersicht der eingeführten Mutationen gibt Tabelle 1. Der Schwerpunkt lag auf möglichen Interaktionspartnern von E335 und L339 (siehe Abb. 17 und Tabelle 1). Der Austausch der beiden Aminosäuren E335Q und L339T bewirkt jeweils einen kompletten Transportdefekt (SCHÜLEIN et. al., 1998; siehe auch Abb. 16). Hier sollte ein möglicher Rescue besser zu sehen sein, als bei Mutanten, die nur einen relativen Transportdefekt verursachen (wie z.B. die Mutanten V332T oder L336T).

Das negativ geladene E335 liegt auf der hydrophilen Seite der Helix und interagiert nach dem Modell mit den positiv geladenen Resten R65 und H70 der 1.IZS. Um diese Interaktion zu beweisen, wurden durch die Mutagenesen die Ladungsträger vertauscht. Das Glutamat 335 wurde durch ein positiv geladenes Arginin ersetzt. R65 und H70 in der ersten intrazellulären Schleife wurden jeweils durch Glutamat ersetzt (siehe Tabelle 1).

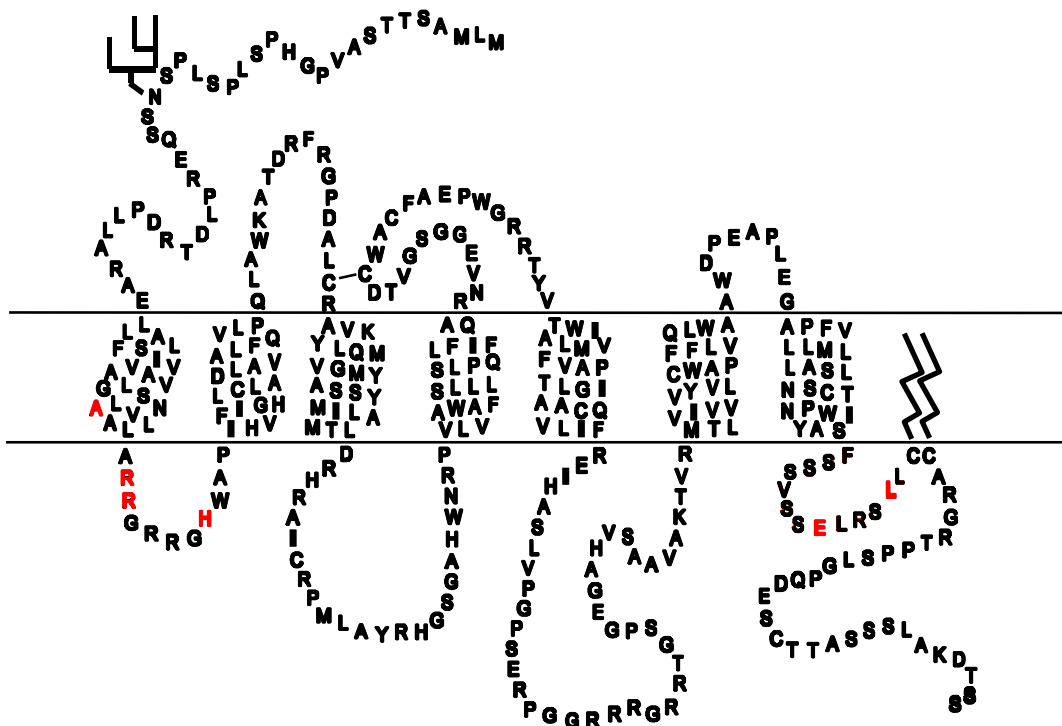
Leuzin 339 liegt nach dem Modell auf der hydrophoben Seite der Helix 8 und interagiert mit hydrophoben Seitenketten der 1.TMD und der 1.IZS. Hierfür kommen der Rest A60 in der 1.TMD, aber auch die langen Kohlenwasserstoffseitenarme der Arginine an den Positionen 64 und 65 der 1.IZS in Betracht. Um diese Interaktionen zu überprüfen, wurden L339 zu Alanin und A60 zu Leuzin mutiert. Bei diesem Austausch werden die Größenverhältnisse der Partner gewahrt und eine Störung der Raumstrukturen bleibt gering. Außerdem wurden an den gleichen Positionen weitere mögliche Mutationspaare (L339T/A60Y; L339K/A60D) untersucht. Da das Modell auf den Rhodopsin-Daten basiert und die Sequenzähnlichkeit beider Proteine sehr groß ist, wurde auch partiell die Rhodopsinsequenz eingeführt (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Identifizierung möglicher Interaktionspartner für die beiden c-terminalen Aminosäuren E335 und L339. In der linken Spalte sind die Bezeichnungen der Mutanten aufgeführt. Die mittleren Spalten zeigen die jeweiligen Mutagenesen. Die wildtypische Sequenz ist grau unterlegt. Rho.: Hier wurde durch Mutagenese partiell die Rhodopsinsequenz eingeführt.

Unten: Zweidimensionales Topologiemodell des humanen Vasopressin V2-Rezeptors. Die in der Tabelle angegebenen Positionen sind rot markiert.

Bezeichnung	C-Terminus	1.TMD / 1.IZS		
	335	65	70	
WT	E	R	H	WT
E335Q/R65Q	Q	Q		
E335Q/H70E	Q		E	
E335R/R65E	R	E		
E335R/H70E	R		E	

Bezeichnung	C-Terminus	1.TMD / 1.IZS			
	339	60	64	65	
WT	L	A	R	R	WT
L339T/A60Y/R64Q/R65H	T		Q	H	Rho
L339T/R64Q	T		Q		
L339T/A60Y/R64Q	T	Y	Q		Rho
L339T/A60Y	T	Y			
L339K/A60D	K	D			



5.7.2. Gerichtete Mutagenese der möglichen Interaktionspartner in der 1.IZS und der 1.TMD

Für die gerichteten Mutagenesen wurde experimentell wie folgt vorgegangen: Das Plasmid pRCDN2 kodiert für den wildtypischen unmarkierten V2-Rezeptor und ist unter 5.2.1. beschrieben. Die Mutationen wurden mit dem QuikChangeTM Mutagenesis System ausgeführt. Die hierfür benutzten Oligonukleotide waren PA60D, PA60L, PA60Y, PR64Q, PR65Q, PR64Q/R65Q, PR65H, PA60Y im R65Q, PH70E, PR65E, PE335R, PL339K und PL339A. Es entstanden die Plasmide: pE335Q/R65Q, p.R65Q, p.E335Q, p.E335Q/H70E, p.H70E, p.E335R/R65E, p.R65E, p.E335R, p.E335R/H70E, p.L339T/A60Y/R64Q/R65H, p.A60Y/R64Q/R65H, p.L339T p.L339T/A60Y, p.A60Y, p.L339T/A60Y/R64Q p.A60Y/R64Q, p.L339K/A60D, p.L339K und p.A60D.

Die gleichen Mutationen wurden auch im pEU367.GFP eingeführt, der für den GFP-markierten V2-Rezeptor kodiert (beschrieben unter 5.2.1.). Es entstanden die Plasmide: p.E335Q/R65Q.GFP, p.R65Q.GFP, p.E335Q.GFP, p.E335Q/H70E.GFP, p.H70E.GFP, p.E335R/R65E.GFP, p.R65E.GFP, p.E335R.GFP, p.E335R/H70E.GFP, p.L339T/A60Y/R64Q/R65H.GFP, p.A60Y/R64Q/R65H.GFP, p.L339T.GFP, p.L339T/A60Y.GFP, p.A60Y.GFP, p.L339T/A60Y/R64Q.GFP, p.A60Y/R64Q.GFP, p.L339K/A60D.GFP, p.L339K.GFP und p.A60D.GFP. Alle Mutationen wurden durch Sequenzierungen der Plasmide bestätigt.

5.7.3. Bindungsstudien an intakten HEK293-Zellen

Die Auswirkung aller in Tabelle 1 aufgeführten Mutationen wurde zunächst mit [³H]AVP-Bindungsstudien im Sättigungsbereich überprüft (siehe Abb. 19).

HEK293-Zellen wurden in 24 mm well-Platten ausgesät und mit den Plasmiden pRCDN2, pE335Q/R65Q, p.R65Q, p.E335Q, p.E335Q/H70E, p.H70E, p.E335R/R65E, p.R65E, p.E335R, p.E335R/H70E, p.L339T/A60Y/R64Q/R65H, p.A60Y/R64Q/R65H, p.L339T, p.L339T/A60Y, p.A60Y, p.L339T/A60Y/R64Q, p.A60Y/R64Q, p.L339A/A60L, p.L339A, und p.A60A transient transfiziert. Anschließend wurde die spezifische Bindung an intakten Zellen bestimmt.

Die Rezeptoren mit den C-terminalen Mutationen E335Q, L339A und L339T sind, wie erwartet, vollständig bindungsdefekt (siehe Abb. 19). Die Mutation R65Q zeigt im Vergleich zum WT in der Sättigung eine um ca. 30% verringerte spezifische Bindung. Mutationen an der Position 60 zeigen unterschiedliche Effekte: A60Y hatte eine um ca. 50% verringerte spezifische Bindung zur Folge. Bei der Mutante A60L war die Bindung in der Sättigung um ca. 70% reduziert. Die Doppelmutanten L339T/A60Y und E335Q/R65Q, bei denen ein „Rescue“ erwartet wurde, zeigen wie die C-terminalen Einfachmutanten keine spezifische Bindung des Liganden. Die Einführung dieser Mutationen führte also zu keiner Aufhebung des Transportdefektes. Die Doppelmutante L339A/A60L zeigt zwar eine höhere spezifische [³H]AVP-Bindung als die einfache c-terminale L339A-Mutante, allerdings ist der Wert immer noch um ca. 80% niedriger als beim wildtypischen Rezeptor. Auch der wechselseitige Austausch von L339A, bzw. A60L führt zu keiner Aufhebung des Faltungs- und Transportdefektes.

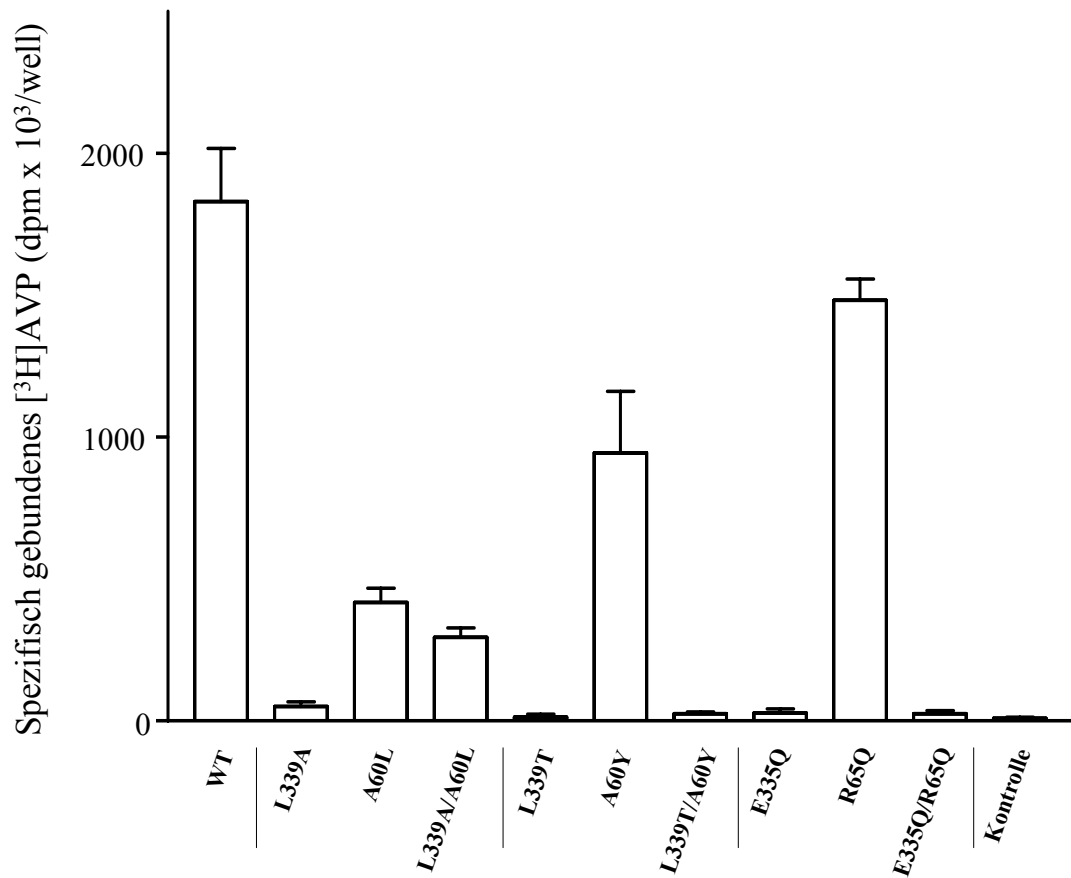


Abbildung 19: Spezifische Bindung von [³H]AVP an die einzelnen V2-Rezeptormutanten. HEK293-Zellen wurden in 24 mm well-Platten ausgesät und mit den Plasmiden pRCDN2 (WT), p.E335Q, p.R65Q, p.E335Q/R65Q, p.L339T, p.A60Y, p.L339T/A60Y, p.L339A, p.A60L und p.L339A/A60L transient transfiziert. Die [³H]AVP-Konzentration (10 nM) wurde nahe der Sättigung gewählt. Die Datenpunkte entsprechen Mittelwerten von Triplikaten und sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimenten. Als Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen verwendet.

5.7.4. Lokalisation der GFP-markierten Rezeptor-Mutanten in HEK293-Zellen

Um die Expression und Lokalisation der einzelnen V2-Rezeptormutanten in lebenden Zellen zu bestimmen, wurden die mit GFP-markierten Rezeptoren mit Hilfe des LSM lokalisiert. HEK293-Zellen wurden in 35-mm Schalen auf Deckgläsern ausgesät und mit den Plasmiden p.E335Q/R65Q.GFP, p.R65Q.GFP, p.E335Q.GFP, p.E335Q/H70E.GFP, p.H70E.GFP, p.E335R/R65E.GFP, p.R65E.GFP, p.E335R.GFP, p.E335R/H70E.GFP, p.L339T/A60Y/R64Q/R65H.GFP, p.A60Y/R64Q/R65H.GFP, p.L339T.GFP, p.L339T/A60Y.GFP, p.A60Y.GFP, p.L339T/A60Y/R64Q.GFP, p.A60Y/R64Q.GFP, p.L339A/A60L.GFP, p.L339A.GFP und p.A60L.GFP transient transfiziert.

Die Rezeptoren mit dem C-terminalen Mutationen E335Q, L339A oder L339T zeigten vorwiegend eine intrazelluläre Fluoreszenz. Diese Rezeptormutanten überwinden die Qualitätskontrolle des ER nicht und werden dort retiniert (SCHÜLEIN et al., 1998; HERMOSILLA, 2000). Die Mutanten R65Q und A60Y zeigten, in Übereinstimmung mit den Bindungsexperimenten, zusätzlich zu den intrazellulären auch membranständige Signale (siehe Abb. 20). Der Austausch A60L führt zu vollständig transportdefekten Rezeptoren. Die Doppelmutanten L339T/A60Y, L339A/A60L und E335Q/R65Q waren ebenfalls vollständig transportdefekt, d.h. in keinem der untersuchten Interaktionspartner wurde ein Rescue erhalten.

In der Folge wurden noch weitere Mutationen in der 1. IZS, bzw. der 1.TMD eingefügt und die entsprechenden Doppelmutationen konstruiert. Diese Mutationen sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Alle Rezeptormutanten wurden wieder durch [³H]AVP-Bindungsexperimente untersucht (Daten nicht gezeigt, die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst). In keinem Fall wurde bei den Doppelmutanten ein „Rescue“ beobachtet.

Zusammengefasst lassen sich die vorhergesagten Interaktionen der Helix 8 des V2-Rezeptors mit der 1. IZS, bzw. der 1.TMD mit diesem experimentellen Ansatz nicht bestätigen.

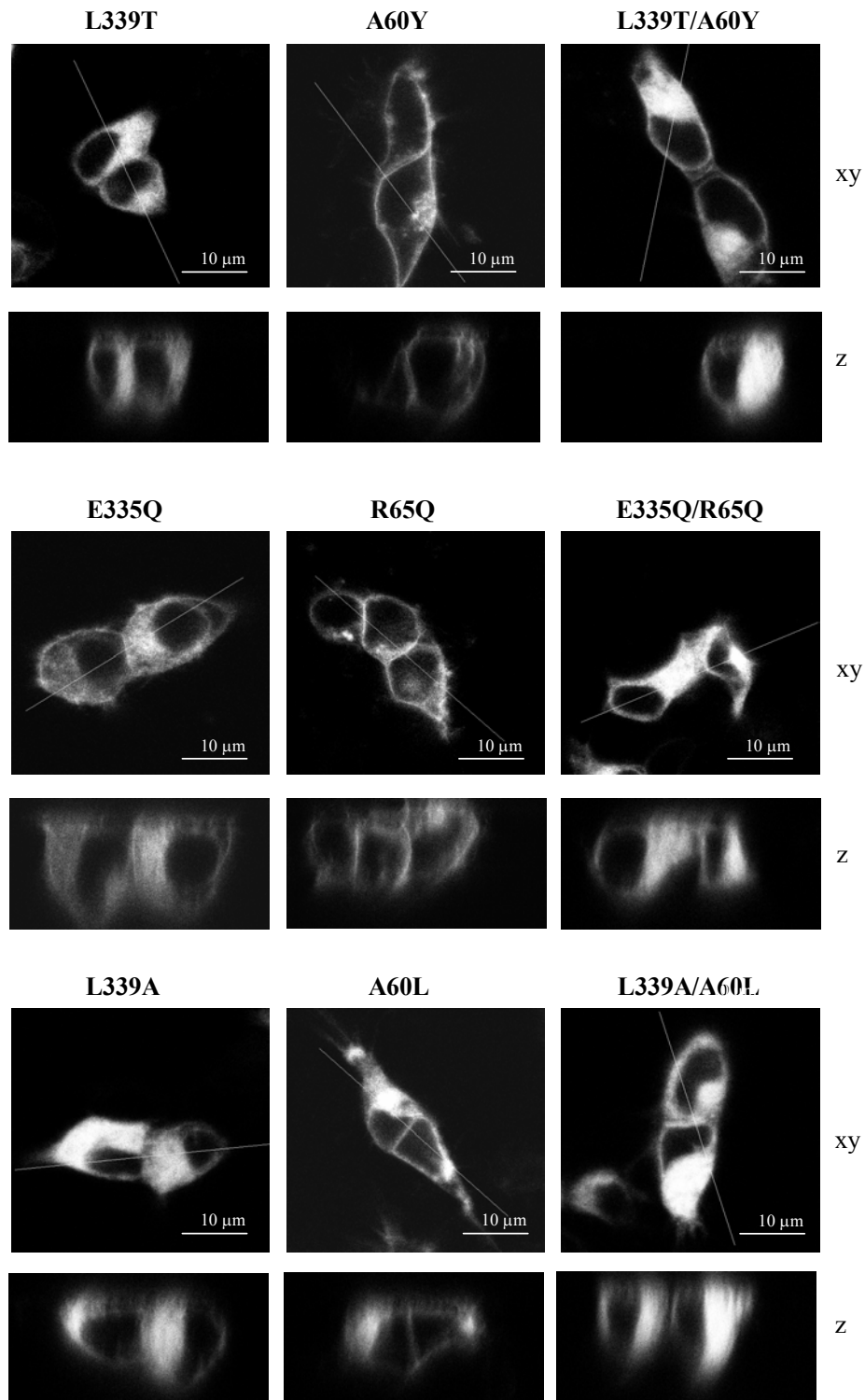


Abbildung 20: Lokalisation einzelner GFP-markierte V2-Rezeptormutanten in lebenden, transient transfizierten HEK293-Zellen mit Hilfe des LSM. Die Zellen wurden in 35 mm Schalen auf Deckgläser gesät und mit den Plasmiden p.E335Q.GFP, p.R65Q.GFP, p.E335Q/R65Q.GFP, p.L339T.GFP, p.A60Y.GFP, p.L339T/A60Y.GFP, p.L339A/A60L.GFP, p.L339A.GFP und p.A60L.GFP transient transfiziert. Die Bilder zeigen oben die x/y-Scans (xy) und unten die z-Scans (z) der Zellen. Maßstab: 10 µm.

Tabelle 2: Zusammenfassung der spezifischen [³H]AVP-Bindung an die einzelnen mit GFP-markierten V2-Rezeptormutanten. Alle Versuche wurden in transient transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. Die Aussagen wurden aufgrund von zwei unabhängigen Experimenten mit Dreifachwerten ermittelt. In der linken Spalte ist das nach dem Modell erwartete Ergebnis, in der rechten Spalte das tatsächliche Ergebnis angegeben.

Position	Erwarteter Effekt der Mutation	[³H]AVP-Bindung in der Sättigung im Vergleich zum WT
E335Q	transportdefekt	-
R65Q	transportdefekt	Ca. 50%
H70E	transportdefekt	-
E335Q/R65Q	Oberfläche	-
E335Q/H70E	Oberfläche	-
E335R	transportdefekt	-
R65E	transportdefekt	Ca. 50%
E335RR65E	Oberfläche	-
E335R/H70E	Oberfläche	-
L339T	transportdefekt	-
R64Q	transportdefekt	50-70%
R65H	transportdefekt	50-70%
L339T/R64Q	Oberfläche	-
L339T/R65H	Oberfläche	-
L339T/R64Q/R65H	Oberfläche	-
A60Y	transportdefekt	-
L339T/A60Y	Oberfläche	-
L339TA60Y/R64Q	Oberfläche	-
L339K	transportdefekt	-
A60D	transportdefekt	-
L339K/A60D	Oberfläche	-