

Strukturelle und funktionelle Bedeutung der konservierten Disulfidbrücke des Vasopressin-V2-Rezeptors

D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des akademischen Grades

D o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
am Institut für Chemie der Freien Universität Berlin

von

Diplombiologin Kerstin Zühlke

geboren am 27. Oktober 1962 in Greifswald

Präsident der Freien Universität Berlin

Univ.-Prof. Dr. Peter Gaehtgens

Dekan des Fachbereiches Biologie, Chemie, Pharmazie

Univ.-Prof. Dr. Konrad Seppelt

Gutachter: 1. Prof. Dr. Walter Rosenthal
2. Prof. Dr. Hartmut Oschkinat

eingereicht: 24.10.2002

Tag der mündlichen Prüfung: 13.05.2003

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Die dem Verfahren zugrundeliegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Ich erkläre, daß ich mich bisher nicht an einer anderen Einrichtung um einen Doktorgrad beworben habe und keinen derartigen Titel besitze.

Berlin, den 9. Oktober 2002

Kerstin Zühlke

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG.....	5
SUMMARY.....	7
2. EINLEITUNG.....	9
2.1 INTRAZELLULARER TRANSPORT VON GPCR.....	11
2.2 STRUKTUR DER G PROTEIN-GEKOPPELTEN REZEPTOREN	11
2.3 BEDEUTUNG DER DISULFIDBRÜCKEN VON GPCR FÜR DIE LIGANDENBINDUNG.....	12
2.4 HETEROMERBILDUNG VON GPCR MIT HILFE VON DISULFIDBRÜCKEN.....	15
2.5 STRUKTUR UND FUNKTION DES HUMANEN VASOPRESSIN-V2-REZEPTOR	15
2.6 DIE FUNKTION DES V2-REZEPTORS	17
2.7 ROLLE DER CYSTEINE BEIM NEPHROGENEN DIABETES INSIPIDUS (NDI).....	19
2.8 ZIELSETZUNG	20
3. MATERIAL UND METHODEN	21
3.1 MATERIAL	21
3.1.1 Bakterienstämme und eukaryontische Zelllinien	21
3.1.2 Chemikalien.....	21
3.1.3 Desoxyribonukleinsäuren	23
3.1.4 Geräte.....	25
3.1.5 Medien	26
3.2 METHODEN.....	28
3.2.1 Gerichtete Mutagenese.....	28
3.2.2 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mit der Polymerase-Ketten-Reaktion.....	29
3.2.3 Spezifische DNA-Spaltung durch Verdau mit Restriktions-endonukleasen.....	30
3.2.4 Ethanol-fällung	30
3.2.5 Horizontale Agarosegelelektrophorese	31
3.2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten.....	31
3.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten.....	31
3.2.8 Herstellung von kompetenten E.coli Zellen und Transformation.....	32
3.2.9 Nukleinsäure-Isolierungsmethoden	32
3.2.10 DNA Konzentrations- und Reinheitsbestimmung	33
3.2.11 DNA-Sequenzierung nach der Dideoxymethode	34
3.2.12 Säugerzellkultur.....	34
3.2.13 Transiente Transfektion von COS M6- und HEK 293-Zellen.....	36
3.2.14 Membran-Präparation von eukaryontischen Zellen und Protein-bestimmung	36
3.2.15 Nachweise der Funktionalität des Rezeptors	37
3.2.16 Adenylylzyklase-Versuch	40
3.2.17 Mikroskopie an lebenden Zellen.....	42
3.2.18 Nachweis der Transportfähigkeit des Rezeptors über Biotinylierung	42
3.2.19 Analyse des Glykosylierungsstatus von Membranproteinen	43
3.2.20 Nachweis der Fusionsproteine	44
4. ERGEBNISSE.....	47
4.1 BEDEUTUNG DER KONSERVIERTEN CYSTEINE FÜR DEN V2-REZEPTOR UND CHARAKTERISIERUNG DREIER, NATÜRLICH VORKOMMENDER, MUTIERTER REZEPTOREN MIT ZUSÄTZLICHEN EXTRAZELLULÄREN CYSTEINEN.....	47
4.1.1 Gerichtete Mutagenese der extrazellulären Schleifen.....	47
4.1.2 [³ H]AVP-Bindungsstudien an intakten HEK293 Zellen.....	49
4.1.3 Adenylylzyklase-Assay mit isolierten Membranen von transient transfizierten HEK293-Zellen.....	50
4.1.4 Fusion der V2-Rezeptor-Mutanten mit GFP.....	52
4.1.5 Lokalisation der GFP-markierten V2-Rezeptor-Mutanten in HEK293-Zellen.....	53
4.2 ENTWICKLUNG EINES DREIDIMENSIONALEN REZEPTORMODELLS	57

4.3 EINFLUSS VON C195 AUF DIE REZEPTORFUNKTION.....	60
4.3.1 <i>Gerichtete Mutagenese von C195</i>	61
4.3.2 <i>Lokalisation der GFP-markierten V2-Rezeptor-Mutanten in HEK293-Zellen</i>	62
4.4 DIE SUBSTITUTION VON C195 FÜHRT ZUR WIEDERHERSTELLUNG EINES FUNKTIONELLEN PHÄNOTYPS BEI DEN REZEPTORMUTANTEN G185C UND R202C.....	64
4.4.1 <i>Gerichtete Mutagenesen für die Doppelmutationen</i>	64
4.4.2 <i>Pharmakologische Charakterisierung der Doppelmutanten in transient transfizierten HEK293- Zellen mit Hilfe von [³H]AVP-Bindungsstudien und Aktivitätsmessungen der Adenylylzyklase</i>	64
4.4.3 <i>Lokalisation der GFP-markierten V2-Rezeptor-Doppelmutanten G185C/C195A.GFP und R202C/C195A.GFP in HEK293-Zellen</i>	67
4.4.4 <i>Nachweis der GFP-markierten V2-Rezeptor-Doppelmutanten G185C/C195A.GFP und R202C/C195A.GFP auf HEK293-Zellen mit Hilfe der Biotinylierung</i>	69
4.6 C195 IN DER EVOLUTION DES V2-REZEPTORS.....	71
5. DISKUSSION.....	74
6. LITERATUR	81
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	90