

5. Diskussion

Bei einem Großteil aller bekannten extrazellulären NDI-verursachenden V2-Rezeptormutationen werden zusätzliche Cysteine eingeführt. Dies tritt vor allem im ersten und zweiten extrazellulären Loop auf.

Ziel dieser Arbeit war es, den Mechanismus aufzuklären, über den die zusätzlichen extrazellulären Cysteine einen NDI-bewirkenden Rezeptordefekt vermitteln.

Speziell sollte die Hypothese überprüft werden, ob diese Cysteine die Ausbildung der konservierten Disulfidbrücke stören.

Für G-Protein gekoppelte Rezeptoren konnte eine Bedeutung der konservierten Disulfidbrücke für die Funktionalität und die korrekte Bildung der Ligandenbindungsdomäne nachgewiesen werden (M3-muskarinerge Acetylcholin-Rezeptor, Kurtenbach et al., 1990; P2Y₁ Rezeptor, Moro et al., 1999; Secretin-Rezeptor, Asman et al., 2000; Rhodopsin, Karnik et al., 1988). Wird diese Brücke nicht ausgebildet, kommt es entweder zum Verlust der Ligandenbindungseigenschaften von an die Zelloberfläche transportierten Rezeptoren (Thromboxan-Rezeptor, D'Angelo et al., 1996; Tachykinin NK₁-Rezeptor, Elling et al., 2000; Gonadotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor, Cook et al., 1999) oder zu einer durch das Qualitäts-Kontrollsystem des endoplasmatischen Retikulums vermittelten Retention der Rezeptoren (M3-muskarinerge Acetylcholin-Rezeptor, Zeng et al., 1999; Rhodopsin, Karnik et al., 1988).

Beim Rhodopsin führte der Austausch eines der konservierten Cysteine (C187Y) zum Funktionsverlust (keine Chromophorenbildung) und zum Krankheitsbild der Retinitis pigmentosa (Hwa et al., 1999). Bei einer C187A Substitution konnte ein völlig verändertes Pigment Retinal noch binden. Bei Austausch des konservierten Cysteins C110 gegen Alanin, Phenylalanin oder Tyrosin kam es durch eine Verschiebung der konservierten Disulfidbrücke (S-S Verbindung jetzt zwischen C185 und C187) zum Verlust der Retinalbindungsfähigkeit.

Der M3-muskarinerge Acetylcholin-Rezeptor der Ratte (Savarese et al., 1992) zeigte nach

Mutation der konservierten Cysteine gegen Serin keine Bindung und keine G-Proteinkopplung. Gleiches wurde für den GnRH Rezeptor beschrieben (Cook et al., 1997). Ohne die Disulfidbrücke büßte der Rezeptor seine Funktionalität ein (Mutationen der konservierten Cysteine gegen Alanin). Alle oben genannten Beispiele zeigen die Bedeutung der konservierten Disulfidbrücke für die Funktion von GPCR's.

Für den V2-Rezeptor wurde in verschiedenen Veröffentlichungen darauf hingewiesen, daß NDI-bewirkende Mutationen, die in den Rezeptor extrazellulär ein zusätzliches Cystein einführen, einen Einfluß auf die konservierte Disulfidbrücke haben könnten (van den Ouweland, A.M.W. et al., 1992, Yokoyama, K. et al., 1996, Ala, Y. et al., 1998, Schöneberg et al., 1998). Der Funktionsverlust wäre damit eher durch die eingeführte Aminosäure als durch die Elimination der bestehenden bedingt.

In dieser Arbeit konnte für den humanen Vasopressin-V2-Rezeptor gezeigt werden, daß die konservierten Cysteinreste in der ersten und zweiten extrazellulären Schleife und die durch sie gebildete Disulfidbrücke für den effizienten intrazellulären Transport und für die Ligandenbindungseigenschaften des Rezeptors ausschlaggebend sind.

Die Mutanten C112S, C112A, C192S und C192A waren an der Zelloberfläche in deutlich geringeren Mengen als der wildtypische Rezeptor detektierbar (Abb. 6). In Bindungsstudien an intakten Zellen und Adenylycyclase-Assays mit Gesamtmembranen konnte zusätzlich gezeigt werden, daß die Mutanten keinerlei Aktivität hatten. (Abb. 3,4).

Warum Mutationen der konservierten extrazellulären Cysteine den Transport der Rezeptoren an die Oberfläche verringern oder verhindern, ist im Detail unklar. Wahrscheinlich erkennen aber die Chaperone des Qualitäts-Kontrollsystems im endoplasmatischen Retikulum die auf den Verlust der Disulfidbrücke beruhende Konformationsänderung des Rezeptors und halten den Rezeptor im ER zurück (Review Trombetta & Helenius, 1998). Daß die konservierten extrazellulären Cysteine und die zwischen ihnen geknüpfte Disulfidbrücke eine Bedeutung für das Einsortieren des Proteins in Transportvesikel haben, ist eher unwahrscheinlich. Derartige Sortierungssignale wurden bis jetzt bei membranständigen Proteinen nur auf zytoplasmatischer, den vesikulären Hüllproteinen zugewandter Seite beschrieben (Fiedler et al., 1996; Nishimura et al., 1997).

In dieser Arbeit wurden zwei der NDI-verursachenden V2-Rezeptormutationen untersucht, die zusätzliche Cysteine in den Rezeptor einführen. Die Rezeptormutationen G185C und R202C zeigten im Vergleich zu den Mutanten der konservierten Cysteine einen deutlich unterschiedlichen Phänotyp. Beide Rezeptoren wurden wie der wildtypische Rezeptor zur Plasmamembran transportiert, wiesen aber Bindungsdefekte auf. Dieser andere Phänotyp deutete an, daß die zusätzlichen Cysteine der NDI-bewirkenden Mutante die Ausbildung der konservierten Disulfidbrücke nicht beeinflussen.

Der NDI-verursachende Rezeptor G185C war vollständig an der Zelloberfläche (Abb. 3).

Eine durch Cotte et al. (1998) beschriebene Substitution von G185 durch Asparagin beeinflusste die AVP-Bindung dagegen nicht. Dies bedeutet, daß die Aminosäure Glutamin an der Position 185 an sich für die Rezeptorbindungsfähigkeit nicht wichtig ist. Es konnte also geschlußfolgert werden, daß der gefundene Ligandenbindungsdefekt auf das eingeführte Cystein selbst zurückzuführen ist. Wenn dieses zusätzliche Cystein die konservierte Disulfidbrücke nicht beeinträchtigt, der Defekt aber trotzdem auf das Cystein selbst zurückzuführen ist, wie ist die Ausbildung eines Rezeptordefektes dann zu erklären?

Eine Möglichkeit war die Knüpfung einer zweiten Disulfidbrücke.

Elling et al. (2000) beschrieben für den Neurokinin-1-Rezeptor, daß die konservierte Disulfidbrücke nach Einführung eines zusätzlichen Cysteins nicht beeinträchtigt wird. Stattdessen wird eine zweite Brücke zwischen zwei nichtkonservierten Cysteinen gebildet. Diese Situation könnte auch bei Mutanten des V2-Rezeptors mit zusätzlichen Cysteinen gegeben sein.

Für die G185C-Mutante wird die Ausbildung einer zweiten Disulfidbrücke zwischen dem zusätzlichen Cystein und dem dritten, im humanen Vasopressin-Rezeptor befindlichen Cystein C195 auch durch unser Strukturmodell unterstützt. Wie in der Seitenansicht des V2-Rezeptors in der Abb. 10B zu erkennen, liegt der Rest G185 in einer Höhe mit dem C195, so daß eine Verknüpfung dieser beiden Reste leicht möglich ist. Die Bildung einer zweiten Disulfidbrücke könnte den Zugang zum größeren Teil der Ligandenbindungstasche verschließen und/oder die Bindungsregion in weiter unten gelegenen Teilen verändern. Dies könnte dazu führen, daß der Ligand, wie beobachtet, nicht mehr binden kann. Die zweite Disulfidbrücke würde aber die Gesamtstruktur nicht wesentlich verändern, was die, ebenfalls beobachtete, erhaltene Transportkompetenz der Mutante erklären

würde.

Die NDI-bewirkende Mutation R202C war ebenfalls transportkompetent und bindungsdefekt. Dies deckt sich mit Daten von Tsukaguchi et al. (1995). Ala et al. (1998) zeigte, daß die Deletionsmutante Δ R202 ebenfalls an die Zelloberfläche transportiert wurde, dort aber bindungsdefekt war.

Aufgrund des transportkompetenten Phänotyps ist anzunehmen, daß auch die Mutation R202C die konservierte Disulfidbrücke nicht beeinflußt. Nach Aussage des Strukturmodells (Abb. 10) ist, ebenso wie bei der G185C-Mutante, die Ausbildung einer zweiten Disulfidbrücke wahrscheinlich. Diese könnte auch hier die Ligandenbindung beeinträchtigen, ohne die Gesamtstruktur des Rezeptors so zu stören, daß es zu einem Transportdefekt kommt.

Im Gegensatz zur G185C-Mutante konnte aber für die R202C-Mutante im wesentlich sensitiveren Adenylylzyklase-Assay eine Restaktivität des Rezeptors nachgewiesen werden (EC_{50} um das 35-fache erhöht, $E_{max} = 65\%$ des WT). Diese Aktivität ist wahrscheinlich auf niedrigaffine Bindung von AVP zurückzuführen, die im Bindungsassay nicht nachweisbar war.

Im Vergleich zum [3 H]AVP-Bindungsassay war das Ausmaß der Adenylylzyklase-Stimulierbarkeit bei der R202C-Mutante jedoch überraschend ($E_{max} = 65\%$ des WT). Geht man näherungsweise von einem 35-fach erhöhten K_D -Wert aus (entsprechend der Erhöhung der EC_{50}), sollte eine spezifische Bindung spätestens bei einer Konzentration von ≥ 50 nM [3 H]AVP nachzuweisen sein, was aber nicht der Fall war. Möglicherweise geht im Fall der R202C-Mutante eine niedrig affine Bindungsstelle mit einer Konformation einher, die eine effektivere G-Protein Kopplung zuläßt.

Um einen weiteren Anhaltspunkt für die Bildung der zweiten Disulfidbrücke bei den Mutanten G185C und R202C zu erhalten, wurde zusätzlich C195 gegen Serin bzw. Alanin ausgetauscht. In diesen Doppelmutanten kann es nicht zur Bildung einer zusätzlichen Disulfidbrücke kommen, da nur drei extrazelluläre Cysteine vorhanden sind. Im günstigsten Fall sollten die in ihrer Funktion gestörten Rezeptormutanten daher wieder funktionsfähig sein.

Schulz, A. et al. (2000) beschrieben, daß das Cystein an der Stelle 195 an sich keinen Einfluß auf die Funktion des Vasopressin-Rezeptors hat. Alle Effekte in diesen Doppelmutanten sind also nicht auf den Cysteinaustausch zurückzuführen.

Die Substitution des Restes C195 in den beiden NDI-bewirkenden mutierten Rezeptoren bewirkt tatsächlich wieder Rezeptoren mit wildtypischen K_D -Werten für die AVP-Bindung.

Unterschiede gab es allerdings bei den B_{max} -Werten. Während die B_{max} der Doppelmutante G185C/C195A.GFP mit der des Wildtyps vergleichbar war, waren die für die Doppelmutante R202C/C195A.GFP deutlich reduziert (Abb. 16, 17). Lokalisierungsstudien mit Hilfe der Laser-Scanning-Mikroskopie (Abb. 18), Analysen des Glykosylierungsstatus (Abb. 19) und die Biotinylierungsassays (Abb. 20) zeigten übereinstimmend, daß die reduzierte B_{max} der Doppelmutante R202C/C195A.GFP weder auf eine geringere Expression noch auf einen verminderten Transport an die Zelloberfläche zurückzuführen sein kann. Eine mögliche Erklärung dieses Befundes wäre, daß diese Doppelmutante an der Zelloberfläche in einem gemischten Zustand aus funktionellen und nicht funktionellen Rezeptoren vorliegt. Das durch die zweite Mutation freigewordene Cystein in der Position 202 könnte initial einen instabilen Faltungszustand bewirken, der sowohl die Ausbildung eines bindungskompetenten als auch die eines bindungsdefekten Rezeptors ermöglicht.

Auch bei dem wesentlich sensitiveren Adenylylzyklase-Assay konnten wir eine Wiederherstellung der Rezeptorfunktion zeigen. Der EC_{50} -Wert der Doppelmutante G185C/C195A.GFP überschneidet sich mit dem des Wildtyps und der EC_{50} -Wert der Mutante R202C/C195A.GFP war leicht nach rechts verschoben (siehe Abb. 11). Im Vergleich zu den GFP-gekoppelten NDI-auslösenden Einzelmutanten konnte also eine Restitution der Rezeptorfunktionalität nachgewiesen werden.

Die für die Einzelmutante R202C schon gezeigte cAMP-Bildung (siehe Abb. 4) wiederholte sich erwarteterweise im Adenylylzyklase-Assay der GFP-gekoppelten Mutante. Auch für die G185C.GFP-Mutante wurde in diesem Assay – im Gegensatz zur ungekoppelten Mutante – Adenylylzyklase-stimulierende Aktivität nachgewiesen. Diese Aktivität ist in diesem Fall auf das Vorhandensein des GFP-Restes zurückzuführen, der den mutierten Rezeptor zu stabilisieren scheint.

Beim V2-Rezeptor gibt es neben G185C und R202C noch weitere Mutationen, die extrazellulär zusätzliche Cysteine einführen und Diabetes insipidus hervorrufen. Das Cystein des mutierten Rezeptors R106C liegt nach unserem Strukturmodell in derselben Ebene wie die zusätzlichen Cysteine der Mutanten G185C und R202C. Es könnte also ähnlich leicht mit C195 verknüpft werden. Die funktionellen Eigenschaften der R106C Mutante sind zwar noch nicht

beschrieben worden, eine Bildung einer zweiten Disulfidbrücke erscheint aber hier ebenfalls sehr wahrscheinlich.

Dasselbe dürfte für den Rezeptor R181C gelten. Obwohl dessen zusätzliches Cystein weiter im Rezeptorinneren liegt, ist es trotzdem dicht genug am C195, um eine zweite Disulfidbrücke ausbilden zu können. Dies stimmt auch mit den von Pan et al. (1995) veröffentlichten Daten überein, nach denen dieser mutierte Rezeptor zwar bindungsdefekt ist, aber zur Plasmamembran transportiert wird. Der Phänotyp entspricht damit dem der G185C- und R202C-Mutanten.

Hwa et al. (1999) und Kono et al. (1998) beschrieben für Rhodopsin nach Einführung eines zusätzlichen extrazellulären Cysteins die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen einem konservierten und einem nicht konservierten Cystein. Auf den ersten Blick wäre dies auch für den V2-Rezeptor denkbar. Anstelle der konservierten Brücke und der postulierten zweiten Disulfidbrücke zwischen dem vorhandenen C195 im V2-Rezeptor und dem zusätzlich eingeführten Cystein könnte, angelehnt an die oben genannte Veröffentlichung, Disulfidbrücken zwischen je einem konservierten und einem nicht konservierten Cystein entstehen (z.B. die Kombination C112 mit C195 und C192 mit C185 oder C112 mit C185 und C192 mit C195). Für den Vasopressin-V2-Rezeptor sind allerdings die zuletzt genannten Kombinationen nicht sehr wahrscheinlich, da in jedem Fall die konservierte Disulfidbrücke aufgelöst wird. Dies müßte zu transportdefekten Rezeptoren führen, die aber nicht beobachtet wurden.

Der direkte Nachweis der Bildung einer zweiten Disulfidbrücke bei den entsprechenden V2-Rezeptormutanten sollte eines der zukünftigen Ziele sein.

Mit Hilfe von DTT kann ganz allgemein die Existenz von Disulfidbrücken verifiziert werden, da das Reagenz bestehende Brücken reduziert. Noda et al. (1994) bewiesen die Verknüpfung zweier Cysteine des β_2 -adrenergen Rezeptors mit Hilfe dieser reduzierenden Substanz. In der elektrophoretischen Auftrennung zeigte dieses mit DTT behandelte Protein ein anderes Laufverhalten als das native Protein. Auch beim Einsatz von β -Mercaptoethanol kommt es zur Reduktion der vorhandenen Disulfidverbindungen. Das reduzierte Protein hat im Gel eine wesentlich langsamere Laufgeschwindigkeit. Durch den Vergleich des Laufverhaltens von reduziertem und nichreduziertem Protein kann leicht auf das Vorhandensein einer Disulfidbrücke geschlossen werden. Mit Hilfe dieser Methoden ist aber weder die Tatsache festzustellen, daß zwei Disulfidbrücken gebildet werden, noch die genaue Positionierung dieser.

Freie SH-Gruppen von Membranproteinen können mit N-Ethylmaleimid markiert werden (Bose et al., 1997; Kurtenbach et al., 1990; Kono et al., 1998). Mit Hilfe dieser Methode könnte man zeigen, ob in den NDI-Mutanten G185C und R202C noch freie Cysteinreste vorhanden sind. Das Fehlen einer solchen Markierung würde zeigen, daß keine freien SH-Gruppen vorhanden sind und tatsächlich zwei Brücken gebildet werden. Die Erhöhung der molekularen Masse des G Protein-gekoppelten Rezeptorproteins nach Kopplung des N-Ethylmaleimid an Sulfhydrylgruppen kann durch elektrophoretische Trennung im SDS-Gel leicht nachgewiesen werden.

Eine Möglichkeit, um die Lage der Disulfidbrücken genau zu lokalisieren, besteht in der Rezeptor-Isolierung mit folgender proteolytischen Spaltung (z.B. mit Trypsin oder Chymotrypsin) und dem Nachweis der disulfidverbundenen Fragmente im Massenspektrometer. Aus der Größe der gefundenen Fragmente ließe sich dann auf die Verknüpfung der Cysteine schließen. Da es aber sehr schwierig ist, eine ausreichende Menge des Rezeptors zu isolieren, bedarf diese Methode intensiver Vorbereitungen.

Desweiteren sollte in der Zukunft überprüft werden, ob bei den noch nicht untersuchten V2-Rezeptormutanten R181C und R106C ebenfalls eine zweite Disulfidbrücke gebildet wird.

Ein nächster, noch zu untersuchender Punkt sind mögliche Funktionen von C195 im menschlichen V2-Rezeptor, die durch Bindung und AC-Assay nicht erfaßt werden. Dieser Rest ist nur bei höheren Primaten im V2-Rezeptor vorhanden und eigentlich nachteilig, da er den Rezeptor für Cystein-Mutationen sensitiv macht. Es stellt sich die Frage, wozu dieser Rest in der Evolution eingeführt wurde.

Eine mögliche Erklärung wäre die Beteiligung dieses Restes an der Dimerisierung des Rezeptors. Wess et al. (2000) beschrieben, daß der N-Terminus, der C-Terminus und auch transmembranäre Regionen des M3-muskarinergen Acetylcholin-Rezeptors an einer Dimerisierung beteiligt sein könnten. Für den Gonadotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor wurde postuliert, daß ein freier Cysteinrest (C14A) in die Dimerbildung involviert sein könnte (Cook et al., 1997). Die Beteiligung eines einzelnen N-terminalen Cysteins an der Dimerisierung ist bereits bei nicht verwandten Rezeptoren gezeigt worden, wie z.B. dem epidermalen Wachstums-Faktor-Rezeptor und dem Insulin-Rezeptor. Wenn C195 aber beim V2-Rezeptor eine Dimerisierung vermittelt, dürften die Rezeptoren der Nicht-Primaten und der niederen Primaten durch das Fehlen des Cysteins in Position 195 nur Monomere bilden, was experimentell überprüft werden müßte.