

Aus dem Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Berlin

Eingereicht über das Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

---

**Charakterisierung einer transportrelevanten  
Domäne im intrazellulären C-Terminus des  
humanen Vasopressin-V2-Rezeptors**

---

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität zu Gießen

**Ricardo E. Hermosilla**



Aus dem Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Berlin

Eingereicht über das Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Charakterisierung einer transportrelevanten  
Domäne im intrazellulären C-Terminus des  
humanen Vasopressin-V2-Rezeptors

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität zu Gießen

**Ricardo E. Hermosilla**



Aus dem Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Berlin

Betreuer: Prof. Dr. W. Rosenthal

Eingereicht über das Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. E. Petzinger

# Charakterisierung einer transportrelevanten Domäne im intrazellulären C-Terminus des humanen Vasopressin-V2-Rezeptors

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Ricardo E. Hermosilla**

Tierarzt aus Santiago de Chile, Chile

**Gießen 2000**

**Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Die folgende Arbeit wurde im Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie der  
Justus-Liebig-Universität Gießen und im Forschungsinstitut für Molekulare  
Pharmakologie Berlin vom Oktober 1995 bis März 2000 bei Prof. Dr. W. Rosenthal  
angefertigt.

**Dekan:** Prof. Dr. M. Reinacher

**1. Berichterstatter:** Prof. Dr. Walter Rosenthal

**2. Berichterstatter:** Prof. Dr. Ernst Petzinger

**Tag der mündlichen Prüfung:** 15.12.2000

Gedruckt mit Unterstützung des Deutschen Akademischen Austauschdienstes.

A mis padres

A mi amiga, polola y esposa Loreto

y a Pablo Neruda

XXXI

A quién le puedo preguntar  
qué vine a hacer en este  
mundo?

Por qué me muevo sin querer,  
por qué no puedo estar  
inmóvil?

Por qué voy rodando sin ruedas,  
volando sin alas ni plumas,

y qué me dio por transmigrar  
si viven en Chile mis huesos?

De El Libro de las Preguntas

Pablo Neruda

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>3</b>
2.1	Einführung.....	3
2.2	Ko- und postranslationale Modifikationen des V2-Rezeptors.....	6
2.3	Intrazellulärer Transport von GPCR.....	9
2.3.1	Transportsignale von GPCR.....	11
2.4	Transportsignale bei anderen Membranproteinen.....	12
2.4.1	Signale für den Transport vom ER zum Golgi-Apparat.....	13
2.4.2	Dileucinmotive als Transportsignale für Post-ER-Kompartimente.....	15
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>17</b>
3.1	Material.....	17
3.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	17
3.1.2	Geräte und Rechner.....	21
3.1.3	Bakterienstämme, Phagen und eukaryontische Zelllinien.....	24
3.1.4	Desoxyribonukleinsäuren (DNA).....	25
3.1.5	Flüssigmedien und Agarplatten für <i>Escherichia coli</i> .....	29
3.1.6	Antibiotika und andere Medienzusätze.....	30
3.2	Methoden.....	32
3.2.1	Nukleinsäurefällungs- und -extraktionsmethoden.....	32
3.2.2	Nukleinsäureisolierungsmethoden.....	34
3.2.3	Spezifische DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen.....	36
3.2.4	Horizontale Agarosegelelektrophorese.....	37
3.2.5	Isolierung von DNA-Fragmenten mit Hilfe des Gene-Clean-Kit.....	38
3.2.6	Modifizierung von DNA-Fragmenten.....	38
3.2.7	Ligation von DNA-Fragmenten.....	40
3.2.8	Amplifizierung von DNA-Fragmenten mit der Polymerase-Ketten-Reaktion.....	41
3.2.9	Herstellung kompetenter Zellen und Transformation von <i>E. coli</i> .....	42
3.2.10	Gerichtete Mutagenese mit Hilfe des „Sculptor™ <i>in vitro</i> Mutagenesis System“.....	44
3.2.11	Gerichtete Mutagenese mit Hilfe des „QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit“.....	50
3.2.12	DNA-Sequenzierung nach der Dideoxymethode.....	54
3.2.13	Transiente Transfektion von COS.M6-Zellen.....	55
3.2.14	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	58
3.2.15	Gesamtmembran-Präparation von eukaryontischen Zellen.....	59
3.2.16	Nachweis der Fusionsproteine im Western Blot.....	63
3.2.17	Bindungsexperimente mit [ <sup>3</sup> H]AVP.....	70
3.2.18	Adenylylzyklase-Versuch.....	76

3.2.19	Immunfluoreszenzstudien.....	79
3.2.20	Mikroskopie an lebenden Zellen.....	80
3.2.21	Erstellung eines V2-Rezeptor-Strukturmodells.....	81
3.2.22	Statistische Auswertungen.....	82
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>83</b>
4.1	Das Glutamat/Dileucinmotiv: Ein mögliches Transportsignal im intrazellulären C-Terminus des V2-Rezeptors.....	83
4.1.1	Gerichtete Mutagenese des Glutamat/Dileucinmotivs.....	84
4.2	Das Glutamat/Dileucinmotiv ist für den Transport des V2-Rezeptors zur Plasmamembran notwendig .....	86
4.2.1	[ <sup>3</sup> H]AVP-Bindungsstudien an intakten COS.M6-Zellen.....	86
4.2.2	Immunfluoreszenzstudien mit <i>c-myc</i> -markierten V2-Rezeptoren in COS.M6-Zellen.....	88
4.2.3	[ <sup>3</sup> H]AVP-Bindungsstudien an Gesamtmembranen von COS.M6-Zellen.....	92
4.3	Das Glutamat/Dileucinmotiv ist für den Transport des V2-Rezeptors vom ER zum Golgi-Apparat notwendig.....	93
4.3.1	Fusion der Rezeptor-Mutanten mit <i>PhoA</i> .....	93
4.3.2	Fusion der V2-Rezeptor-Mutanten mit GFP .....	95
4.3.3	Lokalisation der GFP-markierten V2-Rezeptor-Mutanten in COS.M6-Zellen.....	100
4.3.4	Analyse des Glykosylierungsstatus der GFP-markierten V2-Rezeptor-Mutanten in COS.M6-Zellen.....	104
4.4	Das Glutamat/Dileucinmotiv ist in einem Minirezeptor, das unabhängig von der Gesamtzeptorfaltung ist, nicht transportrelevant .....	107
4.4.1	Konstruktion eines Modellrezeptorprotein für eine faltungsunabhängige Translokation des C-Terminus des V2-Rezeptors.....	107
4.4.2	Konstruktion der GFP-markierten V2-Rezeptorfragmente .....	110
4.4.3	Lokalisation der GFP-markierten V2-Rezeptorfragmente in HEK293-Zellen.....	114
4.4.4	Analyse des Glykosylierungsstatus der GFP-markierten V2-Rezeptorfragmente in transient transfizierten HEK293-Zellen.....	116
4.5	Erstellung eines Strukturmodells für den intrazellulären C-Terminus des V2-Rezeptors.....	119
4.6	Gerichtete Mutagenesen zur Überprüfung des Strukturmodells .....	125
4.6.1	Einführung der Mutationen L62P und ΔL62-R64.....	125
4.6.2	Pharmakologische Charakterisierung der mutierten Rezeptoren L62P und ΔL62-R64...125	
4.6.3	Lokalisation der GFP-markierten Rezeptor-Mutanten in HEK293-Zellen.....	127
4.6.4	Analyse des Glykosylierungsstatus der GFP-markierten V2-Rezeptor-Mutanten.....	128
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>130</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>138</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>140</b>

<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>142</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>161</b>

## Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
$\lambda_{em}$	Emissionswellenlänge
$\lambda_{exc}$	Anregungswellenlänge
A	Absorption
Abb.	Abbildung
AC	Adenylylzyklase
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AT	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
AQP2	Aquaporin 2
AVP	Arginin-Vasopressin
B	Basen
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-Dinatriumsalz
Bip	IgG heavy chain binding protein
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
$B_{MAX}$	maximale Bindung
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBB	Coomassie-Proteinreagenz Brillantblau G250
cDNA	komplementäre (complementary) DNA
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CIC-K	basolateraler Chloridkanal der Niere
COS-cells	african green monkey kidney cells
cpm	counts per minute (Impulse pro Minute)
DABC	1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]Oktan
deion.	deionisiert
DEPC	Diethylpyrocarbonat

DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMFA	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP's	Desoxyribonukleotid-Gemisch
dpm	desintegration per minute (Zerfall pro Minute)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreitol
EC <sub>50</sub>	Konzentration, bei der 50% des Maximaleffekts erreicht werden
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Titrierkomplex III)
EGTA	Ethylendiamin-Glykol-bis-(β-Aminoethylether)-Tetraessigsäure
EK	Endkonzentration
EMBL	European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg
<i>EndoH</i>	Endoglykosidase H
ER	endoplasmatisches Retikulum
FKS	fetales Kälberserum
FMP-Berlin	Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Berlin
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GFP	green fluorescent protein (grün fluoreszierendes Protein aus <i>Aequorea victoria</i> )
GPCR	G protein-coupled receptor (G-Protein-gekoppelter Rezeptor)
GRK	G protein-coupled receptor kinase (G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase)
GTP	Guanosintriphosphat
HEK293-cells	human embryonic kidney cells
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
IBMX	3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthine
IE	internationale Einheiten
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IPTG	Isopropyl-1-Thio-β-D-Galaktopyranosid

IZS	intrazelluläre Schleife
$K_D$	Dissoziationskonstante
LB	Luria Bertani
LH/CG	Luteotropin/Choriogonadotropin
LSM	Laser Scanning Mikroskop(ie)
LVP	Lysin-Vasopressin
MR	Mineralokortikoidrezeptor
MDCKII-cells	Madin-Darby canine kidney cells type II
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
NBT	p-Nitrotetrazoliumblausäure
NDI	nephrogener <i>Diabetes insipidus</i>
NKCC	Natrium-Kalium-2-Chlorid Transporter
NMR	nuclear magnetic resonance (Kernspinresonanz)
NOE	intermolekulare Wechselwirkung
NPII	Neurophysin Typ II
NP-40	Ethylphenyl-Polyethylenglycol
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatpuffer in physiologischer Kochsalzlösung)
PC	personal computer (Rechner)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PDB	Brookhaven-Proteindatenbank
PDB-ID	Brookhaven-Proteindatenbank Identifikationsnummer
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PGE1	Prostaglandin E1
<i>PhoA</i>	alkalische Phosphatase aus <i>Escherichia coli</i>
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>PNGaseF</i>	Peptid-Endoglykosidase F
Prot.	Protein
PTH	Parathyroid Hormon

rLH	Ratten Luteotropin/Choriogonadotropin
RNA	Ribonukleinsäure
ROMK	ATP-regulierter Kaliumkanal
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
STV	solution trypsin <i>versene</i> (Trypsin-Lösung)
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGN	transgolgi network (Transgolgi-Netzwerk)
TMD	transmembranäre Domäne
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Triton X-100 <sup>®</sup>	Octylphenylpoly(ethylenglykolether) <sub>n</sub>
TSH	Thyrotropin
UT1	(urea transporter typ I) Phloretin-sensitiver Harnstofftransporter
v	Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktosid

## 1 Einleitung

Der humane Vasopressin-V2-Rezeptor (V2-Rezeptor) gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). GPCR bilden die größte Proteinfamilie bei Wirbeltieren mit bisher rund 1000-2000 beschriebenen Rezeptortypen (> 1% des Genoms) (BOCKAERT UND PIN, 1999). Alle GPCR sind integrale Membranproteine mit sieben hydrophoben transmembranären Domänen (TMD). Sie koppeln nach Bindung eines Agonisten an heterotrimere G-Proteine. GPCR werden von unterschiedlichen, endogenen Agonisten aktiviert, unter anderem von Purinen, Nukleotiden, biogenen Aminen, Peptiden, Aminosäuren, Eikosanoiden, Retinal, Lipiden, Kationen, Geruchs- und Geschmacksstoffen und Photonen. GPCR stellen ferner wichtige Zielstrukturen für Pharmaka dar.

GPCR werden in einer Vielzahl von Geweben exprimiert. Wie andere integrale Membranproteine auch werden sie noch während der Translation in die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) eingefädelt und über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran der Zelle transportiert, wo sie ihre Funktion ausüben können. Über die Signale, die den intrazellulären Transport dieser Rezeptorproteine steuern, ist wenig bekannt. Die Lokalisation der Rezeptoren in ihrem „richtigen“ zellulären Membrankompartiment, der Plasmamembran, ist eine entscheidende Voraussetzung für die Funktion der Signalkette. GPCR können selbst innerhalb der Plasmamembran noch in verschiedene Kompartimente sortiert werden, wie z.B. in die apikale und basolaterale Membran polarisierter Epithelzellen. Ein Ziel dieser Arbeit war es, am Beispiel des V2-Rezeptors Proteindomänen zu charakterisieren, die diesen intrazellulären Transport steuern.

Für das Studium des intrazellulären Transports von GPCR ist der V2-Rezeptor besonders gut geeignet. Zum einen wird der Rezeptor natürlicherweise in Epithelzellen exprimiert, d.h. der Transport zur Plasmamembran erfährt hier die oben

erwähnte hohe Differenzierung. Zum anderen sind Transportstudien hier auch klinisch relevant.

Der V2-Rezeptor (s. Abb. 1) vermittelt in den Epithelzellen der Niere nach Bindung des Hormons Arginin-Vasopressin (AVP) eine regulierte Wasserrückresorption aus dem Tubuluslumen. Mutationen im Gen des V2-Rezeptors führen zum nephrogenen *Diabetes insipidus* (NDI), einer Krankheit, bei der diese regulierte Wasserrückresorption nicht mehr möglich ist. Viele dieser mutierten Rezeptoren sind transportdefekt, d.h. die Rezeptoren bleiben in intrazellulären Membrankompartimenten stecken. Die Untersuchung des Rezeptortransports in diesem System kann daher auch neue Angriffspunkte für Pharmaka liefern.

Die Signale für den intrazellulären Transport von GPCR sind bis heute unzureichend charakterisiert. Die vorliegende Arbeit wollte zu dieser Fragestellung am Beispiel des V2-Rezeptors einen Beitrag leisten. Durch die gezielte Mutagenese von Aminosäuren wurde eine Sequenz gefunden, die für einen transportkompetenten Faltungszustand des Rezeptors im ER wichtig ist.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Einführung

Die Fähigkeit der Niere, den Urin bei einem Wasserdefizit zu konzentrieren, ist von zentraler Bedeutung für das Überleben der terrestrisch lebenden Säugetiere. Die Regulation des Wasserhaushaltes unterliegt einer strengen Kontrolle: Die Erhöhung der Plasmaosmolarität ( $> 2\%$ ) oder eine Verminderung des Plasmavolumens ( $> 10\%$ ) führen zu einer Sekretion des antidiuretischen Hormons (ADH) bzw. AVP.

AVP ist ein zyklisches Nonapeptid, dessen Aminosäuresequenz bei vielen Säugern identisch ist. Nur das Hausschwein und Beuteltiere haben an Position 8 anstelle eines Arginin- einen Lysin-Rest (LVP). Bei Reptilien, Amphibien und Wirbellosen wird der Wasserhaushalt ebenfalls über Vasopressin-ähnliche Peptide (Mesotocin, Phenypressin, Arginin-Vasotocin, Arginin-Conopressin, Lysin-Conopressin) reguliert (SPINDLER, 1997; JACKSON, 1996). AVP wird beim Menschen als AVP-NPII-Präprohormon von den magnozellularen Neuronen der *Nuclei supraopticus et paraventricularis* im Hypothalamus gebildet. Das Präprohormon wird während des intrazellulären Transports in den neurosekretorischen Granula prozessiert, so dass bei der Hormonausschüttung nur AVP und das Trägerprotein NPII ins Blut gelangen (OKSCHE UND ROSENTHAL, 1999).

AVP ist der endogene Agonist des V<sub>2</sub>-Rezeptors beim Menschen und anderen Säugetieren. AVP wird bei Wasserdefizit im Organismus von der Neurohypophyse freigesetzt und bewirkt die Erhöhung der Wasserrückresorption in der Medulla der Niere. Bei Säugetieren ruft es zudem eine Gefäßverengung hervor, daher auch der Name Arginin-Vasopressin. Der humane V<sub>2</sub>-Rezeptor wird hauptsächlich in den epithelialen Prinzipalzellen des Sammelrohrs der Niere exprimiert. Weitere Expressionsorte des V<sub>2</sub>-Rezeptors sind der dünne und dicke aufsteigende Teil der

Henleschen Schleife (KIM et al., 1999) und die Arkaden des Nierenkortex (bei der Ratte) (KISHORE et al., 1996).

Im Sammelrohr führt die Bindung von AVP an den Rezeptor zu einer Konformationsänderung, die die Bindung und Aktivierung des heterotrimeren  $G_s$  Proteins erlaubt. Aktiviertes  $G_s$  stimuliert dann die membranständige Adenylzyklase (AC) (Subtyp V und VI, aber auch in geringen Mengen Subtyp IV und IX) (SHEN et al., 1997), die den Botenstoff („second messenger“) zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP) bildet und auf diese Weise das Rezeptorsignal weiter geleitet. Der cAMP-Anstieg hat die Aktivierung einer cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) zur Folge, die einen wasserselektiven Kanal (Aquaporin 2, AQP2) phosphoryliert, der in intrazellulären Vesikeln vorliegt. Der Endpunkt der V2-Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion ist schließlich die Fusion der AQP2-tragenden Vesikel mit der apikalen Plasmamembran der Prinzipalzelle (KLUSSMANN et al., 2000). Durch den AQP2-Kanal kann jetzt verstärkt Wasser in die Zelle hineinfließen und durch AQP3- und AQP4-Kanäle der basolateralen Membran in das Interstitium zurückfließen. Die treibende Kraft für diese hormongesteuerte Antidiurese ist der osmotische Gradient (hauptsächlich NaCl und Harnstoff) zwischen dem Lumen des Sammelrohrs und dem Interstitium der inneren Medulla.

Im letzten Abschnitt des Sammelrohrs wird durch AVP auch die Harnstoff-Rückresorption reguliert. Ein AVP-abhängiger, Phloretin-sensitiver Harnstofftransporter (UT1) wird sowohl in der apikalen, als auch in der basolateralen Membran des Sammelrohrepithels der inneren Medulla exprimiert (SHAYAKUL et al., 1996). Limitierend für die Harnstoff-Rückresorption ist jedoch UT1 in der apikalen Membran (STAR, 1990). Die Harnstoffpermeabilität wird im terminalen Sammelrohrepithel der inneren Medulla durch die AVP-vermittelte Phosphorylierung von UT1 in der apikalen Membran erhöht (SHAYAKUL et al., 1996). Durch die verstärkte Rückresorption von Harnstoff in das Interstitium der inneren Medulla wird der osmotische Gradient erhöht und auf diese Weise auch die treibende Kraft der Wasserrückresorption unterstützt.

Ein weiterer V2-Rezeptor-vermittelter Effekt ist die Rückresorption von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  im dicken aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife des Nephrons, die über den Natrium-Kalium-2-Chlorid Transporter (NKCC) verläuft (KIM et al., 1999). Auch die Expression der in der basolateralen Membran lokalisierten  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase wird in diesen Zellen über AVP und V2-Rezeptoren reguliert (CHARLTON UND BAYLIS, 1990). In demselben Nephronsegment werden auch der apikal lokalisierte, ATP-regulierte Kaliumkanal (ROMK) und der basolateral lokalisierte, nierenspezifische Chloridkanal (ClC-K) über AVP und V2-Rezeptoren reguliert (KIM et al., 1999). Es kommt dadurch ebenfalls zu einer Erhöhung der Osmolarität im Interstitium der Medulla und zu einer Verstärkung der AVP-vermittelten Wasserrückresorption.

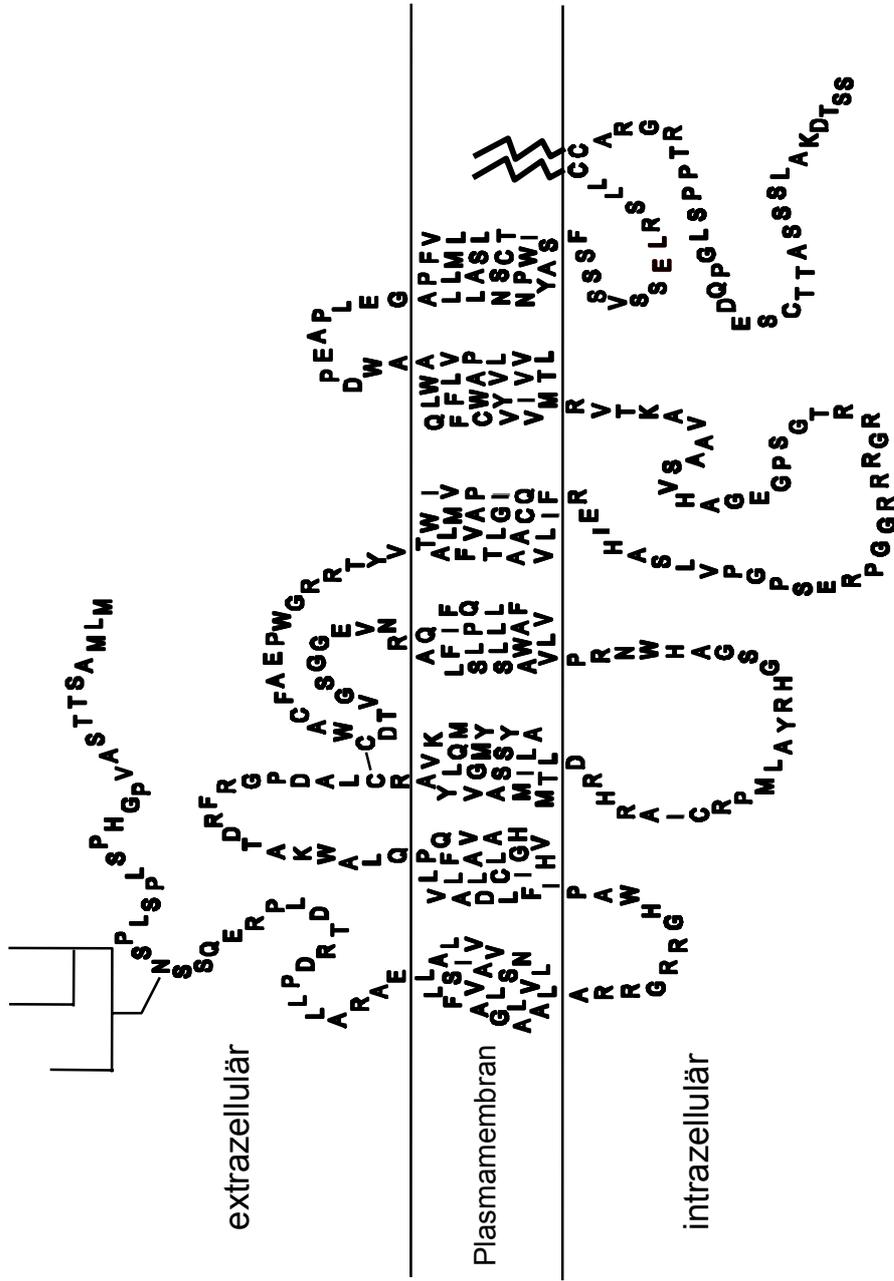
Im Sammelrohr existiert zusätzlich auch eine Interaktion von Aldosteron und AVP: AVP stimuliert über den V2-Rezeptor die  $11\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase, welche endogene Glukokortikoide (Cortisol und Corticosteron) inaktiviert. Dadurch wird die selektive Aktivierung von intrazellulären Mineralokortikoidrezeptoren (MR) durch Aldosteron gewährleistet (und eine Stimulation durch zirkulierende Glukokortikoide vermieden, die auch eine hohe Affinität zu MR haben) (ALFAIDY et al., 1997). Auf diese Weise unterstützt AVP zusätzlich die Aldosteron-gesteuerte Rückresorption von  $\text{Na}^+$ .

Zahlreiche Erkrankungen beim Menschen und Tier werden durch Mutationen in Rezeptorgenen hervorgerufen. Ein Beispiel für eine solche Erkrankung ist der X-chromosomal vererbte NDI, dem Mutationen im Gen des V2-Rezeptors zugrunde liegen (ROSENTHAL et al., 1992; OKSCHE UND ROSENTHAL, 1998). Bei dieser Krankheit ist die Sensitivität der Niere für AVP verringert oder nicht mehr vorhanden. Viele dieser Mutationen führen zu V2-Rezeptoren, die in der Zelle retiniert werden (SADEGHI et al., 1997a; OKSCHE et al., 1998; KRAUSE et al., 2000). Gerade unter diesem Aspekt ist das Studium des intrazellulären Transports dieses Rezeptors besonders interessant. Die Aufklärung der Mechanismen des intrazellulären Rezeptortransports könnte hier auch neue pharmakotherapeutische Interventionsmöglichkeiten eröffnen.

## 2.2 Ko- und postranslationale Modifikationen des V2-Rezeptors

Der V2-Rezeptor besteht aus 371 Aminosäuren. Er gehört zur Superfamilie der GPCR und teilt die gemeinsamen Merkmale dieser Familie: Sie haben einen extrazellulären N-Terminus, sieben transmembranäre Domänen (TMD) und einen intrazellulären C-Terminus (s. Abb. 1). Eine Ausnahme stellt hier das Rhodopsin dar, das sich in den intrazellulären Disks-Membranen der Photorezeptorzellen befindet. Hier ist der N-Terminus intradiskal (intraluminal) und nicht extrazellulär lokalisiert (DERETIC et al., 1998).

Der V2-Rezeptor wird im ER und im Golgi-Apparat ko- und postranslational modifiziert. Im ER bildet sich höchstwahrscheinlich die bei vielen GPCR konservierte Disulfidbrücke zwischen der ersten und der zweiten extrazellulären Schleife aus (Reste C112 und C192 beim V2-Rezeptor; s. Abb. 1). Beim V2-Rezeptor scheint die Disulfidbrücke für die Ligandenbindung, aber auch für einen effizienten intrazellulären Transport notwendig zu sein (SCHÜLEIN et al., 2000). Ein ähnliches Ergebnis wurde kürzlich auch für den m3-muskarinergen Rezeptor beschrieben (ZENG et al., 1999).



**Abb. 1: Zweidimensionales Topologiemodell des humanen V2-Rezeptor.** Gezeigt wird die Aminosäuresequenz, die Glykosylierung an N22, die Disulfidbrücke zwischen C112-C192 und die Palmitoylierung an C341 und C342.

Der Rest N22 im N-Terminus erfährt eine N-Glykosylierung (SCHÜLEIN et al., 1996b) (s. Abb. 1). Im ER erfolgt an diesem Rest zunächst eine mannosereiche Glykosylierung (INNAMORATI et al., 1996). Im Golgi-Apparat wird dann das mannosereiche Glykan durch ein komplexes Glykan ersetzt (komplexe Glykosylierung) (INNAMORATI et al., 1996; SCHÜLEIN et al., 1998a). Die unterschiedliche biochemische Zusammensetzung der Glykane erlaubt eine genauere subzelluläre Lokalisation der Rezeptorproteine. Im Golgi-Apparat werden zusätzlich weitere Zuckerreste (O-Glykosylierung) an Serin- und Threonin-Reste im N-Terminus kovalent gebunden (SADEGHI UND BIRNBAUMER, 1999). Die Glykosylierung des N-Terminus des V2-Rezeptors ist ein guter Marker für die korrekte Orientierung der ersten TMD, vor allem für Mutanten die eine Trunkierung des Rezeptors zur Folge haben (SCHÜLEIN et al., 1996b). Dies beruht auf der Tatsache, dass eine N-Glykosylierung nur im Lumen des ER stattfinden kann (LIS UND SHARON, 1993).

Die biologische Funktion der Glykosylierung des N-Terminus ist bis heute sowohl beim V2-Rezeptor als auch bei anderen GPCR nicht vollkommen verstanden. So wurden z.B. auch Rezeptoren beschrieben, die keine Glykosylierung aufweisen ( $\alpha_{2B}$ -adrenerge Rezeptor; WEINSHANK et al., 1990). Der Calcium-Rezeptor dagegen verfügt über 11 potentielle Glykosylierungsstellen. Nur vier dieser Stellen werden aber tatsächlich glykosyliert. Drei davon sind für die Oberflächenexpression des Rezeptors kritisch, aber nicht für die Signaltransduktion, die über diese Rezeptoren vermittelt wird (RAY et al., 1998). Für den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor konnte gezeigt werden, dass seine nicht-glykosylierte Form keine wesentlichen Unterschiede zur wildtypischen Form aufweist (RANDS et al., 1990). Für den V2-Rezeptor wurden ähnliche Ergebnisse erhalten. Auch hier zeigte die Glykosylierungsmutante wildtypische Eigenschaften (INNAMORATI et al., 1996; SADEGHI et al., 1997b).

Beim V2-Rezeptor werden die Cysteinreste 341 und 342 im intrazellulären C-Terminus mit Palmitinsäure acyliert (SCHÜLEIN et al., 1996a) (s. Abb. 1). Es wird vermutet, dass diese reversible postranslationale Palmitoylierung, die zwischen ER und Golgi-Apparat stattfindet (BONATTI et al., 1989), für die Insertion des C-Terminus in die Plasmamembran wichtig ist, und dass sich auf diese Weise eine vierte intrazelluläre Schleife (IZS4) bildet (KRAUSE et al., 2000). Für den V2-Rezeptor

konnte gezeigt werden, dass die Mutagenese beider Cysteinreste den Transport des Rezeptors zur Plasmamembran vermindert (SCHÜLEIN et al., 1996a; SADEGHI et al., 1997c).

Der V2-Rezeptor wird nach seiner Aktivierung im C-Terminus reversibel phosphoryliert, wahrscheinlich durch GPCR-Kinasen (GRK) (INNAMORATI et al., 1997). Von anderen GPCR weiß man, dass die Phosphorylierungen für die Rezeptor-Desensitivierung wichtig sind (INGLESE et al., 1993). Die phosphorylierten Rezeptoren können mit dem inhibitorischen Protein  $\beta$ -Arrestin interagieren, was zur Verdrängung der G-Proteine führt (ATTRAMADAL et al., 1992). Es wird vermutet, dass die Phosphorylierung und die Bindung des  $\beta$ -Arrestins auch für die Internalisierung von einigen GPCR notwendig ist (GOODMAN et al., 1996; GOODMAN et al., 1997; VON ZASTROW UND KOBILKA, 1992; CHUANG et al., 1996). Für den V2-Rezeptor konnte gezeigt werden, dass im C-Terminus ein Cluster von Serinen (S362, S363 und S364) von GRK phosphoryliert wird und dass der Rezeptor in Clathrin-Vesikeln, gebunden an  $\beta$ -Arrestin, internalisiert wird (INNAMORATI et al., 1998; PFEIFFER et al., 1998; OAKLEY et al., 2000).

### **2.3 Intrazellulärer Transport von GPCR**

Der intrazelluläre Transport von GPCR wurde bisher kaum untersucht, verläuft aber wahrscheinlich analog dem intrazellulären Transport anderer Membranproteine. Es lassen sich mehrere Stufen unterscheiden: Der Transport beginnt mit der kotranslationalen Insertion in die ER-Membran, ein Prozeß, bei dem auch die endgültige Orientierung des Proteins festgelegt wird (RAPOPORT, 1990). Im ER wird auch mit Hilfe eines Qualitätskontrollsystems überprüft, ob das Protein richtig gefaltet ist (HURTLEY UND HELENIUS, 1989; HAMMOND UND HELENIUS, 1995; ZHANG et al., 1997). Nur korrekt gefaltete Proteine können in den nachfolgenden vesikulären Transport eintreten. Das Protein wird dann über das ER und die einzelnen Abschnitte des Golgi-Apparates zum Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) transportiert (KAISER UND FERRO-NOVICK, 1998). Im TGN verzweigen sich die

vesikulären Transportwege. Die Membranproteine werden in spezifischen Vesikeln zu ihren Zielkompartimenten wie der Plasmamembran, ER, Endo- oder Lysosomen geleitet (MACHAMER, 1996). In polarisierten Epithelzellen sind die Verhältnisse komplizierter, da mit der apikalen und der basolateralen Plasmamembran zwei voneinander unabhängige Oberflächenkompartimente existieren. Hier muß im TGN zusätzlich entschieden werden, in welche der beiden Membranen das Protein transportiert werden soll (ROTHMAN UND ORCI, 1992). Man geht heute davon aus, dass die meisten Stufen des vesikulären Transports signalgesteuert sind, d.h. in den Membranproteinen müssen spezifische Domänen vorhanden sein, die das Einsortieren in die richtigen Vesikel steuern.

Ein selektiver Transport in die apikale oder in die basolaterale Membran von polarisierten Epithelzellen ist für einige GPCR beschrieben worden (KEEFER UND LIMBIRD, 1993; SAUNDERS et al., 1996; WOZNIAK UND LIMBIRD, 1996; BEAU et al., 1997; BEAU et al., 1998). Der V2-Rezeptor wird in polarisierten Epithelzellen sowohl *in situ* (Prinzipalzellen des Sammelrohrepithels) als auch in der Zellkultur (Madin-Darby canine kidney type II (MDCKII) -Zellen) vorwiegend in der basolateralen Membran exprimiert (NONOGUCHI et al., 1995; SCHÜLEIN et al., 1998b; ANDERSEN-BECKH et al., 1999).

Ein weiterer wichtiger intrazellulärer Transportweg ist die oben bereits erwähnte Agonisten-vermittelte Internalisierung/Sequestrierung des Rezeptors, die je nach Rezeptor und Zelltyp über Clathrin-Vesikel oder Caveolae erfolgt. Die Rezeptoren werden in Vesikel zuerst in ein frühes endosomales Kompartiment transportiert. Eine Gruppe von Rezeptoren kann danach resensibilisiert und wieder zurück zur Plasmamembran transportiert werden (PIPPIG et al., 1995; KRUEGER et al., 1997; PARENT et al., 1999; OAKLEY et al., 1999). Die Resensibilisierung wird durch die Dissoziation des GPCR/ $\beta$ -Arrestin-Komplexes, Dissoziation des Agonisten und durch die Dephosphorylierung durch eine membranassoziierte Phosphatase ermöglicht. Eine zweite Gruppe von Rezeptoren wird nicht resensibilisiert, sondern in späte endosomale Kompartimente und Lysosomen transportiert, wo die Rezeptoren schließlich zusammen mit dem Agonisten abgebaut werden (VON ZASTROW und KOBILKA, 1992; BUNNETT et al., 1998; OKSCHE et al., 2000). Für den V2-

Rezeptor ist nach Aktivierung durch AVP eine schnelle Internalisierung beschrieben worden, die über Clathrin-Vesikel erfolgt (PFEIFFER et al., 1998). Es konnte aber weder eine schnelle Resensibilisierung noch ein schneller Rücktransport an die Plasmamembran gezeigt werden, so dass der V2-Rezeptor der zweiten Gruppe von Rezeptoren zugeordnet werden kann (BIRNBAUMER et al., 1992; OAKLEY et al., 1999; OAKLEY et al., 2000). Wahrscheinlich bindet  $\beta$ -Arrestin an den phosphorylierten V2-Rezeptor (INNAMORATI et al., 1998), doch der V2-Rezeptor/ $\beta$ -Arrestin-Komplex kann nur sehr langsam dissoziieren, so dass der V2-Rezeptor nicht mit den Phosphatasen des Endosomen-Kompartiments interagieren kann (OAKLEY et al., 1999).

### **2.3.1 Transportsignale von GPCR**

Über Signale, die den Transport eines GPCR zur Zelloberfläche steuern, ist wenig bekannt. Bei verschiedenen GPCR wurde mit Hilfe von Trunkierungsmutanten versucht, die minimale Länge der Rezeptoren für den Oberflächentransport zu bestimmen. Für den m3-muskarinergen Rezeptor konnte gezeigt werden, dass verkürzte Rezeptorfragmente, die die ersten zwei, drei, vier, fünf oder sechs transmembranären Domänen enthielten, noch zur Plasmamembran transportiert werden (SCHÖNEBERG et al., 1995). Dieser Rezeptor enthält offenbar keine spezifischen Sequenzen für den Oberflächentransport. Beim Glucagon-Rezeptor waren dagegen Rezeptorfragmente, die eine bis fünf transmembranäre Domänen enthielten, transportdefekt und akkumulierten im ER. Es wurde postuliert, dass alle sieben transmembranären Domänen vorhanden sein müssen, um einen Transport zur Plasmamembran zu ermöglichen (UNSON et al., 1995). Ein ähnliches Ergebnis wurde für verkürzte Rhodopsinfragmente erhalten (HEYMANN UND SUBRAMANIAM, 1997).

Für den Luteotropin/Choriogonadotropin (LH/CG)-Rezeptor scheint der intrazelluläre C-Terminus für die Oberflächenexpression wichtig zu sein (RODRIGUEZ et al., 1992). Für den V2-Rezeptor wurde ein ähnliches Ergebnis erhalten: Eine Trunkierung des Rezeptors im intrazellulären C-Terminus, vier Aminosäuren N-terminal von den

beiden palmitoylierten Cysteinresten (Mutante R337X), führte zu einem vollständig transportdefekten Rezeptor, der im ER akkumulierte (SADEGHI et al., 1997a; OKSCHE et al., 1998). Eine Trunkierung an L340 erlaubt dagegen wieder - wenn auch in reduziertem Umfang - den Transport zur Plasmamembran (SADEGHI et al., 1997a). Somit scheinen die Reste unmittelbar N-terminal von den palmitoylierten Cysteinen (C341/C342) essentiell für den Oberflächentransport des V2-Rezeptors zu sein. Auch der Austausch der palmitoylierten Cysteinreste C341/C342 selbst führt zu einem verminderten Transport zur Plasmamembran (SCHÜLEIN et al., 1996a).

Wie der V2-Rezeptor werden auch andere GPCR in polarisierten Epithelzellen an die basolaterale Membran transportiert. So werden der Thyrotropin- (TSH), follikelstimulierendes Hormon- (FSH) und LH/CG-Rezeptor (BEAU et al., 1997) und der  $\alpha_{2A}$ -,  $\alpha_{2B}$ - und  $\alpha_{2C}$ -adrenerge Rezeptor (WOZNIAK UND LIMBIRD, 1996) in MDCKII-Zellen überwiegend basolateral exprimiert. Ein hierfür verantwortliches Transportsignal konnte bislang nur beim FSH-Rezeptor gefunden werden (BEAU et al., 1998). Es handelt sich hierbei um ein YXX $\Phi$ -Motiv, welches sich im C-Terminus des Rezeptors befindet. Beim  $\alpha_{2B}$ -adrenergen Rezeptor konnte lediglich gezeigt werden, dass die dritte intrazelluläre Schleife für den basolateralen Transport wichtig ist (SAUNDERS et al., 1998).

#### **2.4 Transportsignale bei anderen Membranproteinen**

Im Gegensatz zu GPCR wurden Signale, die den Transport zu den Zielkompartimenten steuern, bei vielen anderen Membranproteinen beschrieben. Hierbei handelt es sich in der Regel um kurze, lineare Aminosäuresequenzen, die sich in den intracytoplasmatischen Domänen des Proteins befinden. Diese Transportsignale können sowohl Vorwärtssignale sein, die ein Protein in das nächste Kompartiment weiterleiten, aber auch Haltesignale, die ein Protein in einem Kompartiment retinieren.

### 2.4.1 Signale für den Transport vom ER zum Golgi-Apparat

Für den Transport von neu synthetisierten Proteinen aus dem ER heraus wurden bisher zwei gegensätzliche Modelle beschrieben. Das erste Modell geht davon aus, dass die zu transportierenden Proteine selbst keine ER-Exportsignale enthalten. Transportsignale werden hier erst auf späteren Stufen für den Transport zu Endosomen, Lysosomen oder zur Plasmamembran benötigt. Dieser kontinuierliche, nicht signalgesteuerte ER-Export der Proteine wurde als „Bulk Flow“-Modell bezeichnet (WIELAND et al., 1987).

Das zweite Modell geht davon aus, dass jedes aus dem ER transportierte Protein mit einem Signal versehen ist, welches das Einsortieren in die Transportvesikel gewährleistet (rezeptorvermitteltes Export-Modell; KUEHN UND SCHEKMAN, 1997).

Beide ER-Export-Modelle können nicht alle bislang bekannten Ergebnisse ausreichend erklären. Möglicherweise treffen auch beide Modelle zu. So könnten Proteine, die in sehr großen Mengen hergestellt werden (z.B. Amylase oder Zymogen), das ER auch ohne spezifische Transportsignale verlassen. Proteine, die dagegen nur in geringen Mengen hergestellt werden, könnten ein spezifisches Transportsignal benötigen, um aus dem ER heraustransportiert zu werden (WARREN UND MELLMAN, 1999).

Ein Beispiel für ein retrogrades ER-Transportmotiv ist das Dilysin-Motiv (KKXX, KXKXX, RKXX oder RXKXX). Dieses Motiv findet man in intrazellulären Bereichen zahlreicher ER-Proteine, z.B. bei der UDP-Glukuronosyltransferase sowie Ribophorin I und II (SHIN et al., 1991; MACHAMER, 1996). Auch durch die Einführung von einer oder von mehreren polaren oder hydrophilen Aminosäuren in die TMD von Typ I-Membranproteinen, die normalerweise an die Zelloberfläche transportiert werden, kann ein Rücktransport aus dem frühen Golgi-Apparat in das ER aktiviert werden (LETOURNEUR UND COSSON, 1998). In beiden Fällen handelt es sich um ein retrogrades System, welches mit dem Bulk Flow-Modell in Übereinstimmung steht.

Für Proteine, die einem rezeptorvermittelten Export-Modell folgen, wurden bisher zwei ER-Exportsignale beschrieben. Es handelt sich hierbei um kurze Aminosäuresequenzen in den cytoplasmatischen Bereichen. Das erste Signal wurde bei Proteinen der p24 Familie beschrieben und besteht aus zwei Phenylalaninresten (FF) (FIEDLER et al., 1996). Das zweite Motiv besteht aus zwei sauren Aminosäureresten (DEXX, DDXX oder EDXX) und wurde bereits in mehreren Proteinen beschrieben (NISHIMURA UND BALCH, 1997).

Unabhängig vom Vorhandensein oder Fehlen eines ER-Exportsignals muß ein Membranprotein richtig gefaltet sein, um aus dem ER heraustransportiert zu werden. Für die Retention von fehlgefalteten Proteinen gibt es ebenfalls zwei verschiedene Modelle, die sich aber auch gut ergänzen könnten. Nach dem einen Modell erfolgt die Retention signalunabhängig durch unspezifische Bindung und Komplexbildung mit Chaperonen, wie Calnexin/Calreticulin und/oder Bip (HURTLEY UND HELENIUS, 1989). Nach dem zweiten Modell verfügen Membranproteine über spezifische ER-Retentionssignale, die durch richtige Faltung oder Oligomerisierung maskiert, durch Fehlfaltung dagegen demaskiert werden. Die Demaskierung führt dann zur Retention (ZERANGUE et al., 1999).

Ein erst kürzlich beschriebenes ER-Retentionsmotiv dieses Typs ist das RXR-Motiv, das zuerst in den cytoplasmatischen Domänen von metabolischen  $K^+$ -Kanälen beschrieben wurde. Bei diesen Kanälen wird das Signal durch die Oligomerisierung von mehreren Untereinheiten maskiert, was den fertigen Kanälen Transportkompetenz verleiht (ZENRANGUE et al., 1999). Vier dieser Motive wurden auch in den cytoplasmatischen Domänen des CFTR-Proteins gefunden. Hier konnten mutierte, transportdefekte CFTR-Proteine (die bei Patienten mit cystischer Fibrose am häufigsten vorkommende Mutation  $\Delta F508$ ) durch die Mutagenese aller vier potentiellen Retentionsmotive in transportkompetente Formen überführt werden (CHANG et al., 1999). Ob ähnliche Signale auch bei der ER-Retention von fehlgefalteten GPCR eine Rolle spielen, ist unbekannt.

## 2.4.2 Dileucinmotive als Transportsignale für Post-ER-Kompartimente

Dileucinmotive stellen bei Membranproteinen wichtige intrazelluläre Transportsignale dar, denen mehrere Funktionen zugewiesen werden konnten. Die Motive bestehen, wie der Name sagt, aus zwei benachbarten Leucinresten. Es können aber auch andere hydrophobe Reste vorkommen, wie z.B. Valin, Methionin und Isoleucin. Die Motive treten in den intrazellulären C-Termini von Membranproteinen auf, meist nicht weiter als 12-15 Aminosäuren von der letzten TMD entfernt. Manchmal sind für die Funktion des Motivs auch N-terminal gelegene, saure Reste (D oder E) notwendig (POND et al., 1995; DIETRICH et al., 1997; GEISLER et al., 1998; NAKAMURA UND ASCOLI, 1999). Man spricht dann von einem Glutamat bzw. Aspartat/Dileucinmotiv (E/DXXX(X)LL). Bis heute sind funktionell zwei Typen von Dileucinmotiven bekannt: die konstitutiv aktiven und die durch Phosphorylierung von umgebenden Serinen und Threoninen aktivierbaren Motive (GEISLER et al., 1998). Für Dileucinmotive konnten folgende Funktionen belegt werden: 1.) konstitutiv aktive Sortierung von Membranproteinen im TGN in Transportvesikel zu Endosomen, Lysosomen (JOHNSON UND KORNFELD, 1992; LETOURNEUR UND KLAUSNER, 1992; GEISLER et al., 1998; CALVO et al., 1999) oder zur basolateralen Plasmamembran in polarisierten Epithelzellen (HUNZIKER UND FUMEY, 1994; SHEIKH UND ISACKE, 1996); 2.) durch Phosphorylierung aktivierbares Einsortieren von Plasmamembranproteinen in endocytotische Vesikel (LETOURNEUR UND KLAUSNER, 1992; GABILONDO et al., 1998; VINCENT et al., 1997; STEFANER et al., 1999).

Im intrazellulären C-Terminus des V2-Rezeptors befindet sich unmittelbar vor den palmitoylierten Resten C341/C342 ein potentiell Dileucinmotiv (<sup>339</sup>LL<sup>340</sup>). Aus vergangenen Arbeiten gab es Hinweise, dass dieser Bereich wichtig für den Transport des V2-Rezeptors zur Plasmamembran sein könnte (SCHÜLEIN et al., 1996a; SADEGHI et al., 1997a; OKSCHE et al., 1998). Sowohl von der Sequenz als auch von der Lage im C-Terminus her könnte dieses Motiv ein Transportsignal darstellen. Beim V2-Rezeptor befindet sich außerdem in Position 335 ein Glutaminsäurerest, der auch in das Schema eines Glutamat/Dileucinmotivs passen würde. Hauptziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob dieses Sequenzmotiv des V2-Rezeptors tatsächlich

Transportfunktionen besitzt. Neben der oben erwähnten möglichen Bedeutung für den Transport zur Plasmamembran, könnte dieses Motiv auch die basolaterale Sortierung des V2-Rezeptors in Epithelzellen steuern. Auch eine Funktion bei der Rezeptorinternalisierung wäre denkbar. Um diese verschiedenen Möglichkeiten zu überprüfen, wurden zahlreiche Mutationen in diesem Bereich durchgeführt und die Transporteigenschaften der V2-Rezeptor-Mutanten untersucht.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Reagenz	Bezugsquelle
[ <sup>125</sup> I]-markiertes Esel-anti-Kaninchen IgG	Amersham-Buchler, USA
1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]Oktan	SIGMA <sup>®</sup> , USA
10 Basenpaare DNA-Leiter	Gibco, BRD
10 kDa Proteinleiter	Life Technologies, BRD
1000 Basenpaare DNA-Leiter	Gibco, BRD
2-Mercaptoethanol	Carl Roth, BRD
3':5'-zyklisches Adenosin Monophosphat Natriumsalz	SIGMA <sup>®</sup> , USA
[ <sup>3</sup> H]Arginin Vasopressin	NEN Life Science Products, BRD
[ <sup>3</sup> H]cAMP	NEN Life Science Products, BRD
3-(N-Morpholino)-Propansulfonäure	Carl Roth, BRD
3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthine	SIGMA <sup>®</sup> , USA
4-Chloro-1-Naphtol	Carl Roth, BRD
5'-Adenosin Triphosphat Dinatriumsalz	SIGMA <sup>®</sup> , USA
5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-Dinatriumsalz	Carl Roth, BRD
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktosid	Carl Roth, BRD
[α- <sup>32</sup> P]ATP	NEN Life Science Products, BRD
ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer, USA
Agar	Life Technologies, BRD
Agarose	Life Technologies, BRD
Albumin, Rind	SIGMA <sup>®</sup> , USA

<b>Reagenz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Alkalische Phosphatase	Boehringer Mannheim, BRD
Alkalische Phosphatase-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA
Alkalische Phosphatase-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA
Aluminiumoxid	MERCK, BRD
Ammoniumchlorid, z. A.	FLUKA Chemie, Schweiz
Ammoniumperoxodisulfat, z. A.	MERCK, BRD
Ampicillin Natriumsalz	SIGMA <sup>®</sup> , USA
Aprotinin (aus Rinderlunge)	MERCK, BRD
Aquasafe 300 Plus	Zinsser Analytic, BRD
Arginin Vasopressin	FMP, Berlin
Bacitracin	SIGMA <sup>®</sup> , USA
Benzamidin	SIGMA <sup>®</sup> , USA
Borsäure	Carl Roth, BRD
Bromphenolblau Natriumsalz	Carl Roth, BRD
Cacodylsäure Natriumsalz-3-Hydrat	Carl Roth, BRD
Calciumchlorid-2-Hydrat, z. A.	MERCK, BRD
Casein (aus Rindermilch)	SIGMA <sup>®</sup> , USA
Coomassie Brilliantblau G250	Carl Roth, BRD
Creatin Phosphokinase	SIGMA <sup>®</sup> , USA
Cy <sup>TM</sup> 3-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA
D-(+)-Saccharose	Carl Roth, BRD
Dikaliumhydrogenphosphat-3-Hydrat, z. A.	MERCK, BRD
Dinatriumhydrogenphosphat, wasserfrei, z. A.	MERCK, BRD
Dithiothreitol	New England BioLabs Inc., UK
Dowex <sup>®</sup> 50W-X8	Bio-Rad Laboratories, USA
Dulbecco's modified Eagle's medium	SIGMA <sup>®</sup> , USA
Dnase I, RNase frei	Boehringer Mannheim, BRD
Endoglykosidase H	New England BioLabs Inc., UK
Essigsäure, reinst	MERCK, BRD
Ethanol, z. A.	J.T. Baker, Niederlande
Ethidiumbromid	Carl Roth, BRD

<b>Reagenz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Ethylendiamin-Glykol-bis-( $\beta$ -Aminoethylether)-Tetraessigsäure, z. A.	Carl Roth, BRD
Ethylendiamintetraessigsäure (Titrierkomplex III), z. A.	Carl Roth, BRD
Ethylphenyl-Polyethylenglycol	SIGMA <sup>®</sup> , USA
Expand™ High Fidelity PCR System	Boehringer Mannheim, BRD
Fetales Kälberserum	Gibco, BRD
Formaldehyd	MERCK, BRD
Formamid	Carl Roth, BRD
Forskolin	SIGMA <sup>®</sup> , USA
Gelatine	SIGMA <sup>®</sup> , USA
Geneticin	CALBIOCHEM/NOVABIOCHEM, USA
GeneClean <sup>®</sup> II Kit	BIO101, Inc., USA
Glukose	MERCK, BRD
Glücksklee <sup>®</sup> Magermilchpulver	Nestlé Deutschland AG, BRD
Glyzin, freie Base	CALBIOCHEM/ NOVABIOCHEM, USA
Glykogen	SIGMA <sup>®</sup> , USA
Glyzerin	SIGMA <sup>®</sup> , USA
Guanosin 5'-Triphosphat Natriumsalz	SIGMA <sup>®</sup> , USA
Harnstoff, z. A.	FLUKA Chemie, Schweiz
Hefeextrakt	Life Technologies, BRD
Isoamylalkohol	SIGMA <sup>®</sup> , USA
Isopropyl-1-Thio- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (IPTG)	SIGMA <sup>®</sup> , USA
Isopropanol	MERCK, BRD
JETstar Plasmid Midiprep Kit/50	GENOMED, BRD
Kaliumacetat, z. A.	Carl Roth, BRD
Kaliumchlorid, z. A.	MERCK, BRD
Kaliumdihydrogenphosphat, z. A.	J.T. Baker, Niederlande
Kanamycin (Kanamycin A) Monosulfat	SIGMA <sup>®</sup> , USA
Kaninchen-anti-GFP-Antiserum	FMP, BRD
L-Glutamin	Life Technologies, BRD
Lipofectin™ Reagent	Life Technologies, BRD
Lipofectamin™ Reagent	Life Technologies, BRD

<b>Reagenz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Magnesiumchlorid-6-Hydrat, z. A.	J.T. Backer, Niederlande
Magnesiumsulfat wasserfrei, z. A.	SIGMA <sup>®</sup> , USA
Mangan(II)-Chlorid-2-Hydrat, z. A.	MERCK, BRD
Megaprime DNA Markierungs Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Niederlande
Methanol	J.T. Baker, Niederlande
Monoklonaler Maus-anti- <i>c-myc</i> -Antikörper	Dianova, BRD
Monoklonaler Maus-anti-GFP-Antikörper	Clontech, USA
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure	Carl Roth, BRD
N,N-Dimethylformamid	FLUKA Chemie, Schweiz
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	SIGMA <sup>®</sup> , USA
Nagellack	MANHATTAN
Natriumacetat Anhydrit	SIGMA <sup>®</sup> , USA
Natriumazid	Carl Roth, BRD
Natriumchlorid	J.T. Baker, Niederlande
Natriumdodecylsulfat, reinst (SDS)	Carl Roth, BRD
Natriumhydroxyd	Carl Roth, BRD
Natriumcitrat	Carl Roth, BRD
Nitrozellulose (OPTITRAN BA-S 85)	Schleicher & Schuell, BRD
Octylphenylpoly(ethylenglykolether) <sub>n</sub>	Carl Roth, BRD
Ovalbumin	SIGMA <sup>®</sup> , USA
Paraformaldehyd, reinst	MERCK, BRD
Penicillin/Streptomycin	SIGMA <sup>®</sup> , USA
Peptone 140	Life Technologies, BRD
Perhydrol <sup>®</sup> 30% (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	MERCK, BRD
Phenylmethylsulfonylfluorid	Carl Roth, BRD
Phosphocreatin	SIGMA <sup>®</sup> , USA
Peptid-Endoglykosidase F	New England BioLabs Inc., UK
p-Nitrotetrazoliumblausulfat	Carl Roth, BRD
Polyethylenimin, 50% (w/v) wässrige Lösung	SIGMA <sup>®</sup> , USA
Polyethylenglykol 6000	MERCK, BRD
Poly-L-Lysin	SIGMA <sup>®</sup> , USA
Ponceau S, reinst	Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, BRD
QIAGEN Plasmid Mini Kit	QIAGEN, BRD

<b>Reagenz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN, BRD
QuikChange™ <i>in vitro</i> Mutagenese System	Stratagene, USA
Restriktionsenzyme	New England BioLabs Inc., UK
Rhodamin 6G	Molecular Probes, Niederlande
Roti®-Phenol	Carl Roth, BRD
Roti®-Phenol/Chloroform	Carl Roth, BRD
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1), Acrylamid- und Bisacrylamidstammlösung	Carl Roth, BRD
D(+)-Saccharose	Carl Roth, BRD
Salzsäure 36-38%, z. A.	J.T. Baker, Niederlande
Sculptor™ <i>in vitro</i> Mutagenese System	Amersham LIFE SCIENCE, UK
SuperFect™ Transfektionsreagenz	QIAGEN, BRD
Tetracyclin	SIGMA®, USA
Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan	MERCK, BRD
Triton X-100®	Carl Roth, BRD
Trypanblau	Seromed, BRD
Trypsin	Carl Roth, BRD
Trypsininhibitor Typ I-S: aus Sojabohnen	SIGMA®, USA
Xylencyanol	Carl Roth, BRD

### 3.1.2 Geräte und Rechner

#### 3.1.2.1 Geräte

-20 °C Schrank	LIEBHERR
-80 °C Schrank	LIEBHERR
Autoklaven	Varioklav
Blotkammern	Bio-Rad, Pharmacia
Brutschränke	Heraeus
Eismaschine	ZIEGRA
Elektrophoresekammern	Carl Roth
Filme	Ortho-Film (Agfa), X-OMAT-Röntgenfilme (Kodak)
Filter	Schleicher Schüll

Geltrockner	Bio-Rad Modell 583
Geigerzähler	FHT 111M, Contamat
Harvester	Brandel Harvester
Heizblock	Eppendorf-Thermomixer 5436
Homogenisator	POTTER S, B. Braun Biotech International
Kühlschrank	LIEBHERR
Labormikroskop	Zeiss
Laser Scanning Mikroskop	Zeiss LSM 410
Magnetrührer	IKAMAG <sup>®</sup> RCT
Mikrowellenofen	Siemens
Netzgeräte	Bio-Rad, Pharmacia
Photometer	Pharmacia UV-visible Spectrophotometer
PCR-Maschinen	Perking Elmer Thermocycler 9700
	Biometra UNO-Thermoblock <sup>™</sup>
	Biometra Trio-Thermoblock <sup>™</sup>
pH-Meter	Hanna Instruments HI 9321 Microprocessor pH Meter
Pipetten	Gilson pipetman P5000
	pipetman P1000
	pipetman P200
	pipetman P20
	pipetman P10
	distriman <sup>®</sup>
Transilluminator	Herolab UVT-28MP
Roboter für Plasmidisolierung	QIAGEN Biorobot 9600
Rotoren	Beckman TLA-100.4 Festwinkelrotor
	Beckman 70.1Ti Festwinkelrotor
	Sorvall GSA Festwinkelrotor
	Sorvall SS34 Festwinkelrotor
	Beckman JA-14 Festwinkelrotor
	Beckman JA-25.50 Festwinkelrotor
Sequenzierer ABI 373 A	Perkin Elmer, USA
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific innova <sup>™</sup> 3240
Schüttler	Edmund Bühler Swip
Stratalinker <sup>™</sup>	Stratagene, USA
Ultraschaller	B. Braun 1000L, Labsonic, BRD
UV-Handlampe	Roth NU-6KL
Videokamera	Herolab E.A.S.Y. 429K
Videodrucker	Mitsubishi Videocopy Processor
Vortexer	Janke&Kunkel IKA <sup>®</sup> Labortechnik

Waagen	Scaltel SBA52 Melter Toledo AG245
Wasserbad	Medingen W6
Wasserbad-Schüttelinkubator	Gesellschaft für Labortechnik mbH
Zentrifugen	Beckman Optima™ TLX Ultrazentrifuge Beckman LE-70 Beckman TLK-100 Heraeus Biofuge 15 Heraeus Biofuge <i>pico</i> Sorvall RC5C Plus (Dupont) Stratagene PicoFuge®

### 3.1.2.2 Rechner

Rechner	IBM kompatibler PC (CeCon) Power PC Macintosh
Rechnerprogramme	Microsoft Windows 95, Clone Manager 2.0 für Windows, Microsoft Word für Windows 95 Version 7.0a <sup>©</sup> , Microsoft Excell für Windows 95 Version 7.0a <sup>©</sup> , Harvard Graphics 4.0 für Windows 95, GraphPad PRISM <sup>®</sup> Version 3.00, RADLIG Version 4.0, MultiCalc Version 1.50, Corel Draw 8.0, ABI PRISM™ Version 3.0, Sybyl Programmpaket TRIPOS, AMBER Version 4.1 und 4.5.
Drucker	Hewlett-Packard LaserJet 5M Hewlett-Packard DeskJet 890C Hewlett-Packard Stylwriter Mac
Scanner	Hewlett-Packard ScanJET II CX

### 3.1.3 Bakterienstämme, Phagen und eukaryontische Zelllinien

#### 3.1.3.1 Bakterienstämme

Bezeichnung	Genetischer Marker	Herkunft
<i>E. coli</i> CC118	ara $\Delta$ 139 $\Delta$ (ara, leu)7697 $\Delta$ lacX74 phoA $\Delta$ 20 galE galK thi rpsE rpoB argEam recA1	C. Manoil
<i>E. coli</i> DH10 $\beta$	F' mcrA $\Delta$ -(mrr hsdRMS-mcrBC) $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 deoR recA1 araD139 $\Delta$ (ara, leu)7697 galU galK $\lambda^-$ rpsL end A1 nupG	Life Technologies
<i>E. coli</i> XL1-Blue	recA1 end A1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 Tn10 (tet <sup>R</sup> )]	Stratagene
<i>E. coli</i> Epicurian Coli <sup>®</sup> XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacI <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 Tn10 (tet <sup>R</sup> )]	Stratagene
<i>E. coli</i> TG1	K12 $\Delta$ (lac-pro) supE thi hsdD5/F'traD36 proA+B+ lacI <sup>q</sup> lac Z $\Delta$ M15	Amersham LIFE SCIENCE
<i>E. coli</i> MC1061/P3	F' araD139 $\Delta$ (araABC-leu)7679 galU galK $\Delta$ lacX74 hsdR2 (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) rpsL(Str <sup>R</sup> ) thi-1 mcrB [P3: kan <sup>R</sup> amp <sup>R</sup> (amber) tet <sup>R</sup> (amber)]	Invitrogen <sup>®</sup>

#### 3.1.3.2 Bakteriophagen

Bezeichnung	Merkmale	Herkunft/Referenz
M13mp19 Phage	Phage für gerichtete Mutagenesen	Amersham LIFE SCIENCE

### 3.1.3.3 Eukaryontische Zelllinien

Bezeichnung	Merkmale	Herkunft/Referenz
COS.M6	African green monkey kidney cells, mit SV40-Virus transformiert	F. Fahrenholz, BRD
HEK293	Human embryonic kidney cells, mit Adenovirus Typ 5 transformiert	DSMZ, BRD
MDCKII	Madin-Darby canine kidney cells type II	K. Simons, BRD

### 3.1.4 Desoxyribonukleinsäuren (DNA)

#### 3.1.4.1 Vektoren

Vektor	Resistenzen	Replikon	Herkunft/Referenz
pcDNA1.Neo	kn <sup>R</sup>	ColE1, SV40, M13	Invitrogen®
pUC19	amp <sup>R</sup>	ColE1	Promega
pEGFP.N1	kn <sup>R</sup>	ColE1, SV40, M13	Clontech
M13mp19	-	M13	Amersham LIFE SCIENCE

#### 3.1.4.2 Rekombinante Plasmide

Rekombinante Plasmide	Vektor	Funktionelle Bereiche	Herkunft
pRSA468	pUC19	<i>PhoA</i>	SCHÜLEIN et al., 1992
M13.V2R	M13.mp19	V2R	SCHÜLEIN et al., 1996a

<b>Rekombinante Plasmide</b>	<b>Vektor</b>	<b>Funktionelle Bereiche</b>	<b>Herkunft</b>
<b>Plasmide mit V2R-cDNA für das COS.M6 und HEK293 Zellexpressionssystem</b>			
pRCDN2.Δ336-340	pcDNA1.Neo	V2R, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pRCDN2.ΔL62-R64	pcDNA1.Neo	V2R, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pRCDN2.L62P	pcDNA1.Neo	V2R, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pRCDN2.E335Q	pcDNA1.Neo	V2R, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pRCDN2.L339A	pcDNA1.Neo	V2R, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pRCDN2.L340A	pcDNA1.Neo	V2R, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pRCDN2.L339/340A	pcDNA1.Neo	V2R, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pRCDN2.L339I	pcDNA1.Neo	V2R, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pRCDN2.L340I	pcDNA1.Neo	V2R, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pRCDN2.L339/340I	pcDNA1.Neo	V2R, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pRCDN2.L339T	pcDNA1.Neo	V2R, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pRCDN2.L340T	pcDNA1.Neo	V2R, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pRCDN2.L339/340T	pcDNA1.Neo	V2R, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
<b>Plasmide mit V2R-c-myc-Markierung für das COS.M6 Zellexpressionssystem</b>			
pRCDN2.Nmyc	pcDNA1.Neo	V2R-c-myc-Fusion, kn <sup>R</sup>	ANDERSEN- BECKH et al., 1999
pRCDN2.E335Q.Nmyc	pcDNA1.Neo	V2R-c-myc-Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pRCDN2.L339T.Nmyc	pcDNA1.Neo	V2R-c-myc-Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pRCDN2.L340T.Nmyc	pcDNA1.Neo	V2R-c-myc-Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pRCDN2.L339/340T.Nmyc	pcDNA1.Neo	V2R-c-myc-Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
<b>Plasmide mit V2R-PhoA-Fusionsproteinen für das COS.M6 Zellexpressionssystem</b>			
pEU367.PhoA	pcDNA1.Neo	V2R-PhoA-Fusion, kn <sup>R</sup>	SCHÜLEIN et al., 1996b
pEU367.E335Q.PhoA	pcDNA1.Neo	V2R-PhoA-Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEU367.L339I.PhoA	pcDNA1.Neo	V2R-PhoA-Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEU367.L340I.PhoA	pcDNA1.Neo	V2R-PhoA-Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEU367.L339/340I.PhoA	pcDNA1.Neo	V2R-PhoA-Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEU367.L339T.PhoA	pcDNA1.Neo	V2R-PhoA-Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEU367.L340T.PhoA	pcDNA1.Neo	V2R-PhoA-Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEU367.L339/340T.PhoA	pcDNA1.Neo	V2R-PhoA-Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEU71.PhoA	pcDNA1.Neo	V2R-PhoA-Fusion, kn <sup>R</sup>	SCHÜLEIN et al., 1996b
pEU71.CT.PhoA	pcDNA1.Neo	V2R-PhoA-Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit

<b>Rekombinante Plasmide</b>	<b>Vektor</b>	<b>Funktionelle Bereiche</b>	<b>Herkunft</b>
pEU71.CT.E335Q. <i>PhoA</i>	pcDNA1.Neo	V2R- <i>PhoA</i> -Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEU71.CT.L339I. <i>PhoA</i>	pcDNA1.Neo	V2R- <i>PhoA</i> -Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEU71.CT.L340I. <i>PhoA</i>	pcDNA1.Neo	V2R- <i>PhoA</i> -Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEU71.CT.L339/340I. <i>PhoA</i>	pcDNA1.Neo	V2R- <i>PhoA</i> -Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEU71.CT.L339T. <i>PhoA</i>	pcDNA1.Neo	V2R- <i>PhoA</i> -Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEU71.CT.L340T. <i>PhoA</i>	pcDNA1.Neo	V2R- <i>PhoA</i> -Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEU71.CT.L339/340T. <i>PhoA</i>	pcDNA1.Neo	V2R- <i>PhoA</i> -Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
<b>Plasmide mit V2R-GFP-Fusionsproteinen für das COS.M6 und HEK293 Zellexpressionssystem</b>			
pEU367.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEU367.ΔL62-R64.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEU367.L62P.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEU367.E335Q.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEU367.L339I.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEU367.L340I.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEU367.L339/340I.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEU367.L339T.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEU367.L340T.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEU367.L339/340T.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEU71.CT.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEU71.CT.E335Q.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEU71.CT.L339T.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEU71.CT.L340T.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit
pEU71.CT.L339/340T.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, kn <sup>R</sup>	diese Arbeit

## 3.1.4.3 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendung
PA336-340	CAGCGTGTCTCCTCAGAGCT CTGCTGCTGTGCCCGG	Deletion der Aminosäuren 336 bis 340 des V2-Rezeptors
PΔL62-R64 5'	CCTGGTGTGGCGCCCGGGG CCGGCGGGGCC	Aminosäuredeletion L62, A63 und R64 beim V2-Rezeptor
PΔL62-R64 3'	GGCCCCGCCGGCCCCGGGCCG CCAGCACCAGG	Aminosäuredeletion L62, A63 und R64 beim V2-Rezeptor
PA5 5'	CTGGGCCTGCTTTGCG	PCR-Oligonukleotid für Umklonierung des C-Terminus des V2-Rezeptors und für diverse Sequenzierungen
PBA2 BamHI 3'	CCTCACGATGAAGGATCCTTG GCCAGGG	Einführung einer <i>Bam</i> HI-Schnittstelle für die Umklonierung des C-Terminus des V2-Rezeptors
PBA2 BamHI 5'	CCCTGGCCAAGGATCCTTCAT CGTGAGG	Einführung einer <i>Bam</i> HI-Schnittstelle für die Umklonierung des C-Terminus des V2-Rezeptors
PDL-BgIII 3'	CTGCTGCTGAAAGATAGATCT ATCCAGGGGTTGGTG	Einführung einer <i>Bg</i> III-Schnittstelle für die Umklonierung des C-Terminus des V2-Rezeptors
PDL-BgIII 5'	CACCAACCCCTGGATAGATCT ATCTTTCAGCAGCAG	Einführung einer <i>Bg</i> III-Schnittstelle für die Umklonierung des C-Terminus des V2-Rezeptors
PL62P 3'	CCACGACCGCCGGGGTCGAGC	Aminosäureaustausch L62P beim V2-Rezeptor
PL62P 5'	GGTGCTGGCGGCCCCAGCTCG	Aminosäureaustausch L62P beim V2-Rezeptor
PE335Q	CAGCAGCGTGTCTCACAGCT GCGAAGCTTGC	Aminosäureaustausch E335Q beim V2-Rezeptor
PL339I	CAGAGCTGCGAAGCATTCTCT GCTGTGCCCG	Aminosäureaustausch L339I beim V2-Rezeptor
PL340I	GCTGCGAAGCTTGATTTGCTG TGCCCGG	Aminosäureaustausch L340I beim V2-Rezeptor

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendung
PL339/340I	CAGAGCTGCGAAGCATTATTT GCTGTGCCCGGGG	Aminosäureaustausch L339/340I beim V2-Rezeptor
PL339T	CAGAGCTGCGAAGCACTCTCT GCTGTGCCCG	Aminosäureaustausch L339T beim V2-Rezeptor
PL340T	CAGAGCTGCGAAGCTTGACTT GCTGTGCCCGGGGAC	Aminosäureaustausch L340T beim V2-Rezeptor
PL339/340T	CAGAGCTGCGAAGCACTACTT GCTGTGCCCGGGG	Aminosäureaustausch L339/340T beim V2-Rezeptor
PSP6 3'	TCACAAAGATCCTCTAGC	PCR-Oligonukleotid für Umklonierung des C-Terminus des V2-Rezeptors und für diverse Sequenzierungen
PT339A 3'	CGGGCACAGCAGAGAGCGCTT CGCAGCTCTG	Aminosäureaustausch T339A bei pRCDN2.L339T
PT339A 5'	CAGAGCTGCGAAGCGCTCTCT GCTGTGCCCG	Aminosäureaustausch T339A bei pRCDN2.L339T
PT340A 3'	CCGGGCACAGCAAGCCAAGCT TCGCAGC	Aminosäureaustausch T340A bei pRCDN2.L340T
PT340A 5'	GCTGCGAAGCTTGGCTTGCTG TGCCCGG	Aminosäureaustausch T340A bei pRCDN2.L340T
PT339/340A 3'	CCCGGGCACAGCAAGCAGCGC TTCGCAGCTCTG	Aminosäureaustausch T339/340A bei pRCDN2.L339/340T
PT339/340A 5'	CAGAGCTGCGAAGCGCTGCTT GCTGTGCCCGGG	Aminosäureaustausch T339/340A bei pRCDN2.L339/340T

### 3.1.5 Flüssigmedien und Agarplatten für *E. coli*

Sofern nichts vermerkt ist, wurden sowohl die Flüssigmedien als auch die Medien mit Agarzusatz 15 min bei 120 °C autoklaviert. Für das Gießen der Agarplatten wurden pro Petrischale (Ø 100 mm) ca. 25 ml der auf 55 °C abgekühlten Flüssigkeit verwendet.

Medien:

Luria Bertani (LB)- Medium (Typ Lennox)	Peptone 140	16 g
	Hefeextrakt	10 g
	NaCl	5 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l
LB-Agarplatten	Wie LB-Medium; vor den Autoklavieren werden jedoch 12,5 g Agar pro l hinzugefügt.	
H Top-Agar	Peptone 140	10 g
	NaCl	8 g
	Agar	8 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l
LB-Medium für QuikChange™	Wie LB-Medium; nach dem Autoklavieren werden folgende Chemikalien pro l hinzugefügt:	
	1 M MgCl <sub>2</sub>	12,5 ml
	1 M MgSO <sub>4</sub>	12,5 ml
	2 M Glukose (steril filtriert)	10 ml

### 3.1.6 Antibiotika und andere Medienzusätze

Allen Agarplatten und Flüssigmedien wurden bei Bedarf nach dem Autoklavieren Antibiotika und andere hitzeempfindliche Komponenten zugesetzt. Bei Agarplatten wurde der heiße Agar auf ca. 45 °C abgekühlt, bevor die entsprechenden Substanzen hinzugefügt wurden.

Konzentrationen der verwendeten Antibiotika und Medienzusätze:

<b>Antibiotikum</b>	<b>Stammlösung</b>	<b>Flüssigmedium</b>	<b>Agarplatten</b>
Ampicillin	100 mg/ml H <sub>2</sub> O	100 µg/ml	100 µg/ml
Tetracyclin	10 mg/ml Ethanol	10 µg/ml	10 µg/ml
Kanamycin	30 mg/ml H <sub>2</sub> O	30 µg/ml	30 µg/ml
IPTG	100 mM	-	0,1 mM
X-Gal	40 mg/ml DMFA	-	40 µg/ml

## 3.2 Methoden

Sofern keine Literatur zitiert ist, wurden die Methoden den Handbüchern von PERBAL (1988) oder SAMBROOK et al. (1989) entnommen oder stellen eigene Entwicklungen dar.

### 3.2.1 Nukleinsäurefällungs- und -extraktionsmethoden

#### 3.2.1.1 Phenolextraktion

Diese Methode entfernt Proteine aus einer Nukleinsäurelösung und kann in jedem Größenmaßstab durchgeführt werden.

#### Reagenzien

Chloroform	Chloroform/Isoamylalkohol (3-Methyl-1-Butanol) im Verhältnis 24:1
Phenol/Chloroform	1 Volumen Phenol + 1 Volumen Chloroform
TE-Puffer	Tris-HCl (pH 7,6) 10 mM
	EDTA (pH 8,0) 1 mM

#### Durchführung

Zu der in wässriger Lösung vorliegenden DNA wird ein Volumen Phenol/Chloroform gegeben und ca. 1 min kräftig geschüttelt. Nach Zentrifugation (20000 g, 5 min, bei RT) wird die obere, wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt. Die DNA wird anschließend mit Ethanol gefällt (s. 3.2.1.2).

### **3.2.1.2 Ethanolfällung**

Mit dieser Methode können alle Nucleinsäuren (sofern sie länger als 50 Nucleotide sind) gefällt werden. Eine Ethanolfällung kann in jedem Größenmaßstab durchgeführt werden.

#### **Reagenzien**

Ethanol z. A., Ethanol 70%, 3 M NaAc (pH 4,8)

#### **Durchführung**

Zu der in wässriger Lösung vorliegenden DNA oder RNA wird 1/10 Volumen 3 M NaAc und 2,5 Volumen Ethanol z. A. gegeben. Die Nucleinsäure wird 15 min bei 4 °C sedimentiert (20000 g). Das DNA-Pellet wird in 70%igem Ethanol resuspendiert. Man zentrifugiert wie oben beschrieben und trocknet die DNA nach dem Abziehen des Überstands bei 37 °C im Hitzeblock. Anschließend wird die DNA in einer entsprechenden Menge H<sub>2</sub>O gelöst.

### 3.2.2 Nukleinsäureisolierungsmethoden

#### 3.2.2.1 Plasmidisolierung aus *E. coli* im kleinen Maßstab

##### Reagenzien

Lösung I	Tris-HCl (pH 8,0)	25 mM
	Glukose	50 mM
	EDTA	10 mM
Lösung II	SDS	1% (w/v)
	NaOH	0,2 M

3M NaAc-Lösung (pH 4,8), Phenol/Chloroform (s. 3.2.1.1), Ethanol z. A., Ethanol 70%.

##### Durchführung

1,5 ml einer Übernachtskultur des betreffenden Klons werden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (6000 g, 1 min, RT). Die Zellen werden in 100 µl Lösung I resuspendiert und 2 min bei RT inkubiert. Danach gibt man 200 µl Lösung II hinzu. Nach kurzem Mischen stellt man den Ansatz für 5 min in ein Eisbad. Nach Zugabe von 150 µl 3 M NaAc (pH 4,8) wird das Lysat für mindestens 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird zentrifugiert (20000 g, 10 min, 4 °C) und der klare Überstand mit einem Volumen Phenol/Chloroform extrahiert (s. 3.2.1.1). Die Plasmid-DNA wird mit Ethanol gefällt (ohne Zugabe von NaAc-Lösung, s. 3.2.1.2) und nach dem Trocknen in 25 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 3.2.2.2 Plasmidisolierung aus *E. coli* mit Hilfe des JETstar Kit (Genomed)

Mit dieser Methode kann man je nach Plasmid bis zu 200 µg Plasmid-DNA aus einer 125 ml Kultur isolieren. Das Verfahren ist auch geeignet, größere Mengen M13 RF-DNA zu isolieren, allerdings sollten die Zellen dann nur bis zur mittleren logarithmischen Phase wachsen.

#### Reagenzien

Puffer E1	Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM
(Zell-Resuspendierung)	EDTA	10 mM
	RNase A	100 µg/ml
Puffer E2	NaOH	200 mM
(Zelllyse)	SDS	1% (w/v)
Puffer E3	Kaliumacetat (pH 5,5)	3,2 M
(Neutralisation)		
Puffer E4	NaCl	600 mM
(Säulenäquilibrierung)	NaAc (pH 5,0)	100 mM
	Triton X-100 <sup>®</sup>	0,15% (w/v)
Puffer E5	NaCl	800 mM
(Säulenwaschung)	NaAc (pH 5,0)	100 mM
Puffer E6	NaCl	1,25 M
(DNA Elution)	Tris-HCl (pH 8,5)	100 mM

Alle Reagenzien sind im JETstar-Kit enthalten.

#### Durchführung

Man zentrifugiert 125 ml Übernachtskultur des betreffenden Klons ab (8000 g, 10 min, 4 °C) und resuspendiert das Zellpellet in 4 ml E1-Puffer. Dann werden 4 ml E2-Puffer in die Suspension gegeben und nach vorsichtigem Mischen 5 min bei RT inkubiert. Nach der Lyse der Zellen und der Neutralisation durch 4 ml E3-Puffer werden die

Proteine und Zelltrümmer abzentrifugiert (35000 g, 10 min, 20 °C). Das Lysat wird auf eine JETstar-Säule gegeben, die zuvor mit 10 ml E4-Puffer äquilibriert wurde. Die Säule mit der gebundenen DNA wäscht man 2x mit 10 ml E5-Puffer. Die DNA wird dann mit 5 ml E6-Puffer eluiert. Die DNA wird mit 0,7 Volumen (3,5 ml) Isopropanol für 5 min bei RT gefällt und anschließend abzentrifugiert (22000 g, 30 min, 4 °C). Man wäscht das Pellet mit 10 ml 70%igem Ethanol, trocknet es im 37 °C Wärmeschrank und nimmt die DNA in 350-400 µl H<sub>2</sub>O auf.

### 3.2.3 Spezifische DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

#### Reagenzien

Stoppuffer	Bromphenolblau	0,2% (w/v)
	EDTA (pH 8,0)	1 mM
	Glyzerin	50% (w/v)
RNase-Lösung	RNase	200 µg/ml
	Tris-HCl (pH 7,5)	10 mM
	NaCl	15 mM
Restriktionsendonuklease		2-5 Einheiten
10x Reaktionspuffer		

#### Durchführung

Eine Einheit Restriktionsendonuklease spaltet in 1 Stunde bei 37 °C 1 µg DNA in einem Endvolumen von 20 µl. Für den Verdau werden die vom Hersteller geforderten Bedingungen eingehalten und die mit den Restriktionsendonukleasen gelieferten Puffer verwendet. Zu der gelösten DNA pipettiert man die erforderliche Menge Restriktionsendonuklease, den entsprechenden 10x Reaktionspuffer und H<sub>2</sub>O (Endvolumen 20 µl). Der Reaktionsansatz wird für mindestens eine Stunde bei 37 °C

inkubiert, die Spaltung wird durch Zugabe von 1/5 Volumen Stopppuffer abgebrochen und das Gemisch auf ein TAE-Agarosegel aufgetragen.

### 3.2.4 Horizontale Agarosegelelektrophorese

#### Reagenzien

20x TAE-Puffer	Tris	484,4 g
	Essigsäure	114 ml
	EDTA	372 g
	H <sub>2</sub> O	ad 5 l → pH 7,8
Größenstandard	1 Kilo-Basenpaare (kBp)-Leiter und 10 Bp-Leiter (Gibco)	
Ethidiumbromid-Lösung	Ethidiumbromid	50 µg
	H <sub>2</sub> O	ad 50 ml

#### Durchführung

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wählt man unterschiedliche Agarosekonzentrationen in den Gelen (0,8-4% (w/v)). Für ein 1%iges Gel werden 2 g Agarose in 200 ml TAE-Puffer suspendiert, durch Kochen im Mikrowellenherd in Lösung gebracht, auf ca. 50 °C abgekühlt und in eine horizontale Kammer gegossen. Nachdem das Gel erstarrt ist, wird es mit TAE-Puffer überschichtet und die mit Stopppuffer versetzten DNA-Proben aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgt bei 80-120 V vom Minus- zum Pluspol.

Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel 15 min in Ethidiumbromid-Lösung (1,5 µg/ml) gefärbt. Die Auswertung erfolgt unter dem Transilluminator.

### 3.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten mit Hilfe des Gene-Clean-Kit (Dianova)

#### Reagenzien

3M NaI, Glasmilch-Suspension, New-Wash-Puffer. (Alle Lösungen sind im Kit enthalten).

#### Durchführung

Die DNA-Bande wird aus dem TAE-Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das Agarosestück wird im Gefäß abgewogen und die 2,5-fache Menge ( $\mu\text{l} \cong \text{mg}$ ) NaI-Lösung zugegeben. Der Ansatz wird bei 50 °C geschüttelt, bis das Agarosestück gelöst ist (ca. 5 min). Danach gibt man 5  $\mu\text{l}$  Glasmilch hinzu und inkubiert 5 min auf Eis. Die Suspension wird kurz abzentrifugiert (2000 g, 20 Sekunden, RT) und das Glasmilch-Pellet 3x mit 400  $\mu\text{l}$  New-Wash-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschen wird der Überstand vollständig entfernt und das Glasmilch-Pellet in 5  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O resuspendiert. Man eluiert 3 min bei 50 °C, zentrifugiert kurz ab und überführt den Überstand mit der gelösten DNA in ein neues Reaktionsgefäß.

### 3.2.6 Modifizierung von DNA-Fragmenten

#### 3.2.6.1 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

#### Reagenzien

10x Dephosphorylierungs-Puffer	Tris-HCl (pH 8,5)	500 mM
	EDTA	1 mM
Alkalische Phosphatase		1 Einheit/ $\mu\text{l}$

## Durchführung

Der Reaktionsansatz (20 µl) enthält 1 µg linearisierte und gereinigte Vektor-DNA, 2 µl 10x Dephosphorylierungs-Puffer und die alkalische Phosphatase (2 Einheiten). Der Ansatz wird 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgt für 10 min bei 65 °C. Die dephosphorylierte DNA wird anschließend mit 180 µl H<sub>2</sub>O verdünnt, 2x mit Phenol/Chloroform extrahiert (s. 3.2.1.1) und mit Ethanol gefällt (s. 3.2.1.2). Nach dem Trocknen wird die DNA in 5 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 3.2.6.2 Auffüllen der 5' überhängenden Enden („Klenow Fill-in“-Reaktion)

Mit Hilfe des Klenow Enzyms können nach Spaltung mit Restriktionsendonukleasen überhängende 5'-Enden der DNA aufgefüllt werden.

## Reagenzien

10x Klenow-Puffer	Tris-HCl (pH 7,5)	100 mM
	MgCl <sub>2</sub>	50 mM
	DTT	75 mM
Klenow-Enzym	DNA Polymerase I, großes Fragment	1 Einheit/µl
EDTA		10 mM
dNTP's		1 mM

## Durchführung

Der Reaktionsansatz (20 µl) enthält die gereinigte DNA, 2 µl 10x Klenow-Puffer, 0,05 mM dNTP's und 1 Einheit Klenow-Enzym/µg DNA. Die Inkubation erfolgt für 15 min bei 25 °C. Die Reaktion wird durch Hinzufügen von EDTA (EK 10 mM) und

10 min Inkubation bei 75 °C gestoppt. Nach Phenol/Chloroform-Extraktion (s. 3.2.1.1) wird mit Ethanol gefällt (s. 3.2.1.2) und die DNA in H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 3.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

#### Reagenzien

10x Ligationspuffer	Tris-HCl (pH 7,5)	500 mM
	MgCl <sub>2</sub>	100 mM
	dATP	10 mM
	DTT	100 mM
	BSA	25 µg/ml
T4 DNA-Ligase		1 Einheit/µl

#### Durchführung

Für die meisten Ligationen ist es ausreichend, ein molares Vektor/Insert-Verhältnis von 1/2 bis 1/3 zu wählen, d.h. im Reaktionsansatz befinden sich dann 2x bzw. 3x mehr Insert als Vektormoleküle.

Man gibt die zu ligierende DNA in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß, fügt eine entsprechende Menge 10x Ligationspuffer sowie 1 µl T4 DNA-Ligase zu und füllt mit H<sub>2</sub>O auf das gewünschte Endvolumen auf. Der Ansatz wird für 12-16 Stunden bei 16 °C inkubiert. Anschließend wird die Transformation (s. 3.2.9.2) durchgeführt.

### 3.2.8 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mit der Polymerase-Ketten-Reaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (englisch: Polymerase Chain Reaction; PCR) ist es möglich, spezifische DNA-Abschnitte *in vitro* zu amplifizieren. Hierbei ist die thermostabile DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* (= Taq-Polymerase) entscheidend, da sie ihre Aktivität auch nach Erhitzen auf 95 °C beibehält. Für eine optimale Hybridisierung sollten die benötigten Oligonukleotide eine Sequenzlänge von 16-35 Bp haben und am 5'- und 3'-Ende ein Guanin- oder ein Cytosin-Nukleotid enthalten.

#### Reagenzien

DNA-Matrize		50 ng/μl
Oligonukleotide	5'-Oligonukleotid	10 μM
	3'-Oligonukleotid	10 μM
dNTP's	dATP	0,5 mM
	dCTP	0,5 mM
	dGTP	0,5 mM
	dTTP	0,5 mM
10x PCR-Puffer	Tris-HCl (pH 8,4)	25 mM
	KCl	125 mM
	MgCl <sub>2</sub>	1,9 mM
Taq-DNA-Polymerase		5 Einheiten/μl
H <sub>2</sub> O		ad. 50 μl

#### Durchführung

Zu der zu amplifizierenden DNA (1 μl) werden je 1 μl Oligonukleotid, 1 μl dNTP's, 5 μl 10x PCR-Puffer, 0,125 μl Taq-DNA-Polymerase und H<sub>2</sub>O bis zu einem Endvolumen von 50 μl gegeben. Die initiale Denaturierung erfolgt für 5 min bei 95 °C. Es folgen 25 PCR-Zyklen, in denen der Doppelstrang denaturiert wird (95 °C, 45

Sekunden), die Oligonukleotide hybridisieren (55 °C, 45 Sekunden) und die Taq-DNA-Polymerase die DNA-Stränge auffüllt (72 °C, 90 Sekunden). Der terminale Schritt der PCR ist eine Inkubation bei 72 °C (4 min).

Zur Überprüfung des Versuchs wird eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitamplifiziert, die zusammen mit den PCR-Proben auf ein Agarosegel aufgetragen werden (5 µl PCR-Reaktions-Lösung + 4 µl Stopppuffer).

### 3.2.9 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation von *E. coli*

#### 3.2.9.1 Herstellung kompetenter Zellen

##### Reagenzien für CCMB80

CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	11,8 g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	4,0 g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2,0 g
Kaliumacetat	0,98 g
Glyzerin (steril)	100 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1 l

LB-Medium (s. 3.1.5)

#### Durchführung

Die Salze werden in 700 ml H<sub>2</sub>O gelöst und die fertige Lösung wird steril filtriert. Danach werden 100 ml steriles Glyzerin zugegeben und mit sterilem H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt. Die CCMB80-Lösung wird bei 4 °C gelagert.

## Herstellung kompetenter Zellen

100 ml LB-Medium werden mit 1 ml einer Übernachtskultur des betreffenden *E. coli* Stammes beimpft und in einem Kolben solange bei 37 °C geschüttelt, bis eine Absorption bei 600 nm ( $A_{600}$ ) von 0,5 erreicht ist. Die Suspension wird abzentrifugiert (7000 g, 10 min, 4 °C), in 10 ml eiskalter CCMB80-Lösung resuspendiert und für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wird das Zellpellet in 2 ml eiskalter CCMB80-Lösung resuspendiert. Die kompetenten Zellen können direkt für die Transformation eingesetzt oder als 200 µl Aliquots bis zu einem Jahr bei -80 °C gelagert werden.

### 3.2.9.2 Transformation kompetenter Zellen

#### Reagenzien

LB-Medium (s. 3.1.5)

#### Durchführung

200 µl frische oder aufgetaute kompetente Zellen (s. 3.2.9.1) werden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 0,1-1 µg Plasmid-DNA versetzt und mindestens 25 min auf Eis gestellt. Der Transformationsansatz wird in einem Wasserbad 2½ min bei 42 °C inkubiert. Nach dem Hitzeschritt wird der Ansatz für 5 min auf Eis gekühlt und dann mit 1 ml LB-Medium versetzt. Das Transformationsgemisch wird für eine Stunde unter leichtem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Je 100 µl des Transformationsansatzes werden auf selektive Agarplatten plattiert. Die Platten inkubiert man über Nacht bei 37 °C.

### 3.2.10 Gerichtete Mutagenese mit Hilfe des „Sculptor™ *in vitro* Mutagenesis System“

Für diese Methode muss die zu mutierende DNA (in dieser Arbeit V2-Rezeptor cDNA) im Phagenvektor vorliegen.

Während der Synthesereaktion des mutierten Stranges werden dCTP $\alpha$ S-Nukleotide eingebaut. Beim Basenanalogue dCTP $\alpha$ S ist am  $\alpha$ -Phosphat ein Sauerstoffatom durch ein Schwefelatom substituiert. Dies ermöglicht die selektive Spaltung der nicht mutierten DNA-Stränge mit dem Restriktionsenzym *Nci*I; das die Phosphorthioat Bindungen im mutierten Strang nicht angreifen kann. Die nicht mutierten DNA-Stränge können anschließend mit Exonuklease III entfernt werden. Die mutierte doppelsträngige (ds) DNA wird zum Schluß mit Hilfe der DNA-Polymerase I und T4-DNA-Ligase erzeugt.

#### 3.2.10.1 Herstellung von *E. coli* TG1 Lawn Cells (Zellrasen für M13 Plaques)

Eine *E. coli* TG1 Kolonie wird mit einer sterilen Plastikpipettenspitze ausgestochen. Drei ml LB-Medium werden mit der Kolonie beimpft und der Ansatz bei 37 °C über Nacht im Schüttler inkubiert. 40 ml LB-Medium werden mit 400  $\mu$ l Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C für ca. 2 Stunden im Schüttler (150 rpm) inkubiert, bis eine  $A_{600}$  von 0,3 erreicht ist. Die Zellen können bei 4 °C bis zu einer Woche aufbewahrt werden.

#### 3.2.10.2 Herstellung eines rekombinanten Phagenstocks

Das M13.V2R-Plasmid wird in *E. coli* TG1 transformiert (s. 3.2.9.2) (Hitzeschock: 45 Sekunden). Die transformierten Zellen werden mit 200  $\mu$ l Lawn Cells und 3-4 ml geschmolzenem H Top-Agar (45 °C) (s. 3.1.5) vermischt. Die Suspension wird auf eine vorgewärmte LB-Agarplatte gegossen und bei 37 °C über Nacht im Wärmeschrank inkubiert.

Nach 18 Stunden Inkubation erkennt man im Zellrasen die Phagenplaques. Die Plaques werden mit einem sterilen Zahnstocher in 1,5 ml einer 1:100 verdünnten *E. coli* TG1-Übernachtskultur überimpft. Die infizierten Zellen werden bei 37 °C für 4 Stunden im Schüttler (120 rpm) inkubiert und danach in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen werden abzentrifugiert (15000 g, RT, 5 min), der Phagenüberstand in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und mit zwei Tropfen Chloroform vermischt. Der Phagenstock kann für mehrere Monate bei 4 °C aufbewahrt werden.

### 3.2.10.3 Isolierung der ssDNA

#### Reagenzien

LB-Medium (s. 3.1.5)		
PEG-Lösung (steril filtriert)	PEG 6000	20% (w/v)
	NaCl	2,5 M
TE-Puffer	Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
	EDTA	1 mM
NTE-Puffer	Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
	EDTA	1 mM
	NaCl	100 mM

#### Durchführung

1,25 ml *E. coli* TG1 Lawn Cells (s. 3.2.10.1) werden mit 0,25 ml Phagenstock (s. 3.2.10.2) infiziert (5 min, RT). Nach Zugabe von 120 ml LB-Medium wird 5 Stunden bei 37 °C im Schüttler (120 rpm) inkubiert. Die Zellen werden abzentrifugiert (23000 g, 20 min, 4 °C), der Überstand mit 25 ml PEG 6000 (20% w/v) Lösung versetzt und für 30 min bei 4 °C inkubiert.

Die Suspension wird erneut abzentrifugiert (3500 g, 20 min, 4 °C) und das Phagenpellet in 10 ml Tris-EDTA (pH 8,0) resuspendiert. Die in Tris-EDTA-Puffer

gelösten Phagen werden durch Zentrifugation (3500 g, 20 min, 4 °C) von Aggregaten befreit. Der die Phagen enthaltende Überstand wird in ein neues Zentrifugenröhrchen gegeben. Anschließend werden 2,2 ml PEG 6000 Lösung zugefügt, die Suspension erneut für 30 min bei 4 °C inkubiert und die Phagen abzentrifugiert (3500 g, 20 min, 4 °C). Das Phagenpellet wird in 200 µl NTE-Puffer resuspendiert und in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Für die Reinigung der ssDNA wird zuerst eine Phenol/Chloroform-Extraktion und dann eine Ethanolfällung durchgeführt. Die ssDNA wird in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 3.2.10.4 Gerichtete Mutagenese

#### Reagenzien

Die für die gerichtete Mutagenese benötigten Reagenzien sind im „Sculptor™ *in vitro* Mutagenesis System“ enthalten.

#### Durchführung

#### Phosphorylierung des 5'-Endes des Mutagenese-Oligonukleotids

Da bei der gerichteten Mutagenese nach der Auffüllreaktion auch am 5'-Ende des Oligonukleotids eine Ligation erfolgt, muss dieses zuvor mit Hilfe des Enzyms Polynukleotidkinase phosphoryliert werden.

#### Reagenzien

Oligonukleotid	40 pmol	5 µl
10x Kinasepuffer		4 µl
ATP	10 mM	4 µl
T4 Polynukleotidkinase	4 Einheiten/µl	1 µl
H <sub>2</sub> O		26 µl

### Durchführung

Der Ansatz wird in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die Reaktion wird bei 70 °C (10 min) gestoppt.

### Hybridisierung des Mutagenese-Oligonukleotids an die ssDNA

Das molare Verhältnis des Oligonukleotids zur ssDNA beträgt 5/1 bis 10/1.

### Reagenzien

M13.V2R-ssDNA	3,9 µg	5 µl
phosphoryliertes Oligonukleotid	2,4 pmol	2 µl
Puffer A		1 µl
H <sub>2</sub> O		1 µl

### Durchführung

Die Reagenzien werden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert. Der Ansatz wird für 3 min bei 70 °C inkubiert, auf 37 °C abgekühlt und dann 30 min bei dieser Temperatur inkubiert. Die Reaktion wird bei 4 °C abgestoppt.

### Synthese und Ligation des mutierten (-) DNA-Stranges

### Reagenzien

dNTP Gemisch A		10 µl
T4 DNA-Ligase	2,5 Einheiten/µl	1 µl
T7 DNA-Polymerase	0,8 Einheiten/µl	1 µl

## Durchführung

Zu dem auf 4 °C abgekühlten Hybridisierungsansatz werden die oben aufgeführten Reagenzien hinzupipettiert und das Reaktionsgemisch für 10 min bei RT, für 30 min bei 37 °C und für 15 min bei 70 °C inkubiert.

## Verdau von nicht mutierten (+) DNA-Strängen durch T5 Exonuklease

### Reagenzien

Puffer B <sup>1</sup>		50 µl
T5 Exonuklease	2000 Einheiten/µl	2 µl

## Durchführung

Die oben aufgeführten Reagenzien werden zu dem auf RT abgekühlten Polymerisations/Ligations-Ansatz hinzugegeben. Es wird kurz gemischt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die Inaktivierung erfolgt bei 70 °C für 15 min.

## Restriktionsendonuklease-Verdau des nicht mutierten (+) DNA-Stranges

### Reagenzien

Puffer C	5 µl
<i>NciI</i> <sup>2</sup>	5 Einheiten

<sup>1</sup> Für die Mutagenese der Rezeptormutanten Δ336-340, L339/340I und L339/340T wurde der Puffer B für *PvuI* eingesetzt.

<sup>2</sup> Für die Mutagenese der Rezeptormutanten Δ336-340, L339/340I und L339/340T wurde das Enzym *PvuI* (24 Einheiten) eingesetzt. Für die Mutagenese der Rezeptormutanten L340I und L340T wurde das

### **Durchführung**

Die oben aufgeführten Reagenzien werden zu dem auf RT abgekühlten Exonuklease-Ansatz hinzugegeben und das Gemisch für 90 min bei 37 °C inkubiert.

### **Entfernung des nicht mutierten (+) DNA-Stranges**

#### **Reagenzien**

Puffer D	20 µl
Exonuklease III	160 Einheiten

### **Durchführung**

Die oben aufgeführten Reagenzien werden zum Restriktionsendonuklease-Ansatz hinzugefügt. Es wird bei 37 °C für 30 min inkubiert und anschließend bei 70 °C für 15 min inaktiviert.

### **Repolymerisierung des anverdauten (-) DNA-Stranges**

#### **Reagenzien**

dNTP Gemisch B	20 µl
DNA-Polymerase I	3,5 Einheiten
T4 DNA-Ligase	2,5 Einheiten

### **Durchführung**

Zu dem auf RT abgekühlten Exonuklease III-Ansatz werden die oben aufgeführten Reagenzien hinzugegeben. Das Gemisch wird 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

---

Enzym *Ava*I (12 Einheiten) eingesetzt. Diese Enzyme mussten verwendet werden, da die entsprechenden Mutagenese-Oligonukleotide Schnittstellen für *Nci*II aufwiesen.

## Transformation des mutierten M13-Plasmids

### Durchführung

Aus dem Mutageneseansatz werden 10 µl entnommen und mit 90 µl H<sub>2</sub>O verdünnt. Damit werden 300 µl kompetente *E. coli* TG1 Zellen (s. 3.2.10.1) transformiert (s. 3.2.9.2) (Hitzeschockschritt: 45 Sekunden). Die Zellen werden wie unter 3.2.10.2 beschrieben ausplattiert. Als Positivkontrolle wird M13 mp8 RF DNA und als Negativkontrolle H<sub>2</sub>O ohne DNA verwendet. Die Platten werden bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert und am nächsten Morgen ausgewertet. Klone mit Insert (positive Klone) sind an den hellen Plaques zu erkennen.

### 3.2.11 Gerichtete Mutagenese mit Hilfe des „QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit“

Bei dieser Methode kann man mit einer ds Matrize direkt gerichtete Mutagenesen durchführen. Es werden keine speziellen Vektoren mehr benötigt. Das Plasmid, in das die Mutation eingeführt werden soll, wird denaturiert und die Mutagenese-Oligonukleotide hybridisiert. Mit Hilfe der *Pfu-Turbo*™ DNA-Polymerase werden methylierte, mutierte Stränge aufgefüllt und es entstehen Plasmide mit Einzelstrangbrüchen. Die nicht-methylierten, wildtypischen Matrizen-Stränge werden mit dem Enzym *DpnI* entfernt. Die mutierten Plasmide mit den Einzelstrangbrüchen werden in kompetente *E. coli* XL1-Blue Zellen transformiert. Die *E. coli* XL1-Blue Zellen können die Einzelstrangbrüche reparieren und die mutierten Plasmide replizieren.

## Reagenzien

Alle Reagenzien werden mit dem Kit geliefert.

<i>Pfu Turbo</i> <sup>TM</sup> DNA-Polymerase	2,5 Einheiten/ $\mu$ l	30 $\mu$ l
10x Reaktionspuffer	100 mM KCl 100 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 200 mM Tris-HCl (pH 8,8) 20 mM MgSO <sub>4</sub> 1% Triton X-100 <sup>®</sup> 1 mg/ml BSA	1 ml
<i>DpnI</i> -Restriktionsendonuklease	10 Einheiten/ $\mu$ l	30 $\mu$ l
Kontroll-Oligonukleotid #1	(34-mer) 100 ng/ $\mu$ l	7,5 $\mu$ l
Kontroll-Oligonukleotid #2	(34-mer) 100 ng/ $\mu$ l	7,5 $\mu$ l
pWhitescript <sup>TM</sup> 4,5 kB Kontroll-Plasmid	5 ng/ $\mu$ l	10 $\mu$ l
dNTP Gemisch		30 $\mu$ l
Epicurian Coli <sup>®</sup> XL1-Blue kompetente Zellen		8x 200 $\mu$ l
pUC18 Kontroll-Plasmid	0,1 ng/ $\mu$ l in TE-Puffer	10 $\mu$ l
LB-Medium für QuikChange <sup>TM</sup>	(s. 3.1.5)	

## Durchführung

### Denaturierung, Bindung der Oligonukleotide und Auffüllreaktion

Folgende Reagenzien werden in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben:

- 5  $\mu$ l 10x Reaktionspuffer
- 1  $\mu$ l (50 ng) ds DNA (Matrize)
- 2,5  $\mu$ l (125 ng) Mutagenese-Oligonukleotid #1
- 2,5  $\mu$ l (125 ng) Mutagenese-Oligonukleotid #2
- 1  $\mu$ l dNTP Mix
- 38  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

Für die Mutagenese-Kontrollreaktion werden statt der DNA-Matrizen 2 µl (10 ng) pWhitescript™ 4,5 kB Kontroll-Plasmid verwendet; statt der Mutagenese-Oligonukleotid #1 und #2 werden je 1,25 µl (125 ng) der entsprechenden Kontroll-Oligonukleotide verwendet. Der Reaktionsansatz wird mit H<sub>2</sub>O auf 50 µl Endvolumen aufgefüllt.

Zum Schluß werden bei beiden Ansätzen 1 µl (2,5 Einheiten) *Pfu Turbo*™ DNA-Polymerase zugefügt und eine PCR mit folgenden Bedingungen durchgeführt:

Segment	Anzahl	Temperatur in °C	Zeit
initiale	1	95	30 Sekunden
Denaturierung			
Zyklen	12	95	30 Sekunden
		55	1 min
		68	12 min

### Verdau der nicht mutierten DNA-Stränge

Die Proben werden nach Beendigung der Auffüllreaktion für 2 min auf Eis gestellt. Zu jedem Ansatz wird 1 µl *DpnI* hinzugegeben und danach bei 37 °C für eine Stunde inkubiert.

### Transformation der Epicurian Coli® XL1-Blue Zellen

Vom Mutagenese- und vom Kontrollansatz werden je 1-5 µl mit 50 µl Zellen vermischt und die Ansätze danach für 30 min auf Eis inkubiert.

Als Transformationskontrolle dient eine dritte Transformation mit 1 µl (0,1 ng/µl) pUC18 Kontroll-Plasmid.

Die Transformationsansätze werden für 45 Sekunden bei 42 °C im Wasserbad und danach für 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden 0,5 ml LB-Medium für

QuikChange™ (s. 3.1.5) hinzugegeben und im Schüttler bei 37 °C für 1 Stunde inkubiert.

### **Ausplattierung**

Die Kontrollansätze (250 µl Mutagenese-Kontrolle, 5 µl Transformations-Kontrolle) werden auf LB-Agarplatten (mit X-Gal/IPTG und Ampicillin) (s. 3.1.5) ausplattiert.

Der Mutagenese-Ansatz wird vollständig auf einer LB-Agarplatte ausplattiert, die für den verwendeten Plasmidvektor selektiv ist. Die Platten werden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Beim Ansatz der Mutagenese-Kontrolle sollten über 80% der Kolonien die Mutation enthalten (blaue Klone). Bei der Transformations-Kontrolle sollten mehr als 250 Kolonien vorliegen von denen über 98% blaue Kolonien sind ( $> 10^8$  koloniebildende Einheiten).

### 3.2.12 DNA-Sequenzierung nach der Dideoxymethode (TABOR UND RICHARDSON, 1987)

#### Reagenzien

ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit:

Terminator Ready Reaction Mix	ddATP-/ddCTP-/ddGTP-/ddTTP-Dye Terminator dITP, dATP, dTTP, dCTP Tris-HCl (pH 9,0) MgCl <sub>2</sub> Thermostabile Pyrophosphatase AmpliTaq DNA-Polymerase, FS
10x TBE-Laufpuffer	Tris 108 g Borsäure 55 g EDTA 9,32 g H <sub>2</sub> O ad 1 l → pH 8,3
Polyacrylamid-Gel (6%)	Harnstoff 22,5 g 10x TBE 4,5 ml Acrylamid/ N,N-Methylenbisacrylamid (37,5%/2,5% (w/v)) 6,75 ml APS-Lösung 150 µl H <sub>2</sub> O ad 45 ml

Sonstiges: 50 mM EDTA (pH 8,0), Formamid deion., Ethanol z.A., Ethanol 70% (v/v), 3M NaAc (pH 4,6), APS-Lösung 10% (w/v).

## Durchführung

Zyklische Sequenzierungsreaktion:

Ready-Reaction-Mix	4 $\mu$ l
DNA (500 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Oligonukleotid (4 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	ad 10 $\mu$ l

Beim Thermocycler wird folgendes Programm eingestellt (26 Zyklen):

Denaturierung	96 °C, 16 Sekunden
Bindung	52 °C, 16 Sekunden
Polymerisierung	60 °C, 4 min

Nach Beendigung der Reaktion werden zur Reinigung der Proben je 2 ml 3 M NaAc (pH 4,6) und 50  $\mu$ l Ethanol zugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wird der Ansatz zentrifugiert (22000 g, RT, 30 min), das DNA-Pellet mit 250  $\mu$ l 70% Ethanol gewaschen und bei 37 °C getrocknet.

Die Proben werden mit 4,5  $\mu$ l 50 mM EDTA (pH 8,0)/deion. Formamid (im Verhältnis 1/50) resuspendiert und direkt auf das Gel aufgetragen (Geldicke: 0,4 mm). Der Gellauf erfolgt mit TBE-Laufpuffer mit Hilfe des automatischem Sequenzierers ABI 373 A (Perkin Elmer) bei 40 W (1200-1500 V).

### 3.2.13 Transiente Transfektion von COS.M6-Zellen

COS.M6-Zellen exprimieren konstitutiv das SV40 T-Antigen und ermöglichen dadurch die Replikation von Plasmiden, die einen SV40-Origin enthalten.

Die transiente Transfektion der Zellen mit Plasmiden erfolgt mit Hilfe von kationischen Lipiden (=Lipofectin™, Lipofectamin™; SuperFect™). Diese binden an

die negativ geladene DNA und können als Liposomen-Nukleinsäure-Komplex mit der Plasmamembran der Zelle fusionieren

### Reagenzien

500x	Penicillin	100 IE/ml
Penicillin/Streptomycin	Streptomycin	100 µg/ml
Zellkulturmedium	DMEM (pH 7,4)	90% (v/v)
	FKS	10% (v/v)
	500x	1% (w/v)
	Penicillin/Streptomycin	
PBS	NaCl	80 g/l
	KCl	0,2 g/l
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,44 g/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g/l → pH 7,4
STV <sup>3</sup> -Lösung	Trypsin	0,05% (w/v)
	EDTA	0,02% (w/v)
	PBS	ad 100 ml

Sonstiges: Lipofectin™, Lipofectamin™, SuperFect™

#### 3.2.13.1 Aussaat

Konfluent gewachsene Zellen werden 1x mit PBS (3 ml, 37 °C) gewaschen und mit 2 ml STV-Lösung (37 °C) ca. 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abrundung der Zellen wird die STV-Lösung zu 80% abgesaugt. Die Zellen werden weitere 10 min bei 37 °C inkubiert, vom Boden abgeklopft und anschließend in einem entsprechenden Volumen Zellkulturmedium (37 °C) aufgenommen. Nach Auszählung der Zellen mit einer Neubauer-Zählkammer werden die Zellen in der gewünschten Dichte ausgesät (2,5x

<sup>3</sup> solution trypsin *versene*

$10^5$  Zellen/60er Schale;  $1 \times 10^5$  Zellen/35er Schale;  $0,5 \times 10^5$  Zellen/Well bei 24-Well-Platte). Die Inkubation erfolgt über Nacht im CO<sub>2</sub>-begasten Brutschrank bei 37 °C.

### 3.2.13.2 Transiente Transfektion mit Lipofectin™ oder Lipofectamin™

Einen Tag nach der Aussaat werden die Zellen transient mit Plasmid-DNA transfiziert. Hierbei ist zu beachten, dass das Zellkulturmedium FKS- und antibiotikafrei ist, da das Serum die Transfektion mit Lipofectin™ (Lipofectamin™) stören würde.

Transfektionsansatz

Schale	DNA (Konzentration > 0,1 µg/µl)	Lipofectin™
60er	2,5 µg in 250 µl Medium	18,75 µl in 250 µl Medium
35er	1 µg in 100 µl Medium	7,5 µl in 100 µl Medium
24-Well-Platte (je Well)	0,25 µg in 25 µl Medium	2 µl in 25 µl Medium

Die DNA und das Lipofectin™ werden im Medium gelöst. Beide Ansätze werden gemischt und für mindestens 20 min bei RT inkubiert. Danach wird serumfreies Medium zugegeben (2 ml/60er Schale; 800 µl/35er Schale; 250 µl/Well in 24-Well-Platten).

Die Zellen werden zwei Mal mit serumfreiem Medium gewaschen und danach mit dem Transfektionsansatz überschichtet. Die Transfektion erfolgt über Nacht im CO<sub>2</sub>-begasten Brutschrank bei 37 °C (ca. 18 Stunden). Nach der Transfektion wird das serumfreie Medium durch Medium mit 10% FKS und Antibiotika ersetzt (60er Schale = 5 ml, 35er Schale = 2 ml, 24er Well = 1 ml/Well). Die Zellen werden zwei Tage im CO<sub>2</sub>-begasten Brutschrank inkubiert.

Die Transfektion mit Lipofectamin™ erfolgt wie bei Lipofectin™. Das Transfektionsgemisch verbleibt allerdings nur 6 Stunden auf den Zellen. Mit dieser

Methode können auch HEK293-Zellen transfiziert werden. Diese Zellen können schon 24 Stunden nach der Transfektion für den Folgeversuch verwendet werden.

### 3.2.13.3 Transiente Transfektion mit SuperFect™

Die transiente Transfektion mit SuperFect™ erfolgt analog der Lipofectin™ Methode.

Transfektionsansatz

Schale	DNA (Konzentration > 0,1 µg/µl)	SuperFect™
60er	5 µg in 150 µl Medium	30 µl
35er	2 µg in 60 µl Medium	7,5 µl

Die DNA wird im Medium (ohne FKS und Antibiotika) gelöst und das SuperFect™-Reagenz zugegeben. Der Ansatz wird für 5-10 min bei RT inkubiert und mit Medium (mit FKS und Antibiotika) versetzt (1 ml/60er Schale; 400 µl/35er Schale).

Die Schalen mit den Zellen werden 2x mit serumfreiem Medium gewaschen und der Transfektionsansatz zugegeben. Die Transfektion erfolgt über 2-3 Stunden im CO<sub>2</sub>-begasten Brutschrank bei 37 °C. Nach der Transfektion wird die Transfektions-Lösung durch Zellkulturmedium (s. 3.2.13) ersetzt (60er Schale = 5 ml, 35er Schale = 2 ml). Die Zellen werden für zwei Tage im CO<sub>2</sub>-begasten Brutschrank inkubiert.

### 3.2.14 Bestimmung der Proteinkonzentration

#### Reagenzien

Coomassie-Proteinreagenz Brillantblau	CBB	100 mg/l
G250-Lösung (CBB)	Ethanol 95 Vol. %	4,25% (v/v)
	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85%	8,5% (v/v)

Sonstiges: Ovalbumin (0,1 mg/ml und 1 mg/ml), 2 N NaOH, H<sub>2</sub>O.

### **Durchführung**

Zuerst wird eine Eichkurve mit bekannten Ovalbuminkonzentrationen aufgenommen (0, 1, 2, 5, 10, 20 und 40 µg in 50 µl H<sub>2</sub>O). Je 5 µl der Proteinprobe werden mit 45 µl H<sub>2</sub>O verdünnt.

Nach Zugabe von 50 µl NaOH-Lösung werden die Ansätze für 10 min bei 60 °C inkubiert. Dann wird 1 ml CBB hinzugefügt und die Absorption bei 595 nm im Spektrophotometer gemessen. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration der eigentlichen Proben werden 5 µl mit 45 µl H<sub>2</sub>O verdünnt. Die Proteinbestimmung erfolgt wie oben für die Ovalbuminlösung beschrieben. Der Vergleich mit der Eichkurve liefert die Proteinkonzentration der Probe.

### **3.2.15 Gesamtmembran-Präparation von eukaryontischen Zellen**

Diese Methode wird für die Isolierung von Membranen von COS.M6-, MDCKII- und HEK293-Zellen verwendet.

## Reagenzien

PBS	(s. 3.2.13)	
PMSF-Lösung	PMSF	40 mM (in Ethanol z. A.)
Proteaseinhibitoren- Gemisch	Benzamidin	100 mM
	Trypsininhibitor	2 µg/ml
	Aprotinin	1 µg/ml
PBSI	PBS	10 ml
	PMSF-Lösung	125 µl
	Proteaseinhibitoren- Gemisch	80 µl

## Durchführung

Für die Fraktionierung von COS.M6-Zellen werden konfluent bewachsene 60er und 35er Kulturschalen verwendet. Die Zellen werden 3x mit eiskaltem PBS gewaschen, mit 1 ml PBSI abgeschabt und mit dem Ultraschallgerät (2x 2 Sekunden) lysiert. Die Trennung von membrangebunden und löslichen Proteinen erfolgt durch Ultrazentrifugation (100000 g, 4 °C, 1 Stunde). Die löslichen Proteine werden mit dem Überstand abgenommen. Das Membranpellet wird in 1 ml PBSI resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (100000 g, 4 °C, 1 Stunde) wird der Überstand verworfen und das Pellet in einem geeigneten Volumen<sup>4</sup> PBSI resuspendiert.

### 3.2.15.1 Verdau der DNA in den Membranpräparationen

Diese Methode dient der Entfernung hochmolekularer DNA, die sich durch die Ultrazentrifugation in der Membranpräparation anreichern kann.

---

<sup>4</sup> Das Volumen wird nach der Proteinkonzentrationsbestimmung so berechnet, dass in jeder Probe gleiche Proteinkonzentrationen vorliegen.

**Reagenzien**

DNase (RNase frei) 10 Einheiten/ $\mu$ l

**Durchführung**

Um die DNA aus den Proben zu entfernen werden zu 200  $\mu$ l Membranpräparation 2  $\mu$ l DNase (10 Einheiten/ $\mu$ l; RNase frei) gegeben und für 20 min bei 37 °C inkubiert.

**3.2.15.2 Analyse des Glykosylierungsstatus von Membranproteinen**

Im ER-Lumen von eukaryontischen Zellen erfolgt die kovalente Anheftung von Zuckermolekülen an die Proteine. Bei der N-Glykosylierung werden die Oligosaccharide an die NH<sub>2</sub>-Gruppe der Seitenkette eines Asparaginrests gebunden. Um den Glykosylierungsstatus der Proteine zu bestimmen werden Endoglykosidase H (*EndoH*) und Peptid-Endoglykosidase F (*PNGaseF*) eingesetzt. *EndoH* entfernt nur mannosereiche-Glykosylierungen, die bei Proteinen zu finden sind, die im ER oder im frühen Golgi-Apparat lokalisiert sind. *PNGaseF* hingegen kann sowohl mannosereiche- als auch komplexe Glykosylierungen abspalten; letztere liegen erst nach Durchlauf durch den späten Golgi-Apparat vor und stellen kein Substrat für *EndoH* dar.

**3.2.15.2.1 Verdau der mannosereichen Glykosylierung mit *EndoH*****Reagenzien**

10x Denaturierungspuffer	SDS	5% (w/v)
	$\beta$ -Mercaptoethanol	10% (v/v)
10x G5-Puffer	Na-Citrat (pH 5,5)	0,5 M
<i>EndoH</i>		1000 Einheiten/ $\mu$ l
H <sub>2</sub> O		

## Durchführung

Die Membranfraktion einer 60er Schale eukaryontischer Zellen wird nach der Zellfraktionierung (s. 3.2.15) in  $\geq 100 \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen<sup>4</sup>. Für den *EndoH*-Verdau werden  $30,6 \mu\text{l}$  entnommen und mit  $4,05 \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  sowie mit  $3,85 \mu\text{l}$  10x Denaturierungspuffer versetzt. Das Gemisch wird für 10 min bei  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  denaturiert. Nach Abkühlung auf RT gibt man zu diesem Ansatz  $4,5 \mu\text{l}$  G5-Puffer und  $2 \mu\text{l}$  *EndoH*. Dieser Reaktionsansatz wird für mindestens 1 Stunde bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert.

### 3.2.15.2.2 Verdau der komplexen Glykosylierung mit *PNGaseF*

#### Reagenzien

10x Denaturierungspuffer	(s. 3.2.15.2.1)	
NP-40		10% (w/v)
10x G7-Puffer	$\text{Na}_2\text{PO}_4$ (pH 7,5)	0,5 M
<i>PNGaseF</i>		500 Einheiten/ $\mu\text{l}$

#### Durchführung

Die Membranfraktion einer 60er Schale eukaryontischer Zellen wird nach der Zellfraktionierung (s. 3.2.15) in einem Volumen  $\geq 100 \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen. Für den *PNGaseF* Verdau werden  $30,6 \mu\text{l}$  aus der Präparation entnommen, mit  $3,4 \mu\text{l}$  10x Denaturierungspuffer versetzt und für 10 min bei  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach Abkühlung auf RT gibt man zu diesem Ansatz  $4,5 \mu\text{l}$  NP-40,  $4,5 \mu\text{l}$  G7-Puffer und  $2 \mu\text{l}$  *PNGaseF*. Der Verdau erfolgt für mindestens 1 Stunde bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.2.15.3 Membranpräparation (ohne Verdau der Glykosylierung)

#### Reagenzien

4x Laemmli-	Glyzerin	2 ml
Probenpuffer	10% SDS (w/v)	1,5 ml
	2M Tris-HCl (pH 6,8)	1 ml
	2-Mercaptoethanol	375 µl
	Bromphenolblau	5 mg
H <sub>2</sub> O		

#### Durchführung

Die Membranfraktion einer 60er Schale eukaryontischer Zellen wird nach der Zellfraktionierung (s. 3.2.15) in einem Volumen  $\geq 100 \mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O aufgenommen. Aus der Präparation werden 30,6  $\mu\text{l}$  entnommen, mit 14,4  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O verdünnt und nach Zugabe von 15  $\mu\text{l}$  4x Laemmli-Probenpuffer, werden die Proteine für 5 min bei 95 °C denaturiert.

### 3.2.16 Nachweis der Fusionsproteine im Western Blot

#### 3.2.16.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (=PAGE) (LAEMMLI, 1970) wird in einem diskontinuierlichen Puffersystem durchgeführt. Die Diskontinuität bezieht sich auf die Gelstruktur (großporiges Sammelgel, engporiges Trenngel), den pH-Wert (pH 6,8 Sammelgel  $\rightarrow$  pH 8,8 Trenngel) und der Ionenstärke der Puffer. Durch Aufspalten

der Wasserstoffbrückenbindungen der Tertiär- und Sekundärstruktur und durch Streckung der Moleküle gleicht das anionische Detergens SDS die unterschiedlichen Ladungen aus. Die Schwefelbrücken, die zwischen den Cysteinen gebildet werden können, werden durch Zugabe der reduzierenden Thiolverbindung 2-Mercaptoethanol aufgespalten. Die Proteine werden auf diese Weise nur nach ihrer Molekülgröße im elektrischen Feld getrennt.

## Reagenzien

4x Laemmli-Probenpuffer	(s. 3.2.15.3.1)	
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30	gebrauchsfertige, gasstabilisierte, wässrige, 30%ige Acrylamidstammlösung mit 0,8% Bisacrylamid	
Trenngelpuffer	Tris-HCl (pH 8,8)	0,75 M
Sammelgelpuffer	Tris-HCl (pH 6,8)	0,625 M
SDS-Lösung	SDS	20% (w/v)
TEMED	unverdünnt	
APS-Lösung	(s. 3.2.13.1)	
Laufpuffer	Tris	3 g
	Glyzin	14,4 g
	SDS	1 g
		ad 1 l → pH 8,3-8,4

## Durchführung

Trenngel	Acrylamidstammlösung	3,75 ml
	Trenngelpuffer	5,625 ml
	SDS-Lösung	56,5 µl
	TEMED	5,65 µl
	H <sub>2</sub> O	1,75 ml
	APS-Lösung	79 µl

Die einzelnen Komponenten werden in dieser Reihenfolge vermischt und das Gel sofort gegossen. Um einen glatten Oberflächenrand des Trenngels zu bekommen, wird

es mit 70%igem Isopropanol beschichtet. Das Isopropanol wird nach Polymerisierung des Trenngels unmittelbar vor dem Gießen des Sammelgels entfernt.

Sammelgel	Acrylamidstammlösung	835 µl
	Sammelgelpuffer	625 µl
	SDS-Lösung	25 µl
	TEMED	5 µl
	H <sub>2</sub> O	3,5 ml
	APS-Lösung	25 µl

Die einzelnen Komponenten des Sammelgels werden ebenfalls in dieser Reihenfolge gemischt. Die fertige Lösung wird sofort auf das auspolymerisierte Trenngel gegossen und der Kamm für die entsprechenden Geltaschen eingefügt.

Die mit 15 µl 4x Laemmli-Probenpuffer versetzten Membranfraktionen (s. 3.2.15.2.1 und 3.2.15.2.2) werden 5 min bei 95 °C gekocht, kurz abzentrifugiert und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgt in Laufpuffer mit 20 mA/Gel (nicht über 100 V) für 1½ Stunden (oder bis die blaue Front ausgelaufen ist). In dieser Arbeit wurde als Molekulargewichtsstandard für die SDS-PAGE der „High Molecular Weight“-Größenstandard (10 kDa Protein Ladder) der Firma Gibco verwendet.

### **3.2.16.2 Proteintransfer auf die Nitrozellulose**

Der elektrophoretische Transfer der Proteine auf Nitrozellulose erfolgt zwischen zwei Elektroden in einer mit Puffer gefüllten Blotkammer (Tankblotten). Das Blotten erfolgt mit einem kontinuierlichen Puffersystem bei 4 °C.

## Reagenzien

Blotpuffer	Tris	2,4 g
	Glyzin	11,26 g
	Methanol	200 ml
	SDS-Lösung	750 $\mu$ l
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l $\rightarrow$ pH 8,3

## Durchführung

Es werden zwei auf Gelgröße (5,5 x 9,5 cm) zugeschnittene Whatman-Filterpapiere, ein entsprechend zugeschnittenes Stück Nitrozellulose, zwei Schwämme, eine Blotgitter und eine Blotkammer benötigt. Kurz vor dem Blotten werden die Filter und die Nitrozellulose im Blotpuffer äquilibriert.

Der Aufbau des Blotsandwich erfolgt von der Anoden- zur Kathodenseite des Blotgitters wie folgt:

Anodenseite (weiß)
Schaumstoff
Filterpapier
Nitrozellulose
Gel
Filterpapier
Schaumstoff
Kathodenseite (schwarz)

Damit das Transferpaket beim Blotten luftblasenfrei ist, wird das Paket im Blotpuffer gepackt und mögliche Luftblasen mit einem Glasstab entfernt, den man über den Stapel rollt. Der Transfer erfolgt mit 1,7 mA/cm<sup>2</sup> für 1½ Stunden bei 4 °C.

### 3.2.16.3 Markierung des Größenstandards

#### Reagenzien

Ponceau-Rot-Färbelösung	Ponceau S	0,1% (w/v)
	Essigsäure	5% (v/v)
TBS	Tris	6,05 g
	NaCl	8,76 g
	NaN <sub>3</sub>	0,1 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l → pH 7,2

#### Durchführung

Nach dem Blotten wird die Nitrozellulose zunächst in Ponceau-Rot-Färbelösung geschüttelt, um die Proteinbanden und den Marker sichtbar zu machen. Die Markerproteine werden auf der Nitrozellulose mit einem weichen Bleistift (HB oder B) gekennzeichnet. Danach wird die Nitrozellulose in TBS entfärbt.

### 3.2.16.4 Antigen/Antikörperreaktionen

In dieser Arbeit wurden GFP-Fusionsproteine mit anti-GFP-Primärantikörpern detektiert. Für die Immunoblots wurden verschiedene Sekundärantikörper verwendet (Tabelle siehe unten). Die entfärbte Nitrozellulose wurde zunächst mit dem jeweiligen Blockreagenz auf einem Schüttler bei RT inkubiert, um freie Proteinbindungsstellen abzusättigen. Nach der Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper und einem Waschschrift, erfolgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Auf weitere Waschschrift folgt die spezifische Färbereaktion für die Sekundärantikörper oder die Autoradiographie. Die folgenden Tabellen enthalten die Kurzbeschreibungen der Methoden für die einzelnen Sekundärantikörper.

## Immunoblot mit Alkalische-Phosphatase-konjugiertem IgG

### Reagenzien

Blotto Ø	Tris-HCl (pH 7,5)	20 mM
	NaCl	0,15 mM
	Triton X-100®	1% (w/v)
Blotto	Milchpulver	5% (w/v)
	Blotto Ø	ad. 1 l
Tris-Lösung	Tris-HCl (pH 9,5)	10 mM
Färbelösung (20x	NBT	9,16 mg/ml
Stammlösung)	BCIP	4,16 mg/ml

### Durchführung

Blocken		1 Stunde in Blotto
1. AK	monoklonale anti-GFP Antikörper, 1:1000	1 Stunde in Blotto (oder über Nacht bei 4 °C)
	polyklonales anti-GFP-Antiserum, 1:15000	
Waschen		4x 15 min mit Blotto
2. AK	alkalische Phosphatase-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG (bei polyklonalem 1. AK), 1:5000	1 Stunde in Blotto
	oder alkalische Phosphatase-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG (bei monoklonalem 1. AK), 1:5000	
Waschen		4x 10 min mit Blotto
		2x 10 min mit Blotto Ø
		1x 5 min mit Tris-Lösung

Färben	Je 500 µl NBT/BCIP aus der 20x Stammlösung Mit 9 ml Tris-Lösung Verdünnen und Inkubation bis immunreaktive Banden sichtbar werden; Abbruch der Reaktion durch Spülen mit H <sub>2</sub> O.
--------	--

### Immunoblot mit [<sup>125</sup>I]-markiertem IgG

#### Reagenzien

10x TNA	Tris-HCl	24,2 g
	NaCl	180 g
	NaN <sub>3</sub>	2 g
	H <sub>2</sub> O	ad 2 l → pH 7,2
Blockpuffer	TNA	1x
	Casein	1% (w/v)
	Gelatine	1% (w/v)
TNA + NP40	TNA	1x
	NP40	0,05% (w/v)

#### Durchführung

Blocken		2 Stunden in Blockpuffer
1. AK	polyklonales Kaninchen-anti-GFP-Antiserum, 1:15000	2 Stunden in Blockpuffer oder über Nacht bei 4 °C
Waschen		5x 10 min mit 1x TNA und 1x 10 min mit TNA+NP40
2. AK	[ <sup>125</sup> I]-markiertes Esel-anti-Kaninchen IgG (2 µCi pro Schale)	2 Stunden in Blockpuffer
Waschen		2x 5 min mit TNA 1x 10 min mit TNA+NP40

Exponieren	Nach dem Trocknen der Nitrozellulose wird ein X-OMAT-Röntgenfilm (Kodak) aufgelegt. Die Exposition erfolgt je nach Signalstärke zwischen 1-5 Tagen.
------------	---

### 3.2.17 Bindungsexperimente mit [<sup>3</sup>H]AVP

#### 3.2.17.1 [<sup>3</sup>H]AVP-Bindung an intakten Zellen

Bei dieser Methode wird mit Hilfe von AVP und [<sup>3</sup>H]AVP, Anzahl ( $B_{MAX}$ ) und Affinität ( $K_D$ ) der sich an der Zelloberfläche befindenden V2-Rezeptoren gemessen. Die Experimente werden an intakten, transient transfizierten COS.M6-Zellen durchgeführt. Die Zellen werden auf 24-Well-Platten ausgesät und mit Lipofectin™ transfiziert (s. 3.2.13). 48 Stunden nach der Transfektion werden die Zellen für den Versuch verwendet.

Folgende Reagenzien werden benötigt:

Waschpuffer (DPBS)	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,133 g/l
	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,1 g/l
	KCl	0,2 g/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g/l
	NaCl	8 g/l
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15 g/l
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l → pH 7,4
Bindungspuffer	10 nM [ <sup>3</sup> H]AVP in DPBS	
Verdrängungspuffer	Bindungspuffer + 1 μM AVP in DPBS	
Lysis-Puffer	NaOH	1 N
Aquasafe 300 Plus	Szintillator	

### **3.2.17.1.1 Bindungsversuch nahe dem Sättigungsbereich**

Hier wird nur eine AVP Konzentration (10 nM) nahe dem Sättigungsbereich der V2-Rezeptor-Sättigungskurve verwendet, um eine vorläufige Angabe der Bindungskapazität der Mutanten zu erhalten.

Die spezifische Bindung wird über die gemessene totale- und nicht spezifische Bindung berechnet. Jede Mutante sowie die Positiv- und Negativkontrolle werden im dreifach Ansatz gemessen.

Die 24-Well-Platte wird während des ganzen Versuches auf ein mit Eis unterfüttertes Tablett gestellt. Zuerst wird das Medium abgesaugt und jedes Well 1x mit eiskaltem Waschpuffer gewaschen (2 ml pro Well). Zur Bestimmung der totalen Bindung werden 450 µl Bindungspuffer mit 10 nM [<sup>3</sup>H]AVP in jedes Well pipettiert (3 Wells pro Mutante). Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung werden 450 µl Verdrängungspuffer in jedes Well gegeben (3 Wells pro Mutante). Es folgt eine Inkubation bei 4 °C für 2 Stunden. Anschließend werden die Wells 3x schnell mit Waschpuffer gewaschen (je 2 ml). Die Zellen werden dann mit 500 µl Lysis-Puffer (60 °C) lysiert und 30 min bei RT inkubiert. Das Lysat wird in ein 5 ml Szintillationsgefäß überführt und mit 4 ml Aquasafe 300 Plus vermischt. Die Proben werden mit Hilfe eines β-Counters ausgewertet.

Um die spezifische Bindung zu berechnen, wird die unspezifische von der totalen Bindung abgezogen. Ferner werden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

### **3.2.17.1.2 Sättigungskurve**

Die Erstellung einer Sättigungskurve ermöglicht es, die  $K_D$  und die  $B_{MAX}$  eines Liganden (AVP) für einen Rezeptor (hier V2-Rezeptor) zu untersuchen. Zur Erstellung einer Sättigungskurve wird der Konzentrationsbereich des

Bindungsversuchs zwischen 0,1 und 50 nM AVP, mit immer verdoppelten [<sup>3</sup>H]AVP-Konzentrationen abgedeckt, d.h. für jede Mutante, Positivkontrolle und Negativkontrolle werden 10 einzelne Bindungsversuche mit verschiedenen [<sup>3</sup>H]AVP-Konzentrationen durchgeführt (s. 3.2.17).

Zusätzlich müssen noch vier Wells mit gleicher Zelldichte ausgesät werden, mit denen die Zellzahl (zwei Wells) und der Proteingehalt (zwei Wells) bestimmt wird, um später die Anzahl der Bindungsstellen pro Zelle berechnen zu können. Außerdem, werden aus jedem Bindungspufferansatz 450 µl entnommen, mit 4 ml Szintillator gemischt und im β-Counter gemessen, um die eingesetzte Aktivität zu bestimmen.

#### **3.2.17.1.2.1 Berechnung der $K_D$ und $B_{MAX}$**

Die gemessenen Zerfälle pro Minute (dpm) bei den Ansätzen zur Bestimmung der totalen und unspezifischen Bindung sowie bei denen im Bindungspuffer (mit 0,5-50 nM [<sup>3</sup>H]AVP) werden in das RADLIG Programm eingegeben. Die  $K_D$ - und  $B_{MAX}$ -Werte werden durch eine iterative, nicht lineare Regression berechnet.

#### **3.2.17.1.2.2 Zellzählung**

Die Zellen aus 2 Wells werden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt (s. 3.2.13; das PBS-Volumen beträgt hier nur 1 ml und das der STV-Lösung nur 500 µl pro Well).

#### **3.2.17.1.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung**

Die Zellen aus 2 Wells werden mit je 500 µl NaOH (60 °C) lysiert. Es werden je 5 µl entnommen und die Proteinkonzentrationen wie unter 3.2.14 bestimmt.

#### 3.2.17.1.2.4 Berechnung der Anzahl der Bindungsstellen pro Zelle

Anhand der Werte von  $B_{MAX}$  (Mol/l), Zellzahl pro Well (n), Inkubationsvolumen in ml (V) und Proteinkonzentration in mg/l (P) wird die Anzahl der Bindungsstellen pro Zelle (N) und pro mg Protein ( $N_p$ ) (fmol/mg Prot.) berechnet.

$$N = \frac{B_{MAX} \times n}{(1000 / V) \times 6,23E+23} \qquad N_p = \frac{B_{MAX}}{P \times 1E+15}$$

#### 3.2.17.2 [<sup>3</sup>H]AVP-Bindung an Gesamtmembranen

Bei diesem Versuch werden die Zellen vor dem Bindungsversuch aufgeschlossen, wodurch die AVP-Bindung an intrazellulären Rezeptoren untersucht werden kann. In dieser Arbeit wurde nur die [<sup>3</sup>H]AVP-Bindung im Sättigungsbereich (50 nM [<sup>3</sup>H]AVP) bestimmt.

## Reagenzien

PBS	(s. 3.2.13)	
1 N HCl-Lösung	HCl	1 N
Tris-ME <sup>5</sup>	Tris HCl	50 mM
	EGTA	2 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM → pH 7,2
Bacitracin-Stocklösung	Bacitracin	2,13 g
	H <sub>2</sub> O	ad 10 ml
		(Thermische Behandlung: 1 Stunde bei 70 °C)
Aprotinin-Stocklösung	Aprotinin	0,15 g
	H <sub>2</sub> O	ad 10 ml
Tris-BAME Puffer	Tris-ME	500 ml
	Bacitracin-Stocklösung	500 µl
	Aprotinin-Stocklösung	500 µl
[ <sup>3</sup> H]AVP-Lösung	[ <sup>3</sup> H]AVP	10 nM
	Tris-BAME (pH 7,4)	
AVP-Lösung	AVP	0,4 mM
	Tris-BAME (pH 7,4)	
Polyethylenimin-Puffer	Polyethylenimin	0,1% (w/v)
Aquasafe 300 Plus		

<sup>5</sup> Bei der Herstellung des Tris-ME Puffers muss zuerst Tris (6,057 g) und EGTA (0,761 g) in etwa 800 ml H<sub>2</sub>O gelöst werden. Der pH wird dann mit 1 N HCl-Lsg. auf 7,5 eingestellt. Anschließend wird MgCl<sub>2</sub> (2,033 g) hinzugefügt und der pH mit der 1 N HCl-Lsg. auf 7,2 eingestellt. Zuletzt, wird die Lsg. mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt.

## Durchführung

Eine mit transient transfizierten COS.M6-Zellen konfluent bewachsene 60er Schale (s. 3.2.13) wird 2x mit je 2 ml eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen werden in 1 ml PBS mit einem Schaber vom Boden abgelöst. Die Zellsuspension wird abzentrifugiert (400 g, 5 min, 4 °C), das Pellet in 1 ml Tris-BAME aufgenommen und im Dounce Homogenisator mit 10 Impulsen bei 800 rpm lysiert. Anschließend wird die Suspension bei 26000 g für 35 min bei 4 °C abzentrifugiert und das Pellet in 500 µl Tris-BAME resuspendiert. Danach werden 10 µl der Membransuspension für die Proteinkonzentrationsbestimmung entnommen.

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (s. 3.2.14) wird die Membransuspension auf 0,5 µg Protein/µl mit Tris-BAME verdünnt (Membran-Stocklösung). Für die totale Bindung werden im vierfachen Ansatz 100 µl Membran-Stocklösung mit 50 µl [<sup>3</sup>H]AVP-Lösung und 50 µl Tris-BAME gemischt. Für die nicht spezifische Bindung werden ebenfalls vier Ansätze hergestellt, nur dass hier die 50 µl Tris-BAME-Lösung durch 50 µl AVP-Lösung ersetzt werden. Alle Ansätze werden 2 Stunden bei 25 °C im Schüttelwasserbad inkubiert.

Im Anschluss daran werden die Proben durch ein in Polyethylenimin-Puffer präinkubiertes Wathman Filterpapier in einer Harvester-Anlage gesaugt. Die Membranen binden dabei an die Filter. Die Filter werden 2x mit PBS gewaschen, ausgeschnitten und in einem 5 ml Szintillationsgefäß mit 4 ml Aquasafe 300 Plus versetzt. Die Proben werden im β-Counter gemessen und mit Hilfe des GraphPad Prism<sup>®</sup> Programms (Version 3.00) ausgewertet. Die spezifische Bindung ergibt sich aus der Differenz von totaler und nichtspezifischer Bindung.

### 3.2.18 Adenylylzyklase-Versuch

#### Reagenzien

Homogenisierungspuffer (HP)	Saccharose	27% (w/v)
	EDTA	1 mM
	HEPES	20 mM
	H <sub>2</sub> O	ad 500 ml (pH →7,8)
Rehomogenisierungspuffer (RP)/2% BSA	EDTA	1 mM
	HEPES	20 mM
	BSA	2% (w/v)
	H <sub>2</sub> O	ad 500 ml (pH → 7,8)
AVP Verdünnungsreihe	AVP	0-10000 nM
	RP/2% BSA	ad 120 µl
Forskolin-Lösung	Forskolin	1 mM
	RP/2% BSA	ad 60 µl
PGE1-Lösung	PGE1	1 mM
	RP/2% BSA	ad 60 µl
PBS	(s. 3.2.13)	

ReaMix	Tris-HCl	166,66 mM
	MgCl <sub>2</sub>	13,33 mM
	EDTA	6,66 mM
	IBMX	3,33 mM
	cAMP	3,33 mM
	ATP	0,33 mM
	GTP	0,03 mM
	DTT	3,33 mM
	Creatine Phosphokinase	51 mg
	Phosphocreatin	13,2 mg
	BSA	60 mg
	[ $\alpha$ <sup>32</sup> P]ATP	0,75 $\mu$ Ci pro Säule
	H <sub>2</sub> O	ad 3 ml
	Stopp-Lösung	ATP
cAMP		1,4 mM
SDS		2% (w/v)
[ <sup>3</sup> H]cAMP		0,0125 $\mu$ Ci pro Säule
H <sub>2</sub> O		ad 250 ml
Imidazol Puffer	Imidazol	0,1 M
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l (pH $\rightarrow$ 7,4)

### Durchführung

Eine mit transient transfizierten HEK293-Zellen konfluent bewachsene 60er Schale (s. 3.2.13) wird 2x mit je 3 ml eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen werden mit einem Schaber vom Boden abgelöst und in 1 ml PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wird abzentrifugiert (400 g, 5 min, 4 °C), das Pellet in 1 ml HP aufgenommen und im Dounce Homogenisator mit 10 Impulsen bei 750 rpm lysiert. Anschließend wird das Homogenat bei 20000 g bei 4 °C für 10 min abzentrifugiert und das Pellet in 500  $\mu$ l RP (ohne BSA) resuspendiert. 10  $\mu$ l der Membransuspension werden für die Proteinkonzentrationsbestimmung (s. 3.2.14) entnommen, der Rest wird frisch eingesetzt oder bei -80 °C bis zum Versuch gelagert.

Die frischen oder aufgetauten Membranen werden zu einer Konzentration von 40 µg/20 µl mit RP/2% BSA verdünnt und bei 4 °C gelagert. 10 µl der AVP Verdünnungsreihe (0,3; 1; 3; 10; 30; 100; 1000; 1000; 100000 nM) werden in 5 ml Plastikröhrchen bei 4 °C vorgelegt. Als Negativkontrolle dienen 10 µl RP/2% BSA, als Positivkontrollen 10 µl Forskolin-Lösung und 10 µl PGE1-Lösung. Einzelne Messpunkte werden jeweils als Triplikat angesetzt. Die Röhrchen werden in einem Wasserbad auf 32 °C erwärmt. In jedes Röhrchen werden 70 µl ReaMix pipettiert und dann im 15 Sekunden Abstand jeweils 20 µl Membransuspension. Die Reaktion wird nach 20 min mit 500 µl Stopp-Lösung abgebrochen zugegeben.

Das fertige Reaktionsgemisch (600 µl) wird auf Dowex-Säulen pipettiert. Die Röhrchen werden mit 1000 und danach mit 1800 µl H<sub>2</sub>O gespült. Beide Spülungen werden ebenfalls auf die Dowex-Säulen gegeben. Wenn die Flüssigkeit ausgetropft ist, werden die Dowex-Säulen auf Alox-Säulen umgesetzt und mit 5 ml H<sub>2</sub>O gespült. Nachdem die Flüssigkeit durch die Alox-Säulen getropft ist, werden 2 ml Imidazol-Puffer pro Säule zugegeben. Wenn keine Flüssigkeit mehr aus den Säulen tropft, werden die Säulen auf 20 ml Szintillationsgefäße gestellt und mit 3 ml Imidazol-Puffer eluiert. Das Eluat wird anschließend mit 13 ml Szintillator verdünnt. Die Messung erfolgt im β-Counter. Die [<sup>3</sup>H]- und [<sup>32</sup>P]-Aktivitäten werden mit Hilfe des Microsoft Excel Programms ausgewertet. Das gebildete cAMP in (pmol) × (mg Protein)<sup>-1</sup> × (min)<sup>-1</sup> wird mit folgender Formel berechnet:

$$[\text{cAMP}] = \frac{[^{32}\text{P}] \times \text{EST} \times 10000}{[^3\text{H}] \times \text{ESP} \times \text{Prot} \times 20 \text{ min}}$$

Dabei ist [<sup>32</sup>P] die gemessene [<sup>32</sup>P]-Aktivität in cpm, EST der Tritium-Einsatz pro Säule in cpm, [<sup>3</sup>H] die gemessene [<sup>3</sup>H]-Aktivität in cpm, ESP der [<sup>32</sup>P]-Einsatz pro Säule in cpm und Prot die eingesetzte Proteinmenge pro Säule in mg.

Anschließend werden die Daten mit Hilfe des GraphPad Prism<sup>®</sup> Programms (Version 3.00) analysiert und der EC<sub>50</sub> Wert über eine nicht lineare Regression ermittelt. Die Daten werden in einer Verlaufskurve dargestellt.

### 3.2.19 Immunfluoreszenzstudien

#### Reagenzien

PBS	(s. 3.2.13)	
IF-Fixierpuffer	PFA	2,5% (w/v)
	HEPES	100 mM
	Saccharose	100 mM
Permeabilisierungs-Puffer	Triton X-100®	0,1% (v/v)
	PBS	
Monoklonale Maus-anti- <i>c-myc</i> -Antikörper	1:100 in PBS	
Polyklonales Cy <sup>TM</sup> 3-konjugiertes-Ziege-anti-Maus IgG	1:400 in PBS	
Mountingmedium	PBS	1 Volumen
	Glyzerin	1 Volumen
	DABCO	100 mg/ml
Nagellack		

#### Durchführung

Für den Versuch werden mit Lipofectamin<sup>TM</sup> transient transfizierte COS.M6-Zellen auf einem Deckglas (Ø 33 mm) 1-2 Tage nach der Transfektion verwendet. Das Deckglas mit den Zellen wird 1x mit PBS gewaschen, 30 min in IF-Fixierpuffer inkubiert und anschließend erneut 2x mit PBS gewaschen.

Wenn gewünscht, können die Zellen jetzt mit Permeabilisierungs-Puffer behandelt werden (3 min, RT). Danach muß 2x mit PBS gewaschen werden.

Die Deckgläser mit den Zellen (permeabilisiert oder nicht permeabilisiert) werden 1½ Stunden bei 37 °C mit dem monoklonalen Maus-anti-*c-myc*-Antikörper (1:100 in

PBS) in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wird das Deckglas 3x 10 min mit jeweils frischem PBS gewaschen. Die Deckgläser werden dann in einer feuchten Kammer bei 37 °C für 1 Stunde mit Cy<sup>TM</sup>3-konjugiertem-Ziege-anti-Maus IgG (1:400 in PBS) inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS gibt man etwa 10 µl Mountingmedium auf einen Objektträger und legt das Deckglas mit den Zellen nach unten auf. Nach dem Trocknen wird der Rand mit Nagellack abgedichtet. Das Präparat kann nach 2 Stunden am LSM untersucht werden. Hierbei wird eine Anregungswellenlänge ( $\lambda_{exc}$ ) von 525 nm und eine Emissionswellenlänge ( $\lambda_{em}$ ) von 568 nm verwendet.

### **3.2.20 Mikroskopie an lebenden Zellen**

Für diese Studien werden transient transfizierte COS.M6- und HEK293-Zellen verwendet, die GFP-Fusionsproteine exprimieren.

Die Zellen werden auf Deckgläser (Ø 33 mm) ausgesät (s. 3.2.13.1) und transient mit Lipofectamin<sup>TM</sup> oder SuperFect<sup>TM</sup> transfiziert (s. 3.2.13.2 oder 3.2.13.3). Je nach Zelldichte werden die Zellen nach 1 oder 2 Tagen für den Versuch verwendet.

Das Deckglas wird 2x mit PBS gewaschen, in eine Kammer eingespannt und mit 1 ml PBS bedeckt. Die GFP-Fluoreszenzen werden dann bei einer  $\lambda_{exc}$ = 488 nm und  $\lambda_{em}$ ≥ 515 nm mit dem LSM untersucht. Es werden sowohl x/y-Scans als auch z-Scans aufgenommen.

### **Trypanblau Färbung**

Mit Trypanblau kann man an intakten Zellen die Plasmamembran färben.

### **Durchführung**

Nach Aufnahme der GFP-Fluoreszenzen werden unter dem Mikroskop 50  $\mu$ l Trypanblau (0,05% (w/v)) zu den Zellen pipettiert. Die Trypanblaufluoreszenz wird nach einer 1 min Inkubation ( $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 690 \text{ nm}$ ) aufgenommen.

### **Rhodamin 6G Färbung (TERASAKI UND REES, 1992)**

Mit Rhodamin 6G kann man an lebenden Zellen das ER färben.

### **Durchführung**

Nach Aufnahme der GFP-Fluoreszenz werden unter dem Mikroskop 50  $\mu$ l Rhodamin 6G (5  $\mu$ M) zu den Zellen pipettiert. Die Rhodamin 6G-Fluoreszenz wird nach 20 min Inkubation ( $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 570 \text{ nm}$ ) aufgenommen.

### **3.2.21 Erstellung eines V2-Rezeptor-Strukturmodells**

Die Berechnung eines V2-Rezeptor-Strukturmodells, mit besonderer Berücksichtigung des intrazellulären C-Terminus, erfolgte in Zusammenarbeit mit G. Krause (FMP, Berlin). Die Strukturberechnung der transmembranären Regionen und der intra- und extrazellulären Schleifen wurde analog zu der Methode von BIEBERMANN et al. (1998) durchgeführt. Die räumliche Anordnung der transmembranären Helizes basiert auf den Elektronendichtekarten des Frosch-Rhodopsins (UNGER et al., 1997). Die Startkonformationen der IZS 1, 2, 3 und des ersten Teils des intrazellulären C-Terminus basierten auf der NMR-Struktur der cytosolischen Bereiche des Rhodopsins (YEAGLE et al., 1997). Zur Unterstützung des Strukturmodells wurden zusätzlich in der Brookhaven 3D-Proteindatenbank (PDB 3D-Datenbank; Brookhaven National Laboratory, Brookhaven, USA) Peptide gesucht,

deren Sequenz mit Teilsequenzen der IZS4 übereinstimmte. Die bekannte Konformation dieser Peptide wurde für die Berechnung des Modells berücksichtigt. Es wurden nur Fragmente verwendet, die mehr als einmal mit der gleichen Struktur in der Datenbank vorkamen. Die Modellkomponenten (TMD, intra- und extrazelluläre Schleifen) wurden mit dem Biopolymer und mit den Schleifen-Such-Modulen des Sybyl Programmpaket (TRIPOS Inc. St. Louis, MO, USA) zusammengefügt und über ein AMBER 4.1 Kraftfeld energetisch minimiert. Mit Moleküldynamiksimulationen wurde überprüft, ob die Stabilität der Helizes bei 300 K für 200 ps unter AMBER Version 4.1. und 4.5 Kraftfeldverhältnissen im Vakuum erhalten blieb.

### **3.2.22 Statistische Auswertungen**

Die Datenauswertung dieser Arbeit erfolgte unter Verwendung des PC-Programms GraphPad Prism<sup>®</sup> (Version 3.00).

Zur Beschreibung der Daten wurden arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und in Form von Balkendiagrammen und Verlaufskurven dargestellt. Hierfür wurde ebenfalls das PC-Programm GraphPad Prism<sup>®</sup> (Version 3.00) verwendet.

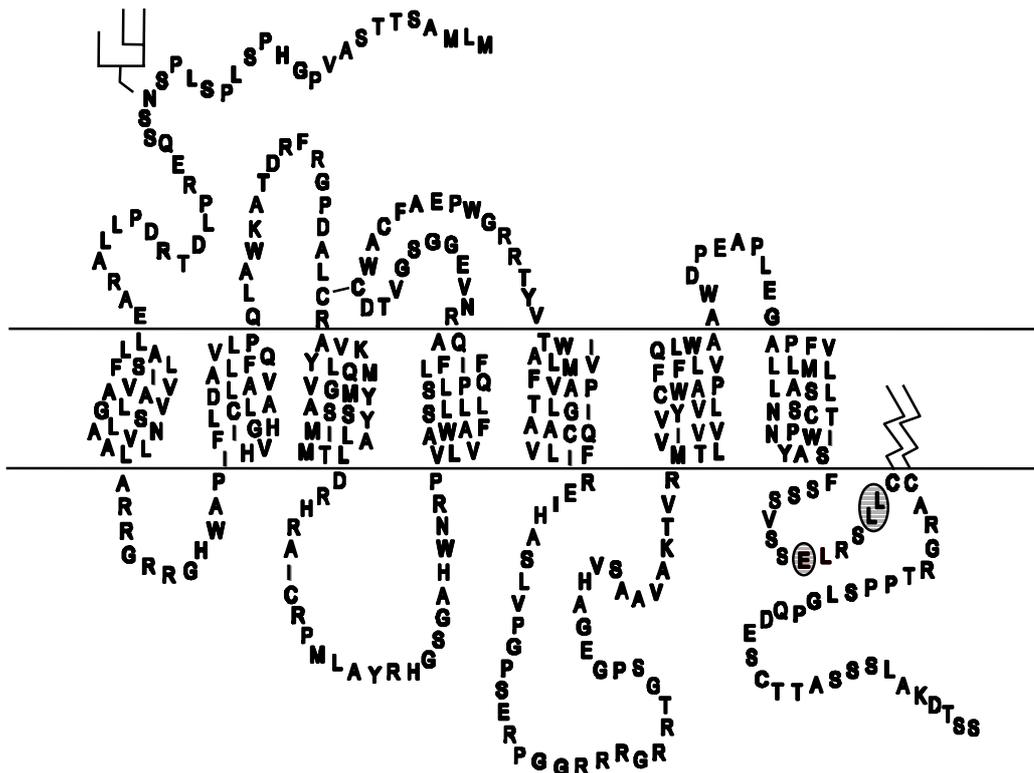
Um zu überprüfen, ob zwischen den  $K_D$ ,  $B_{MAX}$  und  $EC_{50}$ -Werten des GFP-markierten und des unmarkierten V2-Rezeptors Unterschiede bestehen, wurden die pharmakologischen Parameter mit einem t-Test verglichen. Unterschiede wurden als signifikant bewertet, wenn  $p < 0,05$  war.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Das Glutamat/Dileucinmotiv: Ein mögliches Transportsignal im intrazellulären C-Terminus des V2-Rezeptors

Aus vergangenen Studien war bekannt, dass der Bereich zwischen Aminosäure R337 und C341 im intrazellulären C-Terminus des V2-Rezeptors für den Transport des Rezeptors zur Plasmamembran wichtig ist (OKSCHE et al., 1998; SCHÜLEIN et al., 1996a). Innerhalb dieses Bereiches befinden sich zwei Leucinreste. Ähnliche Dileucinmotive wurden bei anderen Membranproteinen als Sortierungssignale für basolateralen Transport (HUNZIKER UND FUMEY, 1994; SHEIKH UND ISACKE, 1996), lysosomale Sortierung (JOHNSON UND KORNFELD, 1992; LETOURNEUR UND KLAUSNER, 1992) oder Endocytose (LETOURNEUR UND KLAUSNER, 1992) beschrieben. Die Motive befinden sich in diesen Fällen in einer cytoplasmatischen Domäne, sind etwa 12-15 Aminosäuren von der Plasmamembran entfernt und können auch von einem oder mehreren sauren Aminosäureresten begleitet werden (POND et al., 1995).

Diese bereits beschriebenen Eigenschaften trafen auch auf das Dileucinmotiv des V2-Rezeptors zu. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Glutamat/Dileucinmotiv (<sup>335</sup>EXXXLL<sup>340</sup>, s. Abb. 2) des V2-Rezeptors wichtig für den Transport des Rezeptors zur Plasmamembran ist. Für die Untersuchung der Funktion dieses Motivs wurde mit Hilfe von gerichteten Mutagenesen, eine ganze Reihe von Aminosäureaustauschen und eine Deletion eingeführt (s. Abb. 3).



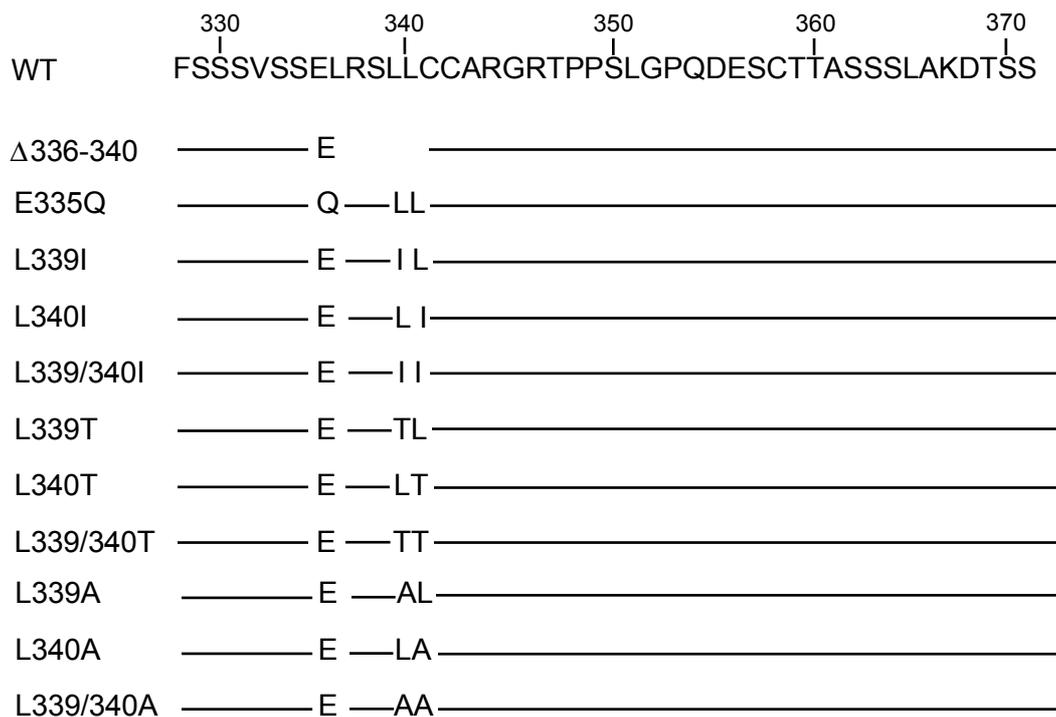
**Abb. 2:** Zweidimensionales Topologiemodell des humanen V2-Rezeptor. Das Glutamat/Dileucinmotiv im intrazellulären C-Terminus ist hervorgehoben.

#### 4.1.1 Gerichtete Mutagenese des Glutamat/Dileucinmotivs

Für die gerichteten Mutagenesen wurde experimentell wie folgt vorgegangen: Die wildtypische V2-Rezeptor cDNA wurde aus dem Plasmid pRCDN2 (SCHÜLEIN et al., 1996a) in den Vektor M13mp19 als *Bam*HI/*Xba*I-Fragment kloniert (s. 3.2.3, 3.2.4, 3.2.5, 3.2.7; nicht gezeigt). Die eigentlichen Mutagenesen wurden mit dem Sculpture *In Vitro* Mutagenesis System durchgeführt (s. 3.2.10). Die hierfür benutzten Oligonukleotide waren PΔ336-340, PE335Q, PL339I, PL340I, PL339/340I, PL339T, PL340T und PL339/340T (s. 3.1.4.3). Die Mutationen wurden durch Sequenzierung der cDNA bestätigt (s. 3.2.12). Die *Bam*HI/*Xba*I-Fragmente wurden dann in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA1.Neo (Invitrogen®) kloniert (s. 3.2.3, 3.2.4, 3.2.5, 3.2.7). Es entstanden folgende rekombinante Plasmide: pRCDN2.Δ336-340, pRCDN2.E335Q, pRCDN2.L339I, pRCDN2.L340I, pRCDN2.L339/340I,

pRCDN2.L339T, pRCDN2.L340T und pRCDN2.L339/340T. Alle Umklonierungen wurden durch Sequenzierung der cDNA verifiziert (s. 3.2.12). Die Alaninaustausche wurden direkt mit Hilfe des QuikChange™ Mutagenesis System (s. 3.2.11) in die Plasmide pRCDN2.L339T, pRCDN2.L340T und pRCDN2.L339/340T eingeführt (Oligonukleotidpaare PT339A 5', PT339A 3', PT340A 5', PT340A 3', PT339/340A 5' und PT339/340A 3' (s. 3.1.4.3)). Die resultierenden Plasmide waren pRCDN2.L339A, pRCDN2.L340A und pRCDN2.L339/340A. Alle Mutationen wurden auch hier durch Sequenzierung der cDNA bestätigt (s. 3.2.12).

Eine Zusammenfassung der Konstrukte zeigt Abb. 3. Bei der Mutante  $\Delta$ 336-340 wurden beide Leucinreste und drei davor liegende Aminosäuren eliminiert. Bei der Mutante E335Q wurde der saure Glutaminsäurerest durch einen polaren Glutaminrest ersetzt. Um zu klären, ob die Hydrophobizität oder die Leucinreste selbst wichtig sein könnten, wurden beide durch ebenfalls hydrophobe Isoleucinreste (Einzelaustausche: L339I, L340I; Doppelaustausch: L339/340I), durch polare Threoninreste (Einzelaustausche: L339T, L340T; Doppelaustausch: L339/340T) oder durch Alaninreste (Einzelaustausche: L339A, L340A; Doppelaustausch: L339/340A) (s. Abb. 3) ersetzt.



**Abb. 3: Gerichtete Mutagenese des Glutamat/Dileucinmotivs des V2-Rezeptors.**

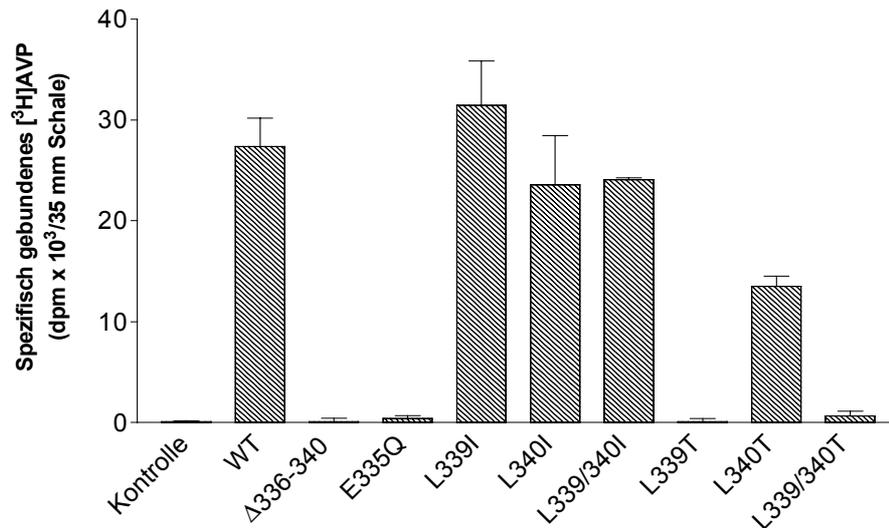
Oben: Aminosäuresequenz des intrazellulären C-Terminus des wildtypischen V2-Rezeptors von Aminosäure F328 bis S371. Unten: Eingefügte Mutationen und deren Bezeichnung.

## 4.2 Das Glutamat/Dileucinmotiv ist für den Transport des V2-Rezeptors zur Plasmamembran notwendig

### 4.2.1 [<sup>3</sup>H]AVP-Bindungsstudien an intakten COS.M6-Zellen

Um die Relevanz der Reste E335, L339 und L340 für den Rezeptortransport zu untersuchen, wurden COS.M6-Zellen in 35 mm Schalen transient mit den Plasmiden pRCDN2. $\Delta$ 336-340, pRCDN2.E335Q, pRCDN2.L339I, pRCDN2.L340I, pRCDN2.L339/340I, pRCDN2.L339T, pRCDN2.L340T und pRCDN2.L339/340T transfiziert (s. 3.2.13). Anschließend wurden Bindungsexperimente mit [<sup>3</sup>H]AVP an intakten COS.M6-Zellen durchgeführt (s. 3.2.17.1.1) (s. Abb. 4). Es wurde vorausgesetzt, dass Mutationen am cytoplasmatischen C-Terminus des Rezeptors die Agonistenbindungsstelle nicht beeinflussen, und dass die [<sup>3</sup>H]AVP-Bindung an

intakten Zellen mit dem Rezeptortransport zur Plasmamembran korreliert. Die Entfernung von L339 und L340 (Mutante  $\Delta$ 336-340) führte zum Verlust der [ $^3$ H]AVP-Bindung, was auf einen Transportdefekt des Rezeptors hinweist. Das gleiche Ergebnis wurde erhalten, wenn L339 und L339/L340 durch polare Threoninreste (Mutanten L339T und L339/340T) und E335 durch Glutamin (Mutante E335Q) ersetzt wurden. Dies zeigt, dass das Glutamat/Dileucinmotiv für den Transport des V2-Rezeptors zur Plasmamembran wichtig ist. L340 scheint nicht essentiell für den Transport zur Plasmamembran zu sein, spielt jedoch eine wichtige Rolle, denn die Substitution durch Threonin (Mutante L340T) reduzierte die [ $^3$ H]AVP-Bindung um 50%. Der Austausch von L339 und L340 durch ebenfalls hydrophobes Isoleucin (Mutanten L339I, L340I und L339/340I) hatte keinen Einfluß auf den Rezeptortransport. Dies zeigt, dass die Hydrophobizität beider Leucine kritisch ist und nicht die Leucinreste selbst. Für die drei Alaninaustausche L339A, L340A und L339/340A wurden in [ $^3$ H]AVP-Bindungsexperimenten die gleichen Ergebnisse erhalten wie für die entsprechenden Threoninaustausche (Daten werden nicht gezeigt) (s. Abb. 4).



**Abb. 4: Spezifische [<sup>3</sup>H]AVP-Bindung an intakten, transient transfizierten COS.M6-Zellen.** Die [<sup>3</sup>H]AVP-Konzentration (10 nM) wurde nahe der Sättigung gewählt. Die einzelnen Säulen zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3). Als Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen verwendet.

#### 4.2.2 Immunfluoreszenzstudien mit *c-myc*-markierten V2-Rezeptoren in COS.M6-Zellen

Um die Ergebnisse der Bindungsexperimente zu bestätigen und um zu zeigen, dass die transportdefekten Rezeptor-Mutanten auch tatsächlich exprimiert werden, wurden die mutierten Rezeptoren am N-Terminus mit einer *c-myc*-Markierung versehen. Mit transient transfizierten Zellen wurden dann Immunfluoreszenzstudien durchgeführt.

Die Umklonierung wurde folgendermaßen durchgeführt: Aus den mutierten Plasmiden pRCDN2.E335Q, pRCDN2.L339T, pRCDN2.L340T und pRCDN2.L339/340T wurden *PmlI/BglII*-Fragmente in das Plasmid pRCDN2.Nmyc (ANDERSEN-BECKH et al., 1999) umkloniert (s. 3.2.3, 3.2.4, 3.2.5 und 3.2.7) (s. Abb. 5). Es entstanden die rekombinanten Plasmide pRCDN2.E335Q.Nmyc, pRCDN2.L339T.Nmyc, pRCDN2.L340T.Nmyc und pRCDN2.L339/340T.Nmyc. Alle Plasmide wurden durch Sequenzierung der cDNA bestätigt (s. 3.2.12). Die resultierenden Plasmide kodierten für mutierte V2-Rezeptoren mit einer zwischen den Aminosäuren T7 und T8 eingeführten *c-myc*-Sequenz (EQKLISEEDLST).

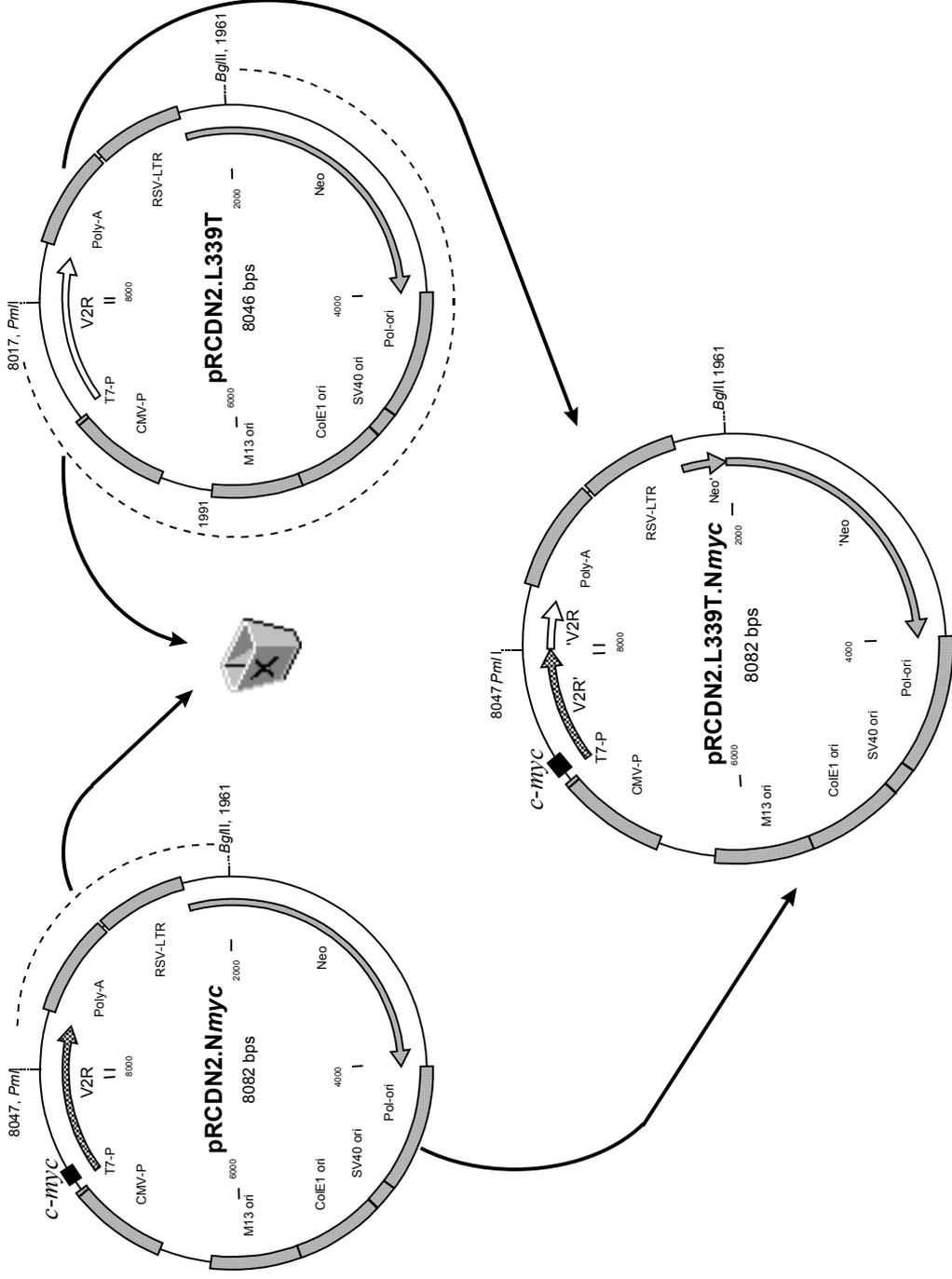
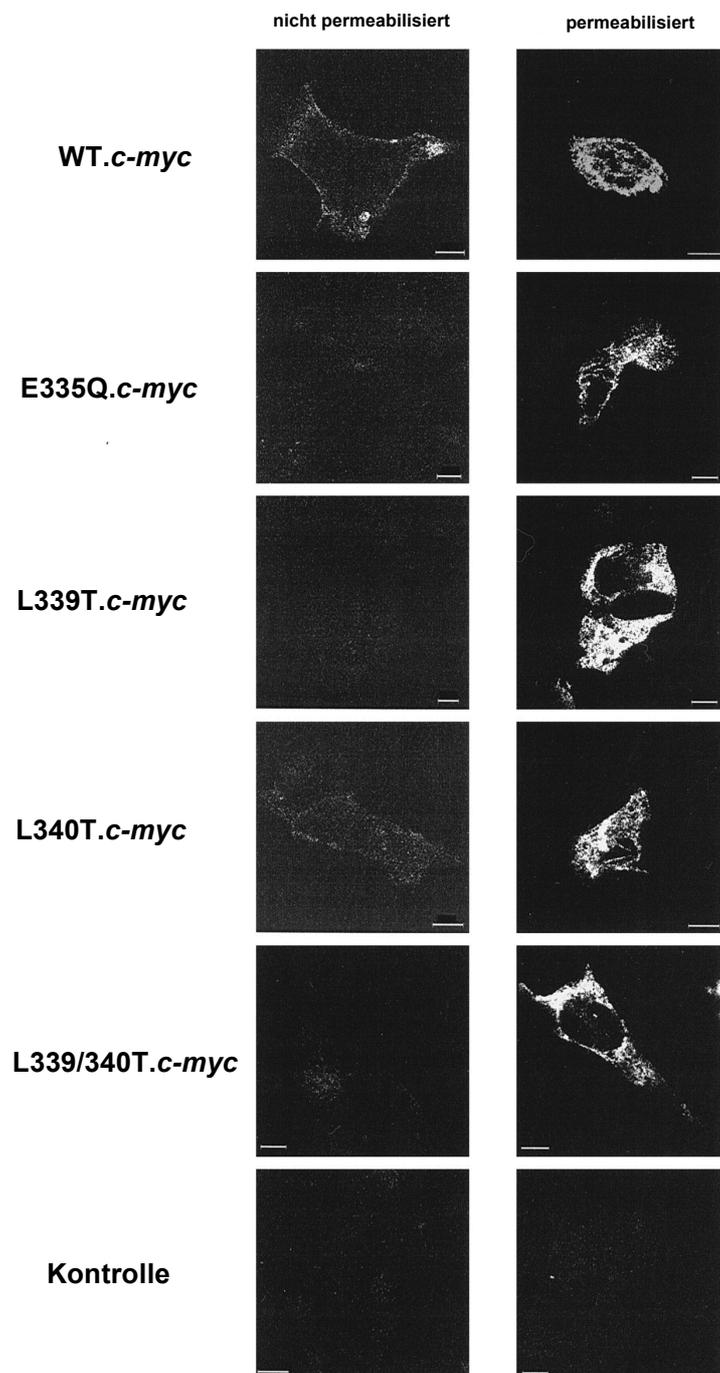


Abb. 5: Schematische Darstellung der Konstruktion einer *c-myc* markierten V2-Rezeptor-Mutante (am Beispiel der L339T-Mutante gezeigt).

Für die Immunfluoreszenzstudien wurden COS.M6-Zellen transient mit den Plasmiden pRCDN2.E335Q.Nmyc, pRCDN2.L339T.Nmyc, pRCDN2.L340T.Nmyc und pRCDN2.L339/340T.Nmyc transfiziert (s. 3.2.13). Um Rezeptoren an der Plasmamembran zu detektieren, wurde ein monoklonaler Maus-anti-*c-myc*-Antikörper an nicht permeabilisierten Zellen verwendet (s. 3.2.19). Rezeptoren im Zellinnern wurden mit dem gleichen Antikörper in permeabilisierten Zellen detektiert (s. Abb. 6).

Bei nicht permeabilisierten Zellen, die den wildtypischen *c-myc*-markierten V2-Rezeptor exprimierten, wurde ein Fluoreszenzsignal an der Plasmamembran gefunden (s. Abb. 6). Bei den dazugehörigen permeabilisierten Zellen wurden zusätzlich auch intrazelluläre Signale erhalten. Diese Befunde zeigen, dass der wildtypische V2-Rezeptor an die Plasmamembran transportiert wird. Die intrazellulären Fluoreszenzsignale vom WT-*c-myc* waren relativ stark. Es handelt sich hierbei höchstwahrscheinlich um Transportintermediate auf dem Weg zur Oberfläche und/oder um Rezeptoren, die durch Überexpression retiniert wurden. Durch die Fixierung der Zellen mit Formaldehyd aggregiert das ER, was eine zusätzliche Verstärkung der intrazellulären Fluoreszenzsignale hervorrufen könnte. Für den mutierten Rezeptor L340T-*c-myc* wurde sowohl in nicht permeabilisierten, als auch in permeabilisierten Zellen ein Fluoreszenzsignal erhalten. Das Signal an der Plasmamembran war aber deutlich schwächer als beim wildtypischen *c-myc*-markierten Rezeptor. Diese Daten stimmten mit den Ergebnissen aus den [<sup>3</sup>H]AVP-Bindungsstudien überein und deuten auf einen verminderten Transport von L340T-*c-myc* hin.

In Zellen, die die Rezeptor-Mutanten E335Q-*c-myc*, L339T-*c-myc* und L339/340T-*c-myc* exprimierten, wurden dagegen nur in den permeabilisierten Zellen Fluoreszenzsignale gefunden (s. Abb. 6). Dies zeigt, dass die mutierten Rezeptoren zwar exprimiert, aber nicht zur Zelloberfläche transportiert wurden. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzstudien stimmten auch hier mit denen der [<sup>3</sup>H]AVP-Bindungsexperimente an ganzen Zellen überein. Sie zeigen, dass E335 und L339 des Glutamat/Dileucinmotivs für den Oberflächentransport des V2-Rezeptors essentiell sind. L340 ist zwar nicht essentiell, spielt aber eine wichtige Rolle.



**Abb. 6: Immunfluoreszenzstudien an nicht permeabilisierten und permeabilisierten transient transfizierten COS.M6-Zellen.** Die Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und mit den Plasmiden pRCDN2.WT.Nmyc, pRCDN2.E335Q.Nmyc, pRCDN2.L339T.Nmyc, pRCDN2.L340T.Nmyc und pRCDN2.L339/340T.Nmyc transient transfiziert. Die Rezeptoren wurden mit monoklonalen Maus-anti-*c-myc*- und Cy<sup>TM</sup>3-konjugiertem Ziege-anti-Maus IgG detektiert. Die Fluoreszenzsignale wurden am LSM aufgenommen ( $\lambda_{\text{exc}} = 525 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 568 \text{ nm}$ ). Die Bilder zeigen x/y-Scans von nicht-permeabilisierten (links) und mit Triton X-100<sup>®</sup> permeabilisierten Zellen (rechts). Als Kontrolle wurden mit Vektor-DNA transfizierte COS.M6-Zellen verwendet. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ .

### 4.2.3 [<sup>3</sup>H]AVP-Bindungsstudien an Gesamtmembranen von COS.M6-Zellen

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass das Glutamat/Dileucinmotiv für den Transport des Rezeptors zur Zelloberfläche wichtig ist. Um zu überprüfen, ob die transportdefekten Rezeptoren noch in der Lage sind AVP zu binden, wurden auch Bindungsstudien mit Gesamtmembranen (= Plasmamembran + interne Membranen) durchgeführt (s. 3.2.17.2). Hierfür wurden wieder die nicht-*c-myc*-markierten Rezeptoren verwendet. Bei einer Konzentration von 10 nM AVP wurde ein ähnliches Bild erhalten wie bei den intakten Zellen (s. Abb. 7 und Abb. 4), d.h. für die transportdefekten Mutanten waren keine zusätzlichen Bindungsstellen nachweisbar, die von internen Rezeptoren resultieren könnten. Diese Ergebnisse deuten an, dass die mutierten, transportdefekten Rezeptoren in einer nicht-funktionellen Form in der Zelle vorliegen und dass der Transportdefekt wahrscheinlich von einem Faltungsdefekt begleitet wird.

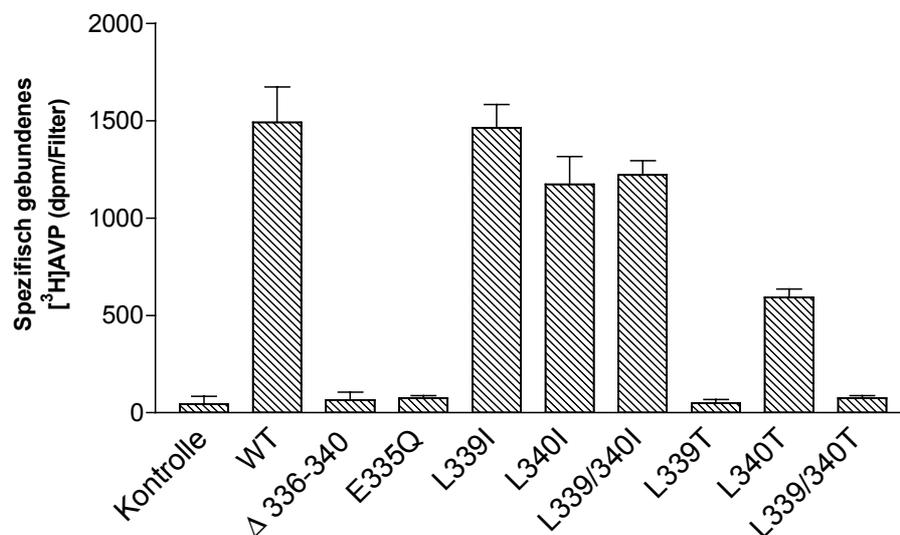


Abb. 7: Spezifische [<sup>3</sup>H]AVP-Bindung an isolierten Membranen von transient transfizierten COS.M6-Zellen. Die [<sup>3</sup>H]AVP-Konzentration (10 nM) wurde nahe der Sättigung gewählt. Die einzelnen Säulen zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3). Als Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen verwendet.

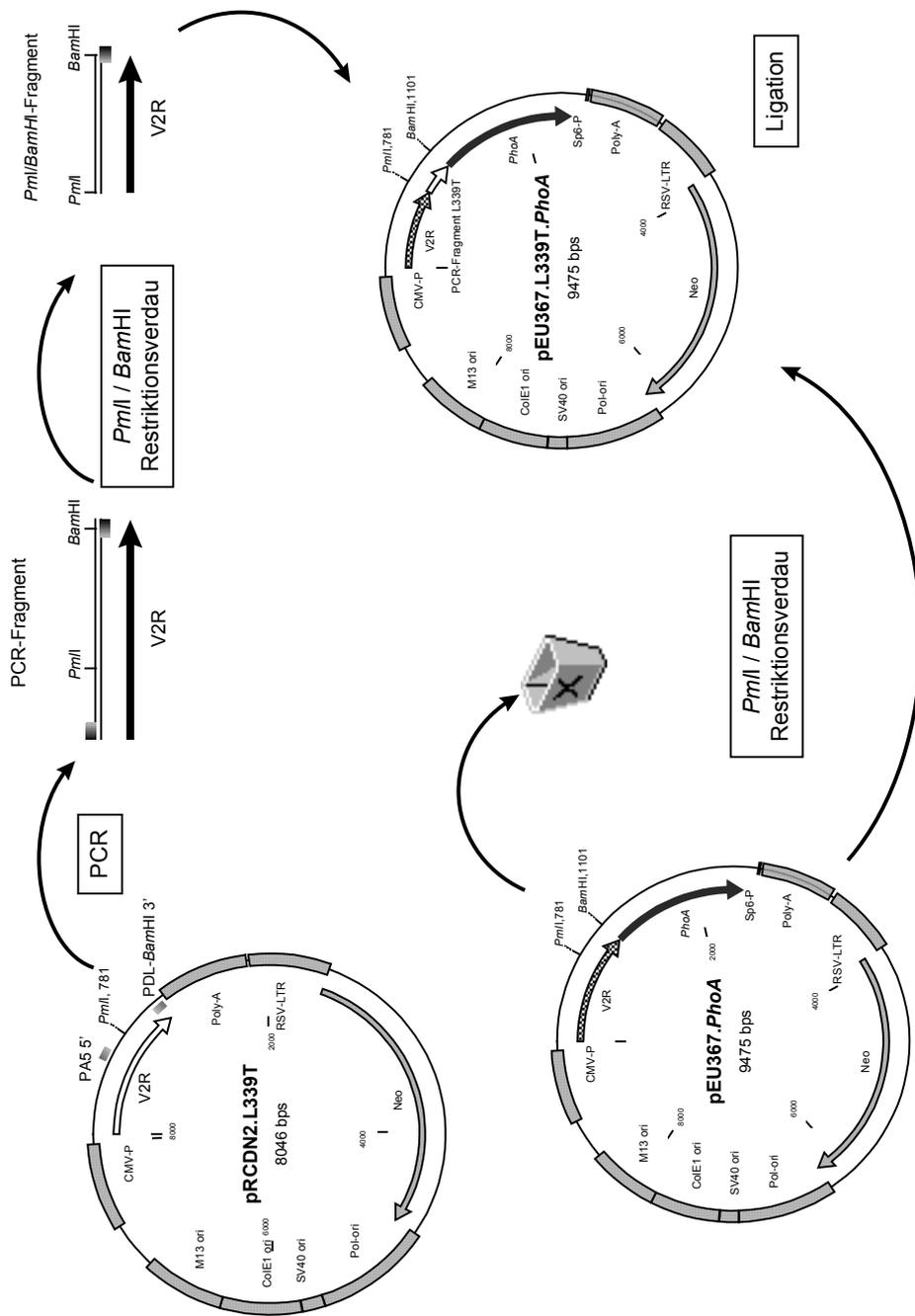
### 4.3 Das Glutamat/Dileucinmotiv ist für den Transport des V2-Rezeptors vom ER zum Golgi-Apparat notwendig

Aus den Ergebnissen der Immunfluoreszenzstudien ergab sich die Frage, in welchem intrazellulären Membrankenpartiment die transportdefekten Rezeptoren retiniert werden. Um die genaue Lokalisation der mutierten Rezeptoren in der Zelle zu bestimmen, wurden sie C-terminal mit dem autofluoreszierendem GFP-Protein fusioniert.

Bevor die mutierten Rezeptoren C-terminal mit GFP fusioniert wurden, wurden entsprechende Fusionen mit *PhoA* konstruiert. Die *PhoA*-Fusionen wurden für diese Arbeit nicht verwendet. Die Klonierung wird aber beschrieben, da die entsprechenden Plasmide Ausgangspunkte für die GFP-Fusionen waren.

#### 4.3.1 Fusion der Rezeptor-Mutanten mit *PhoA*

Mit den Oligonukleotiden PA5 5' und PDL-BamHI 3' wurden PCR-Fragmente - mit der Teilsequenz der V2-Rezeptor cDNA - aus den Plasmiden pRCDN2.E335Q, pRCDN2.L339I, pRCDN2.L340I, pRCDN2.L339/340I, pRCDN2.L339T, pRCDN2.L340T und pRCDN2.L339/340T amplifiziert (s. Abb. 8). Hierbei wurde an Position 1101 der cDNA des V2-Rezeptors eine neue *Bam*HI-Schnittstelle eingeführt. Die mutierten Fragmente wurden mit *Pml*I und *Bam*HI gespalten (s. 3.2.3) und gegen das wildtypische *Pml*I/*Bam*HI-Fragment des Plasmids pEU367.*PhoA* (SCHÜLEIN et al., 1996b) ausgetauscht (s. 3.2.4, 3.2.5 und 3.2.7) (s. Abb. 8). Es entstanden die rekombinanten Plasmide pEU367.E335Q.*PhoA*, pEU367.L339I.*PhoA*, pEU367.L340I.*PhoA*, pEU367.L339/340I.*PhoA*, pEU367.L339T.*PhoA*, pEU367.L340T.*PhoA* und pEU367.L339/340T.*PhoA*. Bei den Endkonstrukten war der *PhoA*-Anteil jeweils am Rest K367 des V2-Rezeptors (= vollständiger Rezeptor bis auf die letzten vier Aminosäurereste). Die Sequenzen aller Plasmide wurde durch Sequenzierung der cDNA verifiziert (s. 3.2.12).



**Abb. 8: Schematische Darstellung der Konstruktion der V2-Rezeptor *PhoA*-Fusionsproteine.** Die Konstruktion ist hier am Beispiel der L339T Mutante gezeigt. Nähere Erläuterungen im Text.

### 4.3.2 Fusion der V2-Rezeptor-Mutanten mit GFP

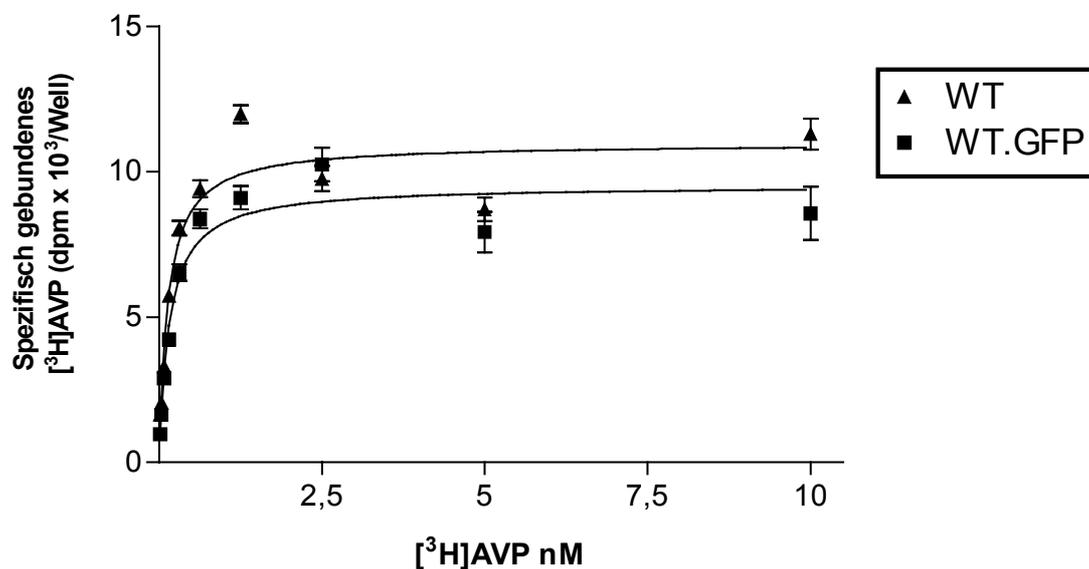
Für die Konstruktion der entsprechenden GFP-Fusionen wurden *SacI/BamHI*-Fragmente von pEU367.E335Q.*PhoA*, pEU367.L339I.*PhoA*, pEU367.L340I.*PhoA*, pEU367.L339/340I.*PhoA*, pEU367.L339T.*PhoA*, pEU367.L340T.*PhoA* und pEU367.L339/340T.*PhoA* in den GFP-Expressionsvektor pEGFP-N1 kloniert (s.3.2.3, 3.2.4, 3.2.5 und 3.2.7) (s. Abb. 9). Dieser Vektor kodiert für die 27 kDa „red shifted“ GFP Variante. Dabei entstanden folgende rekombinante Plasmide: pEU367.GFP, pEU367.E335Q.GFP, pEU367.L339I.GFP, pEU367.L340I.GFP, pEU367.L339/340I.GFP, pEU367.L339T.GFP, pEU367.L340T.GFP und pEU367.L339/340T.GFP. Bei den Endkonstrukten waren die GFP-Anteile, analog den *PhoA*-Fusionen, wieder am Rest K367 fusioniert (s. Abb. 10).





### 4.3.2.1 Pharmakologische Charakterisierung des mit GFP-markierten V2-Rezeptors

Um zu überprüfen, ob der C-terminal fusionierte GFP-Anteil die V2-Rezeptorfunktionen beeinträchtigt, wurden die pharmakologischen Eigenschaften der unmarkierten und der GFP-markierten wildtypischen Rezeptoren verglichen. Zunächst wurde die  $K_D$  und  $B_{MAX}$  für  $[^3H]AVP$  an intakten transient transfizierten COS.M6-Zellen bestimmt (s. 3.2.13 und 3.2.17.1.2.1) (s. Abb. 11).

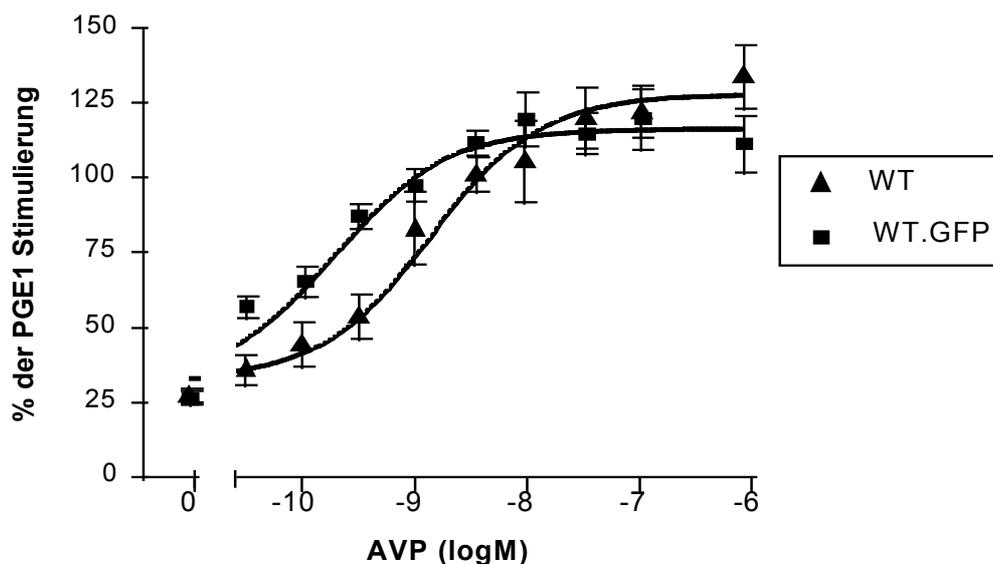


**Abb. 11: Spezifische  $[^3H]AVP$ -Bindung an intakte, transient transfizierte COS.M6-Zellen.** Die Sättigungskurve,  $K_D$  und  $B_{MAX}$  für den unmarkierten (WT) und GFP-markierten Rezeptor (WT.GFP) wurden mit Hilfe von GraphPad Prism<sup>®</sup> Programm (Version 3.00) berechnet. Einzelne Punkte stellen den Mittelwerte und Standardabweichungen dar ( $n=3$ ).

Der gemessene  $K_D$ -Wert des GFP-markierten wildtypischen Rezeptors (WT.GFP) ( $2,04 \pm 0,37$  nM) zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied gegenüber der unmarkierten Form (WT) ( $K_D$ :  $1,53 \pm 0,36$  nM) ( $p \geq 0,05$ ). Auch die  $B_{MAX}$ -Werte

zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede ( $B_{MAX}$  WT.GFP:  $418,40 \pm 21,57$  fmol/mg Protein und  $B_{MAX}$  WT:  $420,00 \pm 23,52$  fmol/mg Protein)<sup>6</sup> ( $p \geq 0,05$ ).

Die Fähigkeit des mit GFP markierten V2-Rezeptors, die „second messenger“ Bildung zu stimulieren, wurde mit Hilfe eines Adenylylzyklase-Versuchs bestimmt (AC Versuch; s. 3.2.18) (s. Abb. 12). Für dieses Experiment wurden HEK293-Zellen verwendet, da in diesen Zellen deutlich mehr AC-Aktivität als in COS.M6-Zellen vorhanden ist. Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den  $EC_{50}$  Werten des unmarkierten (WT;  $EC_{50}$ :  $5,32 \pm 0,50$  nM) und des GFP-markierten Rezeptors (WT.GFP;  $EC_{50}$ :  $1,30 \pm 0,25$  nM) ( $p \geq 0,05$ ) gefunden werden. Auch die maximale Stimulierbarkeit war fast gleich. Zusammengefasst konnte mit der [<sup>3</sup>H]AVP-Bindungs- und dem Adenylylzyklase-Versuch gezeigt werden, dass die Fusion mit GFP die Funktionen des V2-Rezeptors nicht beeinträchtigt.



**Abb. 12: Stimulierung der AC in Gesamtmembranen von transient transfizierten HEK293-Zellen.** Die Dosis-Wirkungskurve und die  $EC_{50}$  für den unmarkierten (WT) und für den GFP-markierten Rezeptor (WT.GFP) wurden mit Hilfe des GraphPad Prism<sup>®</sup> Programm (Version 3.00) berechnet. Einzelne Punkte stellen Mittelwerte und Standardabweichungen dar (n=3). Die Ergebnisse sind als % der PGE1 Stimulierung angegeben.

<sup>6</sup> Es konnten für WT.GFP 120162 und für den unmarkierten Rezeptor 128208 Bindungsstellen pro Zelle berechnet werden (s. 3.2.17.1.2.4).

Nach dem Vergleich der pharmakologischen Eigenschaften von unmarkierten und GFP-markierten wildtypischen Rezeptoren wurden auch Bindungsstudien mit allen mutierten GFP-markierten Rezeptoren durchgeführt. Auch hier stimmten die Ergebnisse mit denen der unmarkierten Rezeptoren überein (s. Abb. 4 und Abb. 7; Daten werden nicht gezeigt).

### **4.3.3 Lokalisation der GFP-markierten V2-Rezeptor-Mutanten in COS.M6-Zellen**

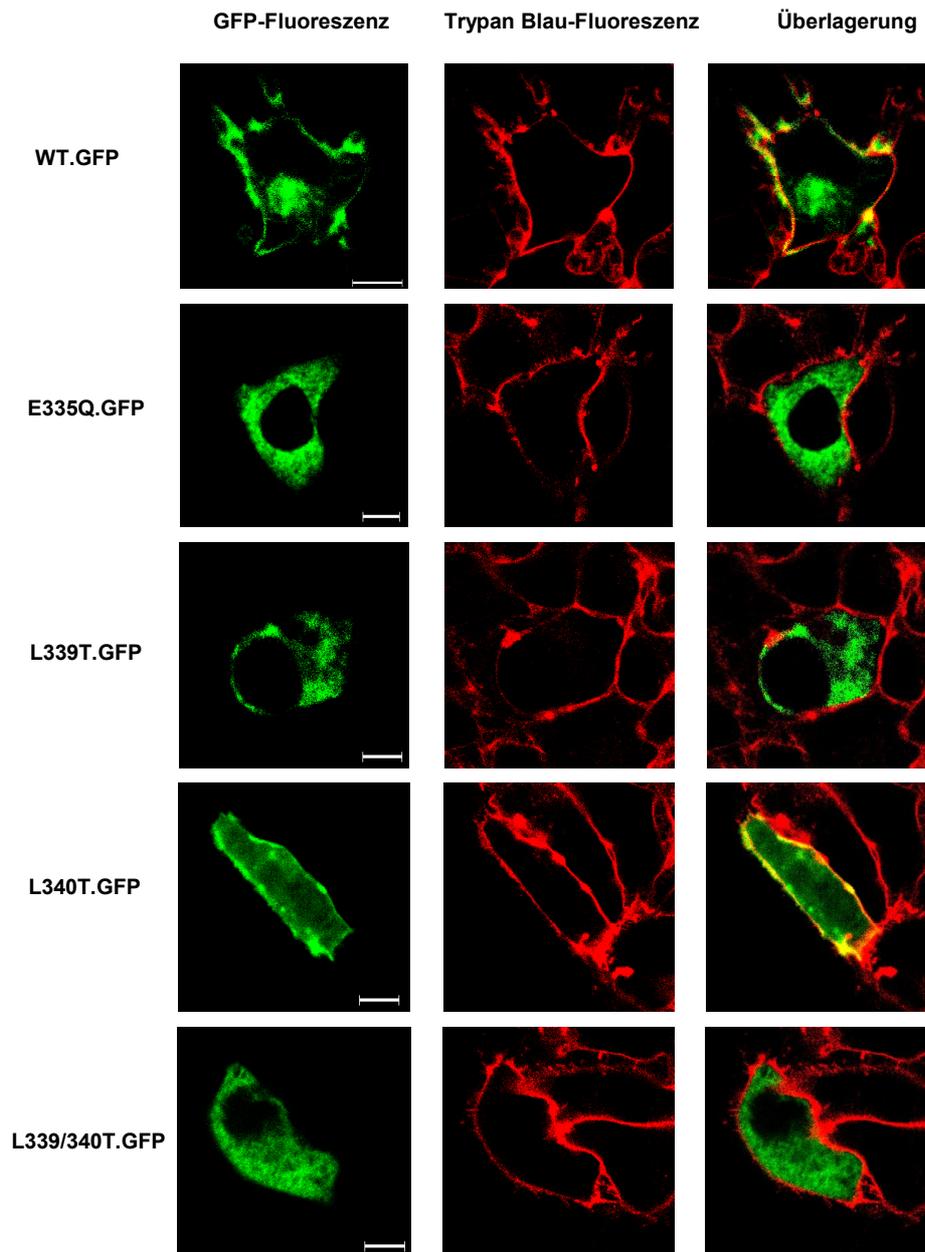
Nachdem sichergestellt war, dass der GFP-Anteil die V2-Rezeptorfunktion nicht beeinträchtigt, wurden die GFP-Fluoreszenzen der Rezeptor-Mutanten (E335Q.GFP, L339T.GFP, L340T.GFP und L339/340T.GFP) in lebenden, transient transfizierten COS.M6-Zellen (s. 3.3.13) mit Hilfe des LSM lokalisiert (s. Abb. 13, links, grün). Um Rezeptoren an der Plasmamembran lokalisieren zu können, wurde, nach Aufnahme der GFP-Fluoreszenz, die Plasmamembran der selben Zellen mit Trypanblau gefärbt (s. Abb. 13, Mitte, rot; s. 3.2.20) (bei der Trypanblaufärbung sind auch benachbarte, nicht transfizierte Zellen sichtbar). Eine computergestützte Überlagerung der grün dargestellten GFP- und der rot dargestellten Trypanblau-Fluoreszenzsignale zeigt in gelb Kolokalisation an, also Rezeptoren die in der Plasmamembran lokalisiert sind (s. Abb. 13, rechts, gelb).

Für den wildtypischen GFP-markierten V2-Rezeptor wurde eine Überlappung der GFP-Signale mit den Trypanblau-Signalen der Plasmamembran gefunden (s. Abb. 13, WT.GFP, rechts, gelb). Dies zeigt, dass der wildtypische Rezeptor zur Zelloberfläche transportiert worden ist. Wie bei der Immunfluoreszenz konnten auch hier zusätzliche GFP-Signale im Zellinnern gefunden werden. Es könnte sich dabei, wie erwähnt, um V2-Rezeptoren handeln, die auf dem Weg zur Plasmamembran sind (s. auch 4.2.2.). Da beide Signale aber ungefähr gleich stark waren, könnte es sich bei den intrazellulären Signalen auch um Rezeptoren handeln, die aufgrund der Überexpression retiniert werden. Auch für L340T.GFP waren Signale an der

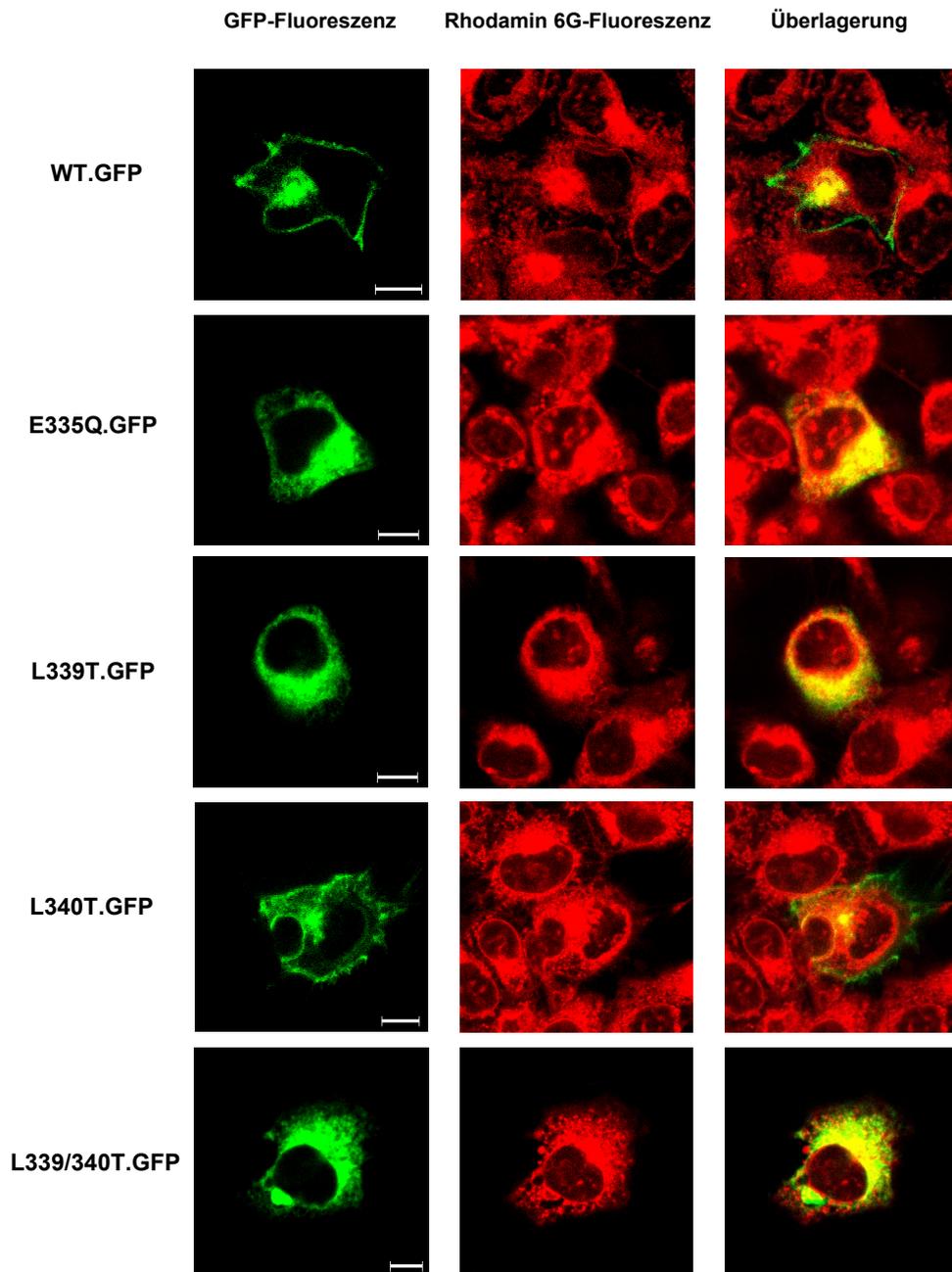
Plasmamembran nachweisbar. Der intrazelluläre Signalanteil war aber größer als bei WT.GFP, was in Einklang mit den partiellen Transportdefekt dieser Mutante ist.

Im Gegensatz zu WT.GFP und L340T.GFP konnte bei E335Q.GFP, L339T.GFP und L339/340T.GFP keine Überlappung der GFP- und Trypanblau-Fluoreszenzsignale nachgewiesen werden. Die GFP-Signale dieser mutierten Rezeptoren füllten mit Ausnahme des Zellkerns diffus das Innere der Zelle aus. Diese Befunde bestätigen, dass das Glutamat/Dileucinmotiv essentiell für den Transport des V2-Rezeptors zur Plasmamembran ist.

Für die Bestimmung des Membrankompartiments, in dem die transportdefekten Mutanten retiniert wurden, wurde an lebenden, transient transfizierten COS.M6-Zellen eine Kollokalisierung der GFP-Fluoreszenzsignale mit den Signalen des ER-Fluoreszenzmarkers Rhodamin 6G untersucht. Zuerst wurden wieder die GFP-Fluoreszenzen aufgenommen (s. Abb. 14, links, grün). Das ER der selben Zellen wurde dann mit Rhodamin 6G gefärbt (s. Abb. 14, Mitte, rot; s. 3.2.20) und eine computergestützte Überlagerung beider Signale erzeugt. Eine gelbe Färbung zeigt Kollokalisierung an, also in diesem Fall, Rezeptoren die sich im ER befinden (s. Abb. 14, rechts, gelb). Bei WT.GFP war ein Teil der GFP-Fluoreszenzsignale um die Rhodamin 6G-Signale herum lokalisiert. Diese Signale stellen wieder die Rezeptoren dar, die zur Plasmamembran transportiert wurden. Im Innern der Zelle konnte eine Überlappung festgestellt werden. Wie oben erwähnt, könnte es sich hierbei um Rezeptoren handeln, die sich im ER auf dem Weg zur Zelloberfläche befinden. Für die L340T.GFP Mutante wurden ähnliche Ergebnisse erhalten. Auch hier wurden GFP-Fluoreszenzsignale an der Zelloberfläche (keine Überlappung mit der Rhodamin 6G-Fluoreszenz) und im ER (Überlappung mit der Rhodamin 6G-Fluoreszenz) gefunden. Für die transportdefekten Mutanten E335Q.GFP, L339T.GFP und L339/340T.GFP wurde dagegen nur im Innern der Zelle eine Überlappung der GFP- und Rhodamin 6G-Signale beobachtet. Wie erwartet, konnten für diese Rezeptor-Mutanten keine GFP-Signale an der Zelloberfläche detektiert werden (s. Abb. 14). Diese Ergebnisse zeigen, dass die transportdefekten Mutanten E335Q.GFP, L339T.GFP und L339/340T.GFP im ER zurückgehalten und nicht zur Plasmamembran transportiert werden.



**Abb. 13: Lokalisation von GFP-markierten V2-Rezeptoren in der Plasmamembran von lebenden, transient transfizierten COS.M6-Zellen.** Auf Deckgläsern gewachsene Zellen wurden mit den Plasmiden pEU367.GFP, pEU367.E335Q.GFP, pEU367.L339T.GFP, pEU367.L340T.GFP und pEU367.L339/340T.GFP transient transfiziert. Die Bilder zeigen x/y-Scans der Zellen. Links: Die GFP-Fluoreszenzen der Rezeptoren sind in grün dargestellt. Mitte: Nach Aufnahme der GFP-Fluoreszenz wurde die Plasmamembran der selben Zellen mit Trypanblau gefärbt und die Fluoreszenz auf einem zweiten Kanal aufgenommen. Die Trypanblau-Fluoreszenzen sind in rot dargestellt. Rechts: Die computergestützte Überlagerung der linken und mittleren Bilder. Eine gelbe Färbung zeigt Kolokalisation an, d.h. die Rezeptoren die zur Plasmamembran transportiert werden. Maßstab: 10  $\mu$ m.



**Abb. 14: Lokalisation von GFP-markierten V2-Rezeptoren im ER von lebenden, transient transfizierten COS.M6-Zellen.** Auf Deckgläsern gewachsene Zellen wurden mit den Plasmiden pEU367.GFP, pEU367.E335Q.GFP, pEU367.L339T.GFP, pEU367.L340T.GFP und pEU367.L339/340T.GFP transient transfiziert. Die Bilder zeigen x/y-Scans der Zellen. Links: Die GFP-Fluoreszenzen der Rezeptoren sind in grün dargestellt. Mitte: Nach Aufnahme der GFP-Fluoreszenz wurde das ER der selben Zellen mit Rhodamin 6G gefärbt und die Fluoreszenz auf einem zweiten Kanal aufgenommen. Die Rhodamin 6G-Signale sind in rot dargestellt. Rechts: Die computergestützte Überlagerung der linken und mittleren Bilder. Eine gelbe Färbung zeigt Kolokalisation an, d.h. Rezeptoren die im ER lokalisiert sind. Maßstab: 10  $\mu$ m.

#### 4.3.4 Analyse des Glykosylierungsstatus der GFP-markierten V2-Rezeptor-Mutanten in COS.M6-Zellen

Um die ER-Lokalisation der transportdefekten, GFP-markierten V2-Rezeptor-Mutanten zu bestätigen, wurde auch eine Analyse des Glykosylierungsstatus durchgeführt. Im Falle einer ER-Retention sollten nur mannosereich-glykosylierte Formen<sup>7</sup>, im Falle eines Transports an die Plasmamembran dagegen auch komplex-glykosylierte Formen<sup>8</sup> nachweisbar sein. Bei einem teilweise transportdefekten Rezeptor sollten geringere Mengen an komplex-glykosylierten Rezeptoren nachweisbar sein.

Für diese Analyse wurden COS.M6-Zellen transient mit den Plasmiden pEU367.GFP, pEU367.E335Q.GFP, pEU367.L339T.GFP, pEU367.L340T.GFP und pEU367.L339/340T.GFP transfiziert und Gesamtmembranen isoliert. (s. 3.2.15). Die Membranen wurden mit *EndoH* und mit *PNGaseF* behandelt (um die mannosereiche bzw. komplexe Glykosylierung zu entfernen) (s. 3.2.15.2.1 und 3.2.15.2.2). Die Fusionsproteine wurden auf einem Immunoblot mit monoklonalen Maus-anti-GFP IgG und mit alkalischer Phosphatase-konjugiertem Ziege-anti-Maus IgG detektiert (s. 3.2.16.4) (s. Abb. 15).

In allen Proben (auch in der Kontrolle) wurde eine 57 kDa große immunreaktive Proteinbande detektiert. Es handelt sich hierbei um eine unspezifische Bande. Beim unbehandelten WT.GFP-Fusionsprotein (-) wurden zwei spezifische Banden nachgewiesen, eine breite 75-88 kDa und eine schmalere 60-65 kDa große Bande. Bei *EndoH*-Behandlung (EH) wurde die 60-65 kDa Bande zu einer 60 kDa Bande reduziert, die 75-88 kDa Bande war dagegen *EndoH* resistent. Bei der 60-65 kDa Bande handelt es sich daher um die mannosereich-glykosylierten Formen von WT.GFP, bei der 75-88 kDa Bande um die komplex-glykosylierte Formen. Die

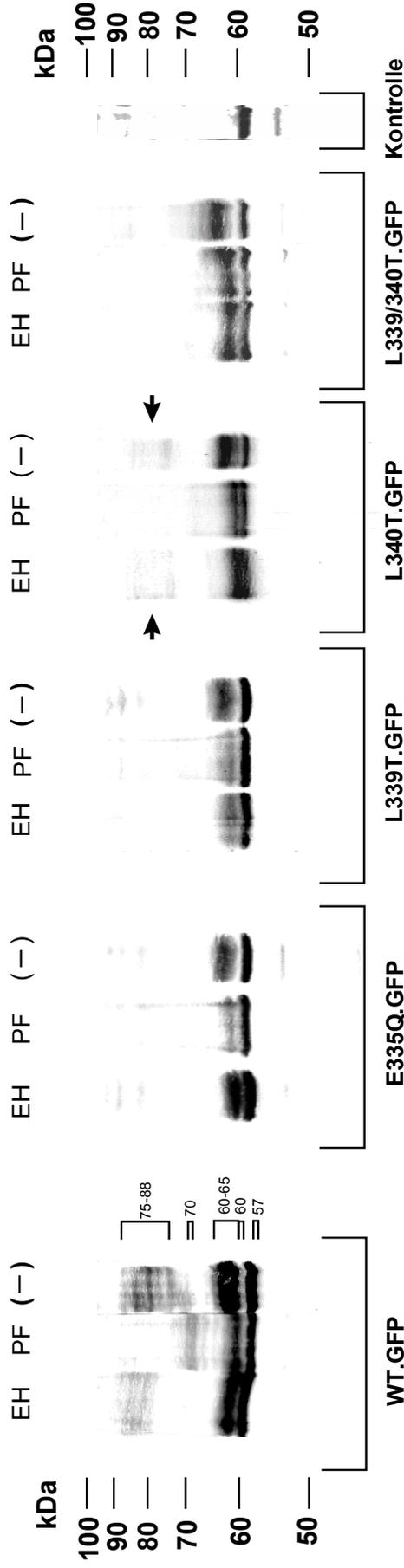
---

<sup>7</sup> Mannosereich-glykosylierte Proteine sind unreife Proteine, die sich noch im ER oder im frühen Golgi-Apparat befinden.

<sup>8</sup> Bei komplex-glykosylierten Proteinen handelt es sich um reife Proteine, die das ER verlassen haben und sich zumindest im medialen Kompartiment des Golgi-Apparates befinden.

schmale 60 kDa Bande stellt unmodifizierte Formen dar. Durch *PNGaseF*-Behandlung (PF) konnte die 60-65 kDa ebenfalls zur nicht glykosylierten 60 kDa Bande reduziert werden. Erwartungsgemäß war auch die breite 75-88 kDa Bande *PNGaseF* sensitiv, sie wurde aber überraschenderweise nicht zur unmodifizierten 60 kDa Bande, sondern zu einer 70 kDa Bande reduziert.

Dieser überraschende Befund ist auf die *EndoH* und *PNGaseF* resistente O-Glykosylierungen zurückzuführen, die im Golgi-Apparat in den N-Terminus des V2-Rezeptors eingefügt werden und die apparente Molmasse um 10 kDa vergrößern (SADEGHI UND BIRNBAUMER, 1999).



**Abb. 15: EndoH- und PNGaseF-Analyse von GFP-markierten V2-Rezeptoren.** COS.M6-Zellen wurden mit den Plasmiden pEU367.GFP, pEU367.E335Q.GFP, pEU367.L339T.GFP, pEU367.L340T.GFP und pEU367.L339/340T.GFP transient transfiziert. Die anschließende Immunoblot-Analyse wurden mit Gesamtmembranen durchgeführt. Die Membranen (50 µg Protein) wurden mit *EndoH* (EH) oder *PNGaseF* (PF) behandelt oder blieben unbehandelt (-). Die immunoreaktiven Proteine wurden mit monoklonalen Maus-anti-GFP-Antikörpern und mit alkalische Phosphatase konjugiertem Ziege-anti-Maus IgG detektiert. Als Kontrolle wurden mit Vektor transfizierte COS.M6-Zellen eingesetzt. Die Pfeile weisen auf die noch gerade nachweisbaren komplex-glykosylierten Formen von L340T.GFP hin.

Das aus den Ergebnissen berechnete Molekulargewicht für den nicht mit GFP-markierten, komplex-glykosylierten, wildtypischen V2-Rezeptor beträgt 48-61 kDa (minus 27 kDa des GFP-Anteils) und stimmt mit früheren Ergebnissen überein (TSUKAGUCHI et al., 1995; INNAMORATI et al., 1996). Die mannosereich-glykosylierten Formen von WT.GFP könnten, wie erwähnt, Transportintermediate darstellen, die sich auf den Weg zur Plasmamembran befinden und/oder unreife Proteine, die durch Überexpression (Überbelastung des vesikulären Transportsystems) im Zellinnern zurückgehalten werden.

Beim mutierten Rezeptor L340T.GFP war die Menge an komplex-glykosylierten Formen nur knapp über der Nachweisgrenze, was mit dem partiellen Transportdefekt dieses mutierten Rezeptors in Einklang steht. Für die mutierten Rezeptoren E335Q.GFP, L339T.GFP und L339/340T.GFP waren dagegen keine komplex-glykosylierten Formen detektierbar. Hier waren nur die 60-65 kDa mannosereichen Formen nachweisbar. Dies unterstützt die zuvor gezeigte ER-Retention dieser Mutanten.

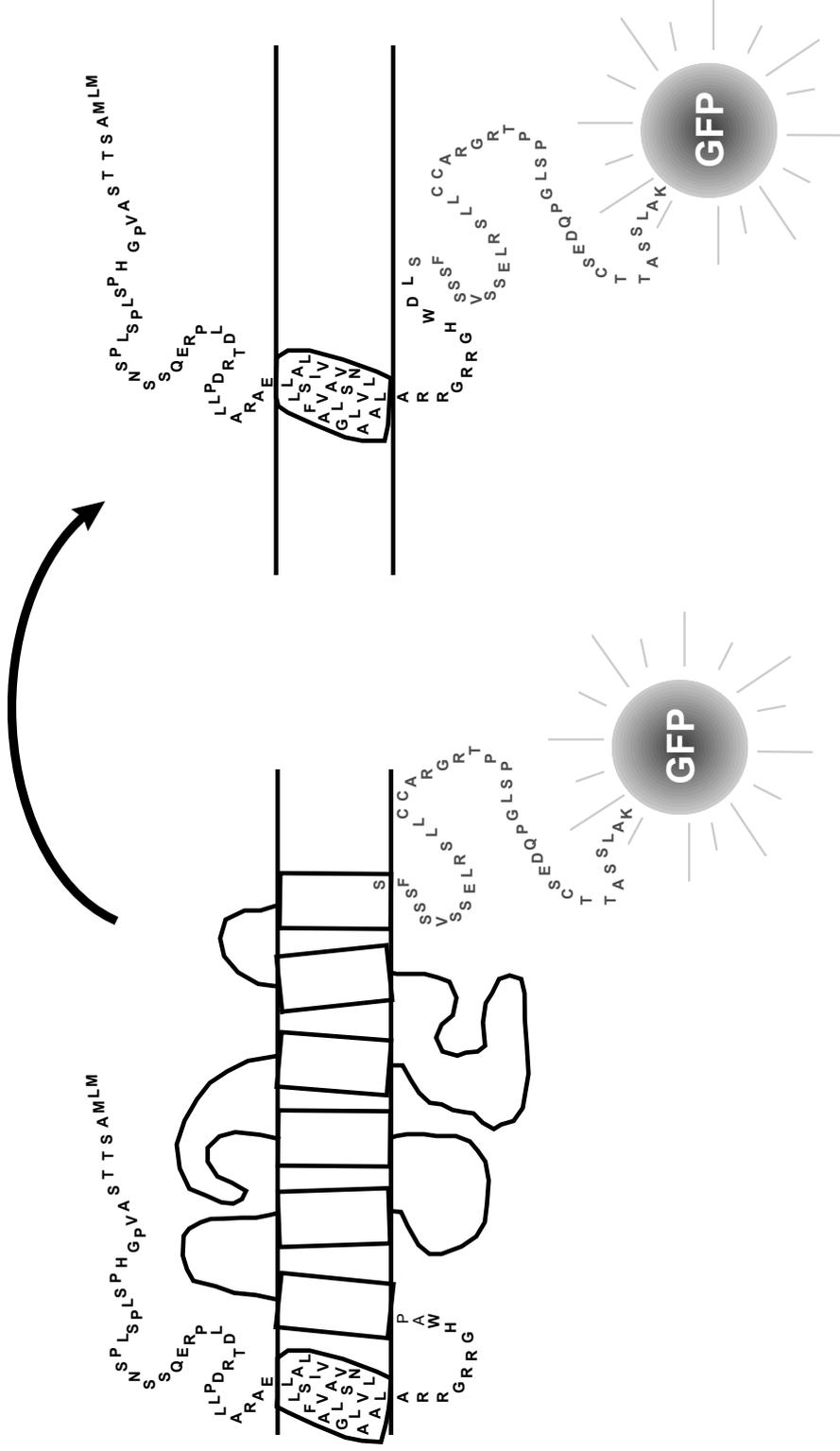
#### **4.4 Das Glutamat/Dileucinmotiv ist in einem Minirezeptor, das unabhängig von der Gesamtrezeptorfaltung ist, nicht transportrelevant**

##### **4.4.1 Konstruktion eines Modellrezeptorprotein für eine faltungsunabhängige Translokation des C-Terminus des V2-Rezeptors**

Die bisherigen Daten zeigen, dass das Glutamat/Dileucinmotivs des V2-Rezeptors für den Transport vom ER zum Golgi-Apparat essentiell ist. Für diese Ergebnisse waren zu diesem Zeitpunkt zwei Erklärungen denkbar: Einmal könnte das Motiv für eine transportkompetente Faltung des Rezeptors ER wichtig sein, um das Qualitätskontrollsystem zu überwinden. Zum anderen könnte das Motiv aber auch als Transportsignal das Einsortieren in ER zu Golgi-Vesikel erleichtern. Ein Transportsignal sollte auf transportdefekte Proteine übertragbar sein und unabhängig

von der Gesamtrezeptorfaltung funktionieren, eine faltungsrelevante Domäne dagegen nicht.

Für den V2-Rezeptor wurde ein auf GFP-Fusionen basierendes System entwickelt, um beide Möglichkeiten voneinander zu unterscheiden. An ein verkürztes Rezeptorfragment, das nur noch aus dem N-Terminus, der ersten transmembranären Domäne (TMD1) und IZS1 (bis Aminosäure W71) besteht, wurde der C-Terminus des V2-Rezeptors fusioniert (s. Abb. 16). Dieses Fragment sollte Transportstudien für das Glutamat/Dileucinmotiv erlauben, die unabhängig von der Gesamtrezeptorfaltung sind. Nach Einfügen der Mutationen in das Glutamat/Dileucinmotiv würde ein erneuter Transportdefekt für ein Transportsignal, Transportkompetenz dagegen für ein Faltungsmotiv sprechen.



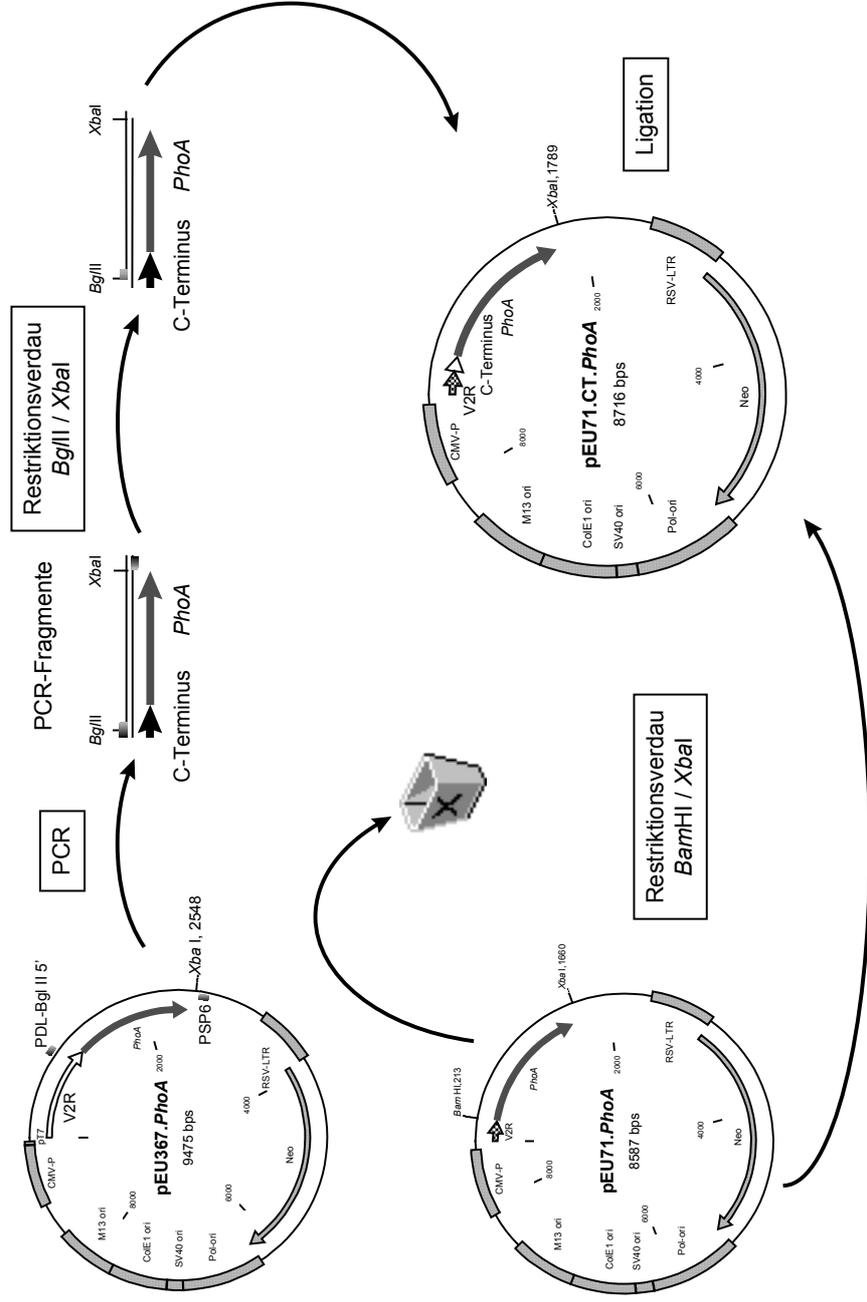
**Abb. 16: Konstruktion eines verkürzten V2-Rezeptors durch Fusion des C-Terminus mit der ersten intrazellulären Schleife.** Die Aminosäuresequenz des N-Terminus, der TMD1, der IZS1 (schwarz) und des C-Terminus (grau) sind hervorgehoben.

#### 4.4.2 Konstruktion der GFP-markierten V2-Rezeptorfragmente

Für die Klonierung wurden zwei früher beschriebene *PhoA* Fusionsproteine verwendet (SCHÜLEIN et al., 1996b). Bei einer war *PhoA* an W71 (pEU71.*PhoA*), beim anderen an K367 des wildtypischen V2-Rezeptors (pEU367.*PhoA*) fusioniert. Ferner wurden die oben beschriebenen pEU367.*PhoA*-Varianten mit den Mutationen im Glutamat/Dileucinmotiv verwendet.

##### 4.4.2.1 Fusionierung wildtypischer und mutierter V2-Rezeptor C-Termini an pEU71.*PhoA*

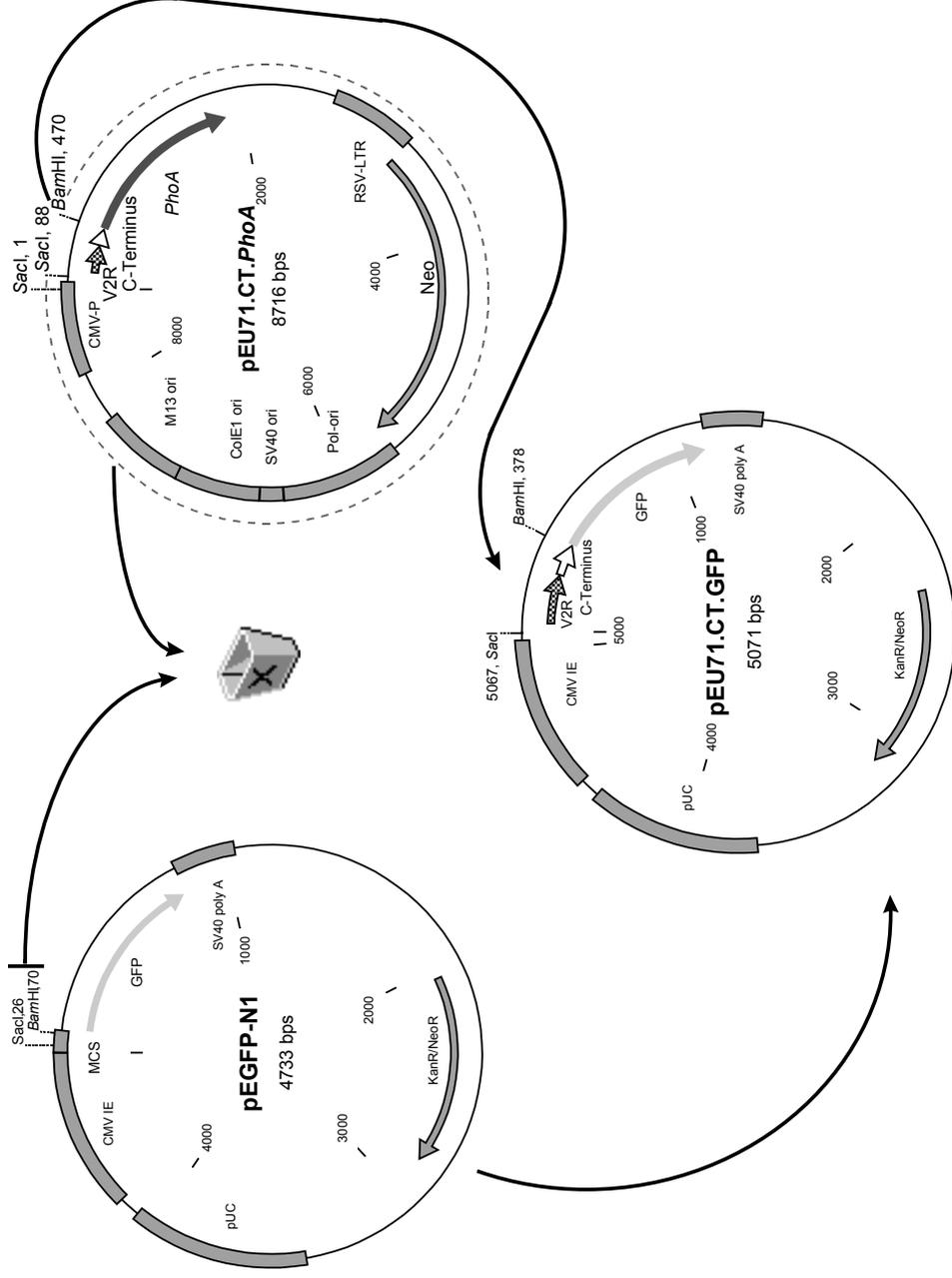
Zuerst wurden *PhoA*-Fusionen für die Rezeptorfragmente konstruiert. Die *PhoA*-Fusionen wurden für diese Arbeit nicht mehr verwendet. Die Klonierung wird aber beschrieben, da die entsprechenden Plasmide Ausgangspunkt für die entsprechenden GFP-Fusionen waren. Für die Klonierung wurde der C-Terminus des V2-Rezeptors (von Aminosäure S327 bis K367) zusammen mit dem *PhoA*-Anteil von Plasmid pEU367.*PhoA* PCR-amplifiziert (s. 3.2.8) (s. Abb. 17). Dabei wurde in 5' Position mit dem Primer eine neue *Bgl*II-Schnittstelle (an Position 972 der V2-Rezeptor cDNA) eingeführt. Die amplifizierten PCR-Fragmente wurden anschließend mit *Bgl*II und *Xba*I gespalten und gegen das *Bam*HI/*Xba*I Fragment von pEU71.*PhoA* getauscht (s. 3.2.3, 3.2.4, 3.2.5 und 3.2.7). Die hier für den wildtypischen C-Terminus beschriebene Klonierung wurde analog auch für pEU367.*PhoA*-Derivate mit Mutationen im Glutamat/Dileucinmotiv durchgeführt. Es entstanden die rekombinanten Plasmide pEU71.CT.*PhoA*, pEU71.E335Q.*PhoA*, pEU71.L339I.*PhoA*, pEU71.L340I.*PhoA*, pEU71.L339/340I.*PhoA*, pEU71.L339T.*PhoA*, pEU71.L340T.*PhoA* und pEU71.L339/340T.*PhoA*. Die Identität aller Konstrukte wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt (s. 3.2.12).



**Abb. 17: Umklonierung des C-Terminus des V2-Rezeptors in das verkürzte V2-Rezeptorfragment pEU71.PhoA.** Die Klonierungsstrategie ist hier am Beispiel des wildtypischen C-Terminus (CT) gezeigt. Nach Einführung einer *Bgl/II*-Schnittstelle durch PCR-Mutagenese wurde das Fragment gespalten und in das Plasmid pEU71.PhoA kloniert.

#### 4.4.2.2 Fusionierung der V2-Rezeptorfragmente mit GFP

Um alle verkürzten V2-Rezeptorfragmente an Aminosäure K367 mit GFP zu fusionieren, wurden aus pEU71.CT.*PhoA*, pEU71.E335Q.*PhoA*, pEU71.L339T.*PhoA*, pEU71.L340T.*PhoA* und pEU71.L339/340T.*PhoA* *SacI/BamHI*-Fragmente in den Vektor pEGFP-N1 umklontiert (s. 3.2.3, 3.2.4, 3.2.5 und 3.2.7) (s. Abb. 18). Die umklontierten cDNA-Fragmente codierten für den N-Terminus, TMD1, IZS1 und den C-Terminus (mit und ohne Mutationen im Glutamat/Dileucinmotiv). Es entstanden die Plasmide pEU71.CT.GFP, pEU71.E335Q.GFP, pEU71.L339T.GFP, pEU71.L340T.GFP und pEU71.L339/340T.GFP.

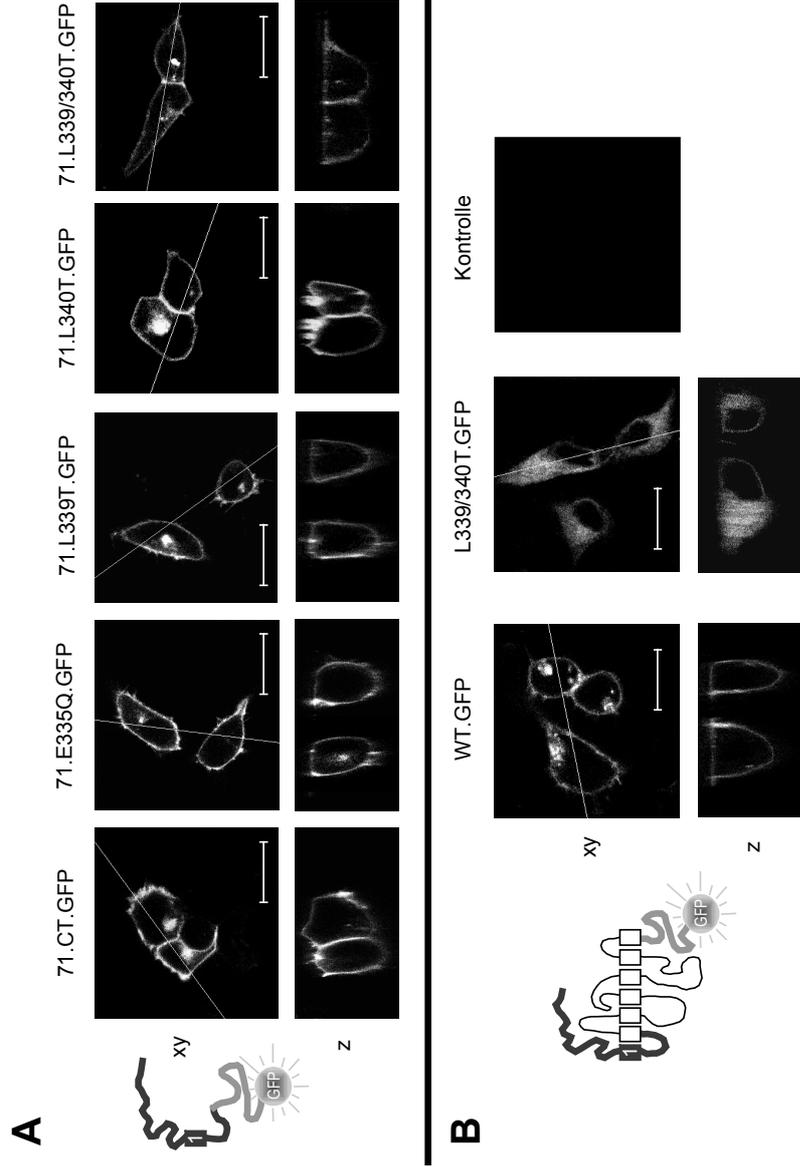


**Abb. 18: Fusionierung der verkürzten V2-Rezeptoren mit Mutationen im Glutamat/Dileucinmotiv mit GFP.** Die Klonierungsstrategie ist hier am Beispiel des wildtypischen Fragments (pEU71.CT.PhoA) gezeigt. Nach Spaltung mit *SacI* und *BamHI* wurde das Fragment in den pEGFP-N1 Vektor kloniert.

#### **4.4.3 Lokalisation der GFP-markierten V2-Rezeptorfragmente in HEK293-Zellen**

Die mit GFP fusionierten, verkürzten V2-Rezeptor Fragmente 71.CT.GFP, 71.E335Q.GFP, 71.L339T.GFP, 71.L340T.GFP und 71.L339/340T.GFP wurden transient in HEK293-Zellen (s. 3.2.13) exprimiert und die GFP-Fluoreszenzsignale mit Hilfe des LSM lokalisiert (s. 3.2.20). Als Positiv- und Negativkontrolle für den Transport zur Plasmamembran wurde der vollständige, GFP-markierte wildtypische Rezeptor (WT.GFP) und der transportdefekte Rezeptor L339/340T.GFP verwendet.

Sowohl das Rezeptorfragment mit dem wildtypischen C-Terminus (71.CT.GFP) als auch die Fragmente mit Mutationen im Glutamat/Dileucinmotiv (71.E335Q.GFP, 71.L339T.GFP, 71.L340T.GFP, 71.L339/340T.GFP) zeigten in horizontalen x/y-Scans deutliche GFP-Fluoreszenzsignale an der Plasmamembran (s. Abb. 19 A). Das gleiche Ergebnis wurde auch für die Positivkontrolle WT.GFP erhalten. Bei L339/340T.GFP, der Negativkontrolle für den Transport, waren die GFP-Fluoreszenzsignale dagegen ausschließlich im Zellinnern lokalisiert (s. Abb. 19 B). Die Lokalisation aller Rezeptorfragmente an der Plasmamembran wurde auch durch Kolokalisation mit dem Plasmamembran-Marker Trypanblau (s. 3.2.20) bestätigt (Daten werden nicht gezeigt).



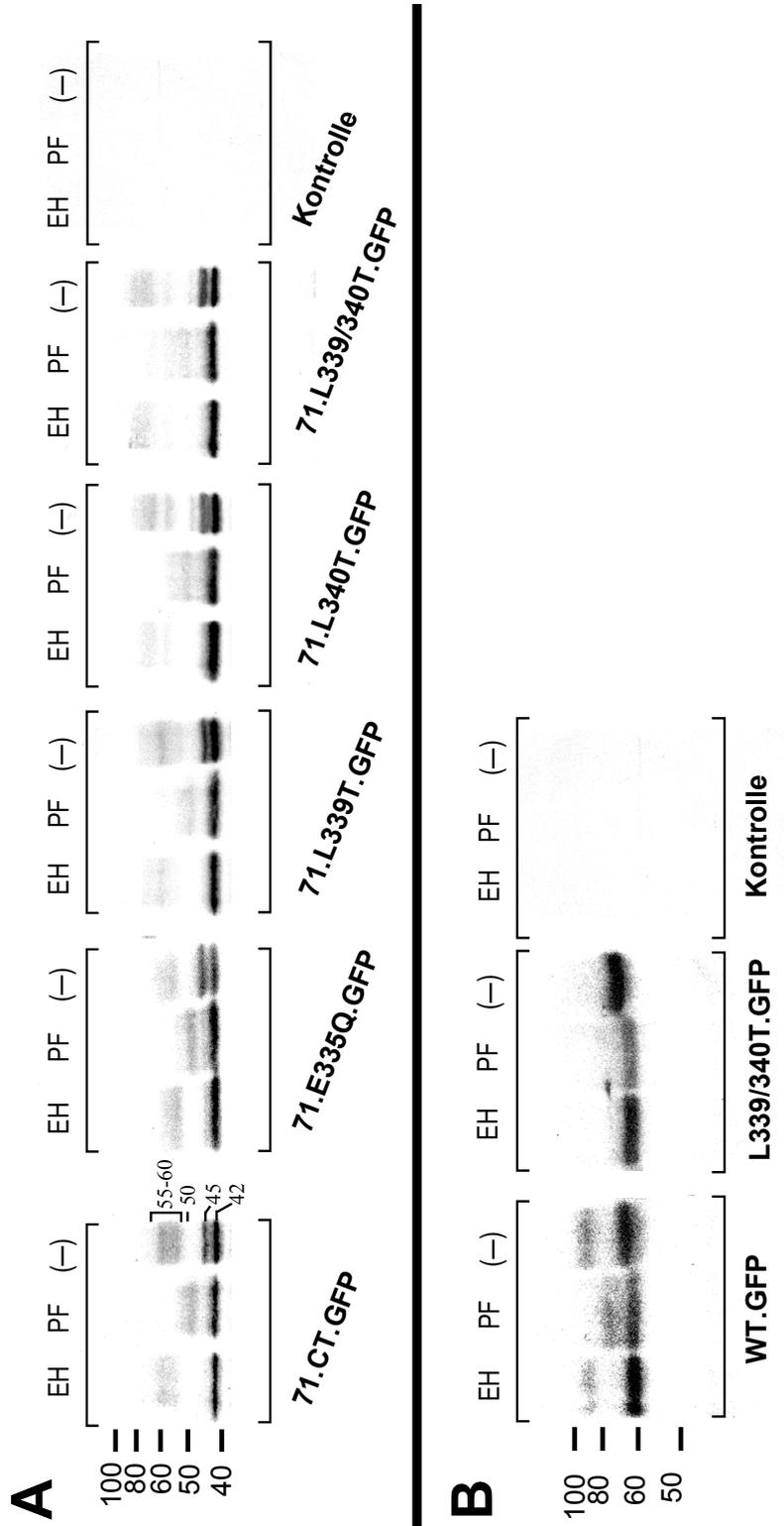
**Abb. 19: Lokalisation der GFP-markierten V2-Rezeptorfragmente in transient transfizierten HEK293-Zellen.** Die GFP-Fluoreszenzen wurden mit Hilfe eines LSM mit x/y- (xy) und z-Scans (z) analysiert: Die Linien zeigen die Ebene der z-Scans. Maßstab: 25 µm. A, GFP-Fluoreszenzsignale von Zellen die wildtypische (71.CT.GFP) und mutierte (71.E335Q.GFP, 71.L339T.GFP, 71.L340T.GFP und 71.L339/340T.GFP) Rezeptorfragmente exprimieren. B, GFP-Fluoreszenzsignale von Zellen die den vollständigen, wildtypischen V2-Rezeptor (WT.GFP) und eine transportdefekte Mutante (L339/340T.GFP) exprimieren (als Positiv- und Negativkontrolle für den Transport zur Plasmamembran). Als Kontrolle wurden nicht transfizierte HEK293-Zellen verwendet.

#### 4.4.4 Analyse des Glykosylierungsstatus der GFP-markierten V2-Rezeptorfragmente in transient transfizierten HEK293-Zellen

Wenn alle mutierten Rezeptorfragmente tatsächlich das ER verlassen können und die Plasmamembran erreichen, müßten in allen Fällen auch komplex-glykosylierte Formen nachweisbar sein. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Gesamtmembranen von transient transfizierten HEK293-Zellen (s. 3.2.13) isoliert (s. 3.2.15). Anschließend wurde mit *EndoH* (EH) und *PNGaseF* (PF) verdaut, um mannosereiche bzw. mannosereiche und komplexe Glykosylierungen zu entfernen (s. 3.2.15.2). Die Fusionen wurden anschließend auf einem Immunoblot mit anti-GFP-Antiserum und [<sup>125</sup>I]-markiertem Esel-anti-Kaninchen IgG detektiert (s. 3.2.16.4) (s. Abb. 20 A). Als Positivkontrolle für komplexe Glykosylierungen wurden wieder Membranen mit WT.GFP, als Negativkontrolle Membranen mit L339/340T.GFP verwendet (s. Abb. 20 B).

Für alle Rezeptorfragmente wurden in der nicht behandelten Membranfraktion drei spezifische Banden gefunden: Eine breite, 55-60 kDa große Bande und zwei schmale Banden von 42 und 45 kDa. Nach *EndoH*-Behandlung wurden die 45 kDa großen Banden zu 42 kDa Banden reduziert. Nach *PNGaseF*-Behandlung wurden die 45 kDa Banden ebenfalls zu 42 kDa Banden reduziert (s. Abb. 20 A). Bei den 45 kDa Banden handelt es sich also um die mannosereich-glykosylierten Formen, bei den 42 kDa Banden um unglykosylierte Formen. Die breiten 55-60 kDa Banden waren *EndoH* resistent, d.h. diese Banden stellen die komplex-glykosylierten Formen dar. Die 55-60 kDa Banden konnten durch *PNGaseF*-Behandlung nicht auf das Niveau der unglykosylierten Formen (42 kDa) sondern nur auf 50 kDa reduziert werden. Hierfür sind O-Glykosylierungen verantwortlich, die im Golgi-Apparat in den N-Terminus eingefügt werden (s.o.). Das berechnete Molekulargewicht für das unmodifizierte Rezeptorfragment war 38,5 kDa (11,5 kDa V2-Rezeptor + 27 kDa GFP). Die etwas größere beobachtete molekulare Masse der Rezeptorfragmente (42 kDa) könnte durch eine unvollständige Entfaltung im SDS-PAGE verursacht worden sein. Die beiden Kontrollproteine WT.GFP und L339/340T.GFP zeigten den bereits beschriebenen Glykosylierungsstatus (s. auch 4.4.1 und Abb. 15). Für WT.GFP wurden sowohl

komplex-glykosylierte (80-85 kDa) als auch mannosereich-glykosylierte Formen (60-65 kDa) detektiert; für den transportdefekten Rezeptor L339/340T.GFP wurden dagegen nur die mannosereich-glykosylierten Formen gefunden (s. Abb. 20 B).



**Abb. 20: Analyse des Glykosylierungsstatus der GFP-markierten V2-Rezeptorfragmente.** Die Immunoblot Analyse wurde mit Gesamtmembranen von transient transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. Die Membranen (50 µg Protein) wurden mit *EndoH* (EH) oder *PNGaseF* (PF) verdaut oder blieben unbehandelt (-). Die immunreaktiven Proteine wurden mit anti-GFP-Antiserum und [<sup>125</sup>I]-markiertem Esel-anti-Kaninchen IgG detektiert. Als Kontrolle wurden nicht transfizierte HEK293-Zellen benutzt. A, Membranen (30 µg Protein) von Zellen die GFP-markierte Rezeptorfragmente mit wildtypischen (71.CT.GFP) und mutierten C-Termini (71.E335Q.GFP, 71.L339T.GFP, 71.L340T.GFP und 71.L339/340T.GFP) enthielten. B, Membranen (50 µg Protein) von Zellen die den GFP-markierten, wildtypischen V2-Rezeptor (WT.GFP) und eine transportdefekte Mutante (L339/340T.GFP) exprimierten (Positiv- und Negativkontrolle für komplexe Glykosylierung). Als Kontrolle dienten nicht transfizierte HEK293-Zellen.

Der Nachweis von komplex-glykosylierten Formen für alle Rezeptorfragmente steht im Einklang mit der LSM-Lokalisation der Rezeptor-GFP-Fluoreszenzen an der Plasmamembran. Zusammenfassend kann man sagen, dass in einem Transportsystem, das unabhängig von der Gesamtzeptorfaltung ist, das Glutamat/Dileucinmotiv keinen Einfluß auf den Rezeptortransport zur Zellmembran besitzt.

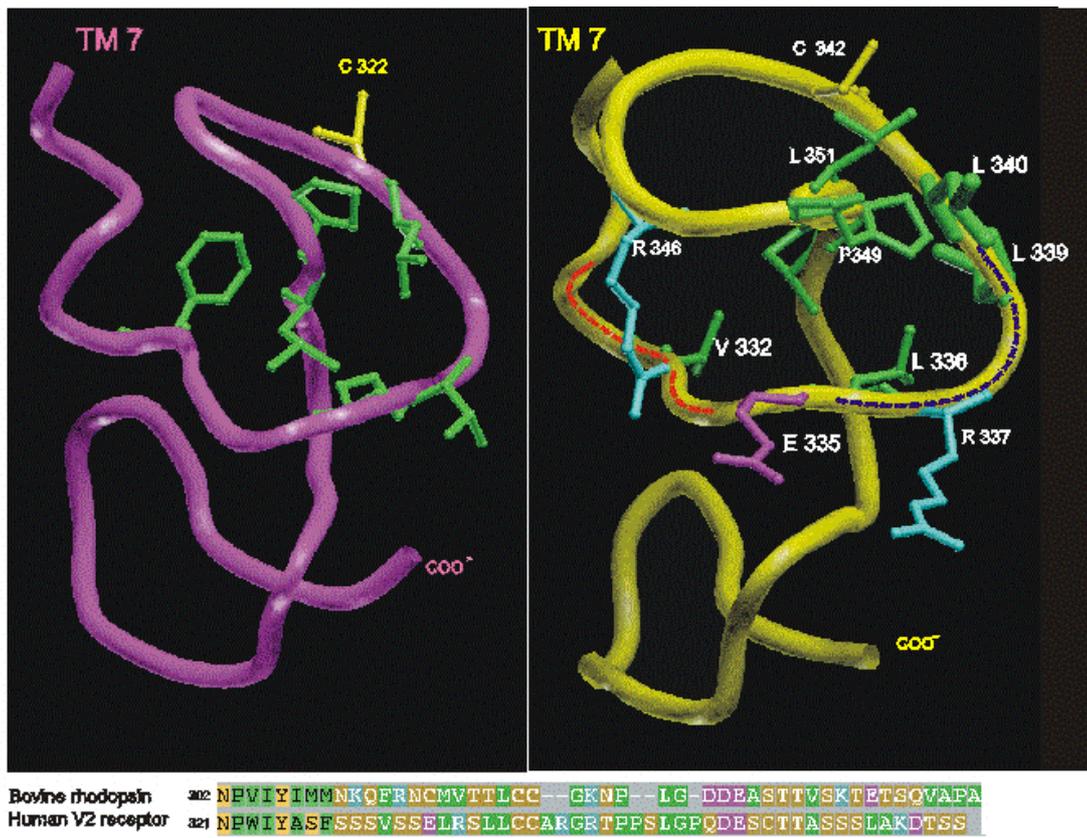
#### **4.5 Erstellung eines Strukturmodells für den intrazellulären C-Terminus des V2-Rezeptors**

Wenn das Glutamat/Dileucinmotiv tatsächlich kein lineares Transportsignal darstellt, sondern faltungsrelevant ist, sollte sich das auch in der Struktur dieser Region widerspiegeln. Um einen Einblick hierfür zu bekommen, wurde in Zusammenarbeit mit G. Krause (FMP-Berlin) ein 3D-Strukturmodell des V2-Rezeptors berechnet, das auf die Elektronendichtekarten des Frosch-Rhodopsins (UNGER et al., 1997) und die NMR-Struktur des Polypeptidkomplexes der cytosolischen Domänen des Rhodopsins aufbaut (YEAGLE et al., 1997).

Die Wahl des Rhodopsins als Rechengrundlage war naheliegend: Zum einen gibt es eine hohe Sequenzhomologie zwischen den C-Termini beider Rezeptoren (s. Abb. 21). Ferner wurden beim Rhodopsin die meisten intermolekularen Wechselwirkungen (NOE Daten) zwischen dem C-Terminus und der IZS1 beschrieben (YEAGLE et al., 1997), d.h. die am besten beschriebene Struktur des Rhodopsins entsprach genau dem Bereich, in dem sich das Glutamat/Dileucinmotiv des V2-Rezeptors befindet. Untersuchungen zur Struktur von intrazellulären Domänen anderer GPCR unterstützen die Wahl des Rhodopsins als Vorlage: Die NMR-Struktur der IZS3 des Parathyroid Hormon (PTH)-Rezeptors (PELEGRINI et al., 1997) war vergleichbar mit der Struktur der IZS3 vom Rhodopsin. Das gleiche gilt auch für die NMR-Struktur des IZS3-Peptids des Angiotensin II 1A (AT<sub>1A</sub>)-Rezeptors. Hier wiesen die helikalen Verlängerungen der TMD5 von Rhodopsin und von AT<sub>1A</sub>-Rezeptor vergleichbare Strukturen auf (FRANZONI et al., 1998).

Die berechnete Struktur der komplexierten cytoplasmatischen Domänen legt die Lage der Schleifenenden im Raum fest. Beim Aufbau des Modells zeigte sich, dass die Positionen dieser Enden sehr gut zur Lage der cytoplasmatischen Enden der transmembranären Domänen passten, d.h. die Struktur der cytoplasmatischen Domänen ließ sich einfach mit den Transmembrantemplates fusionieren. Dies ist ein eindeutiger Hinweis für eine gute Modellqualität. Die NMR-Struktur des C-Terminus des Rhodopsins und das berechnete Modell des C-Terminus des V2-Rezeptors sind in Abb. 21 gezeigt. Die Region zwischen TMD7 und den palmitoylierten Cysteinen (C341 und C342) (auch als IZS4 bezeichnet) bildet eine U-förmige Struktur; die beiden palmitoylierten Cysteine werden in Richtung Plasmamembran exponiert. Der gesamte Bereich zeigte eine Konformation, die der des Rhodopsins sehr ähnlich war.

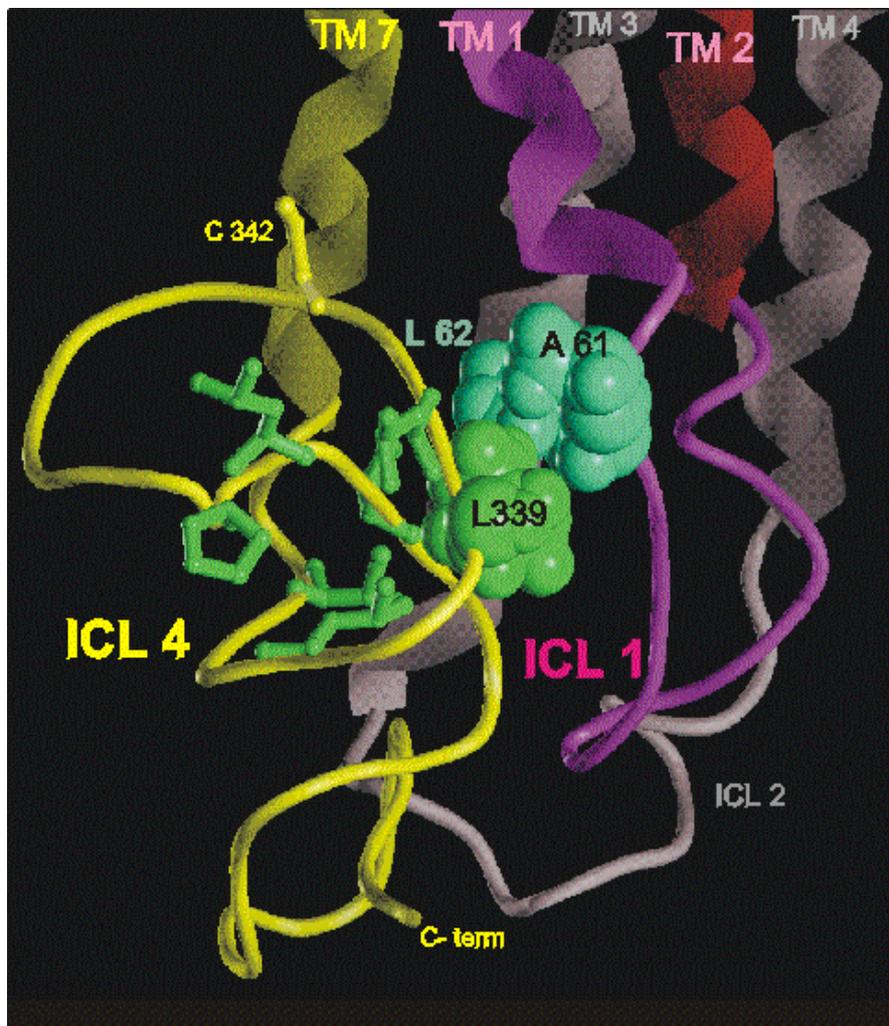
Um das Strukturmodell zu verfeinern, wurden Aminosäuresequenzen des IZS4 mit Peptidsequenzen bekannter Konformation aus der PDB 3D-Datenbank verglichen. Es wurden zwei identische Sequenzen gefunden: Für <sup>329</sup>SSSVSS<sup>334</sup> wurde eine identische Sequenz in zwei Immunoglobulinstrukturen (S26 bis S31; PDB-ID: 1FIG und 2FBJ) gefunden. Für den benachbarten Bereich <sup>336</sup>LRSLL<sup>340</sup> wurde eine identische Sequenz im Lysozym gefunden (L103 bis L107, PDB-ID: 1LBA). Die verknüpften Konformationen der Fragmente ergaben die gleiche U-förmige Struktur, wie die aus dem Modell vorhergesagte (rot und blau markierte Linien in Abb. 21). Diese Ergebnisse unterstützen damit zusätzlich das Modell des C-Terminus.



**Abb. 21: NMR-Struktur des C-Terminus des Rhodopsins (links) und 3D-Strukturmodell des C-Terminus des V2-Rezeptors (rechts).** Die IZS4 (zwischen der TMD7 und den palmitoylierten Cysteinen) des Rhodopsins bildet eine U-förmige Schleife und wird von einem hydrophoben Kern stabilisiert (grüne Reste). Die palmitoylierten Reste sind in gelb dargestellt. Das Modell wurde mit Hilfe von Proteinfragmenten identischer Sequenzen aus der PDB 3D-Datenbank (rote und blaue Bereiche) verfeinert. Der hydrophobe Kern im C-Terminus des V2-Rezeptors wird von den Resten V332, L336 und L340 gebildet. L339 ragt aus dem hydrophoben Kern heraus und geht eine Wechselwirkung mit IZS1 ein (s. Abb. 22). Der untere Teil der Abbildung zeigt die hohe Sequenzhomologie der beiden C-Termini.

Die IZS4 des Rhodopsins wird primär durch einen hydrophoben Kern aus fünf Resten stabilisiert. Aus dem V2-Rezeptor Strukturmodell läßt sich ein ähnlicher hydrophober Kern ableiten, der vorwiegend von V332, L336 und L340 des Glutamat/Dileucinmotivs gebildet wird. Die Reste P349, L351 und P353 könnten auch zu diesem hydrophoben Kern beitragen. Wahrscheinlich stabilisiert E335 des Glutamat/Dileucinmotivs ebenfalls die U-förmige Struktur, in dem es eine Salzbrücke zu dem benachbarten R337 bildet. Eine alternative Salzbrücke wäre auch zwischen E335 und R346 denkbar.

Im vollständigen Rezeptor-Modell ist L339 des Glutamat/Dileucinmotivs nicht an der Stabilisierung der U-förmigen Struktur des IZS4 beteiligt. Dieser Rest könnte stattdessen eine hydrophobe Wechselwirkung mit L62 der IZS1 und möglicherweise auch mit dem benachbarten A61 eingehen (s. Abb. 22). Nach diesem Modell wäre L339 also für eine Interaktion von IZS4 und IZS1 und damit für die Faltung des gesamten Rezeptormoleküls wichtig. L339 könnte damit eine Schlüsselfunktion für die Etablierung einer transportkompetenten Faltung haben. Die durch einen hydrophoben Kern stabilisierte, U-förmige Schleife würde indirekt zur Etablierung einer transportkompetenten Faltung beitragen, indem sie für eine korrekte räumliche Positionierung von L339 sorgt.



**Abb. 22: Details des Strukturmodells des V2-Rezeptors.** Das Bild zeigt die mögliche Interaktion zwischen dem C-Terminus und der IZS1. Es sind nur die TMD, der C-Terminus (gelb), IZS1 (lila) und IZS2 (blau) dargestellt. Die IZS4 bildet eine U-förmige Schleife, die durch hydrophobe Reste (grün) stabilisiert wird. L339 ragt aus dem hydrophoben Kern heraus und geht eine hydrophobe Wechselwirkung mit L62 und A61 (blaugrün) der IZS1 ein.

Die Idee, dass ein hydrophober Kern die U-förmige Struktur von IZS4 stabilisieren und dadurch eine Interaktion zwischen L339 (IZS4) und L62 (IZS1) vermitteln könnte, wurde auch durch einen Homologievergleich der C-Termini der GPCR-Familie unterstützt (BLAST- und bioinformatische Analyse) (s. Abb. 23). Es wurden über 70 Rezeptoren mit äquivalenten, hydrophoben Sequenzmotiven (hxxxhxxhh; entsprechend den Resten V332, L336, L339 und L340 beim V2-Rezeptor) im N-terminalen Bereich des C-Terminus erhalten. Bei all diesen GPCR wurden auch in IZS1 konservierte, hydrophobe Aminosäuren gefunden, die eine ähnliche Funktion wie L62 und A61 im V2-Rezeptor haben könnten.

	TMD1	IZS1	TMD2	TMD7	IZS4	C-TERM.
					hxxxhxxhh	
V2A	NGLVLAALARRGRRGRWAPIHVFIGHLCLAD			NPWITYASFSSSVSSDRLRSLICCA RGR		
V2_pig	NGLVLCALVRRGRRGRWAPMHVFIGHLCLAD			NPWITYASFSSSISSDRLRSLICCP RRR		
V2_BOV	NGLVLCALVRRGRRGRWAPMHVFIGHLCLAD			NPWITYASFSSSISSDRLRSLICCT WRR		
B1ADR	NVLVIVATAKT PRLQT . . LTNLFIMS LAS AD			NPIITYCRSPDFRKAQQLICCA RRA		
B3ADR	NLLVIVATAKT PRLQT . . MTNWFVTS LAA AD			NPLIYCRSPDFRSEFRLICRC GRR		
A1ADR	NLLVILSVA CNRHLQT . . VTNFYIWN LAV AD			NPLIYPCSSPFRKRFELIRCO QRR		
A2bADR	NALVILAVLTSRSLRA . . PQNLFLVS LAA AD			NPVIYTFMQDFRRRFRIRICRP .WT		
A2ciiADR	NVLVIVAVLTSRALRA . . PQNLFLVS LAS AD			NPVIYTVFMQDFRRSEKHLIFRR RRR		
H1	NLLVLYAVRSEKRLHT . . VGNLYIVS LSV AD			NPLIYPLCNEMFRKTRKELIHR . . .		
D1	NTLVCAAVLRFPHLRS . . KVNFFVIS LAV SD			NPIIYA.FMADFRRRSTLIGCR LCP		
ADORA2a	NVLVCAAVLNSNLQN . . VTNFYVVS LAA AD			NPFITYAIRERFRQIRFIRSH VLR		
SHT1e	NLAVIMATCTTKLHQ . . PANYLICS LAV TD			NPLIYTSFMEDFRKLRKELICR EHT		
SHT1	NSLVIAATVTRKLLH . . PANYLICS LAV TD			NPLIYTFMEDFRKRFQELVRCR C~~		
SHT7	NCLVVISVCFVKKLRQ . . PSNYLIVS LAL AD			NPFITYAFMRELRITTYRSLICQ YRN		
SHT1c	NLLVIMAVSMEKRLHN . . ATNYFLMS LAI AD			NPLVYTLFMRKYRRRFSNYRON YKV		
D2	NVLVCAAVSREKALQT . . TTNLYLVS LAV AD			NPIIYTFMIEFRKLRKELIHR~~ ~~~		
MC5	NLLVIGAVIKRNKLS . . PHYFFVCS LAV AD			DPLIYAFRSQEMRKRKELICR GFR		
MC	NLLVILAVVRCNLHS . . PHYFFLCS LAV AD			DPLIYAFRSLELRNTRERLICG NCM		
SST1	NSMVIYVILRYAKMKT . . ATNIYILN LAI AD			NPILYGLSDMFRKRFQELICLS WMD		
SST2	NTLVIIYVILRYAKMKT . . ITNIIYILN LAI AD			NPILYAF LSDMFRKRFQELICLV KVS		
SST3	NSLVIIYVILRYAKMKT . . VTNIIYILN LAI AD			NPILYGLSYRFRKRFQELVLRP SRR		
SST4 RAT	NALVIFVILRYAKMKT . . ATNIYILN LAV AD			NPILYGLSDMFRKRFQELICLR CCL		
SST5	NTLVIIYVILRYAKMKT . . VTNIIYILN LAV AD			NPVLYGLSDMFRKRFQELICLR KGC		
LHHC	NMTVLFVILTSRYKLT . . VPRFLMCNLS FAD			NPFLYAFITRTFQRDFILISKF GCC		
FSH	NILVILVILTSRYKLT . . VPRFLMCNLS FAD			NPFLYAFITRTFQRDFILISKF GCY		
TSH	NVFLVILVILTSRYKLT . . VPRFLMCNLS FAD			NPFLYAFITRTFQRDFILISKF GIC		
US28(CMV)	NFLVIFTITWRRIQC . . SCDVYFINLAA AD			NPLIYVFGTRFRQELHCLIAEF RQR		
GPCRA	NGLVVLTYIYFKRLKT . . HTDYLLN LAV AD			NPFLYAFICVFRFRNDFRLEKDL GCL		
NPY1a	NLAIIIIILKQKEMRN . . VTNLLIWNLS F SD			NPIFYCF LMKRFQDQLQRENFCD FR		
D5	NVLVCAAVRSEPHLRA . . MNVFIIVS LAV SD			NPVIYA.FMADFQRKQACLICFC FS		
SHT1da	NALVLTITLTKLHT . . PANYLICS LAT TD			NPIIYTVFNEEFRRQRFQELVPCR KAS		
EDG1	NIFVLLTIKTKKFRH . . PHYFFICN LAL SD			NPIIYTLTKEMRRRFRIFIRSCC KCP		
H2	NVFWCLAVCLNRRLRN . . LTNCFIVS LAI TD			NPIIYALNMFRTCYQLICCR LAN		
CckK1	NILVVLVLYQYKRLKN . . MTSTYLLN LAI SD			NPVIYAFVGERFRKYLRLHRR VAV		
AT1a	NSLVIIYVILRYAKMKT . . VASVFLN LAL AD			NPLFYCF LKRFKRFQELIKIY PPK		
IL8a	NSLVMLVILYSRGRS . . VTDVYLLN LAL AD			NPIIYAFICQFRFRKRFELIAMH GLV		
THR	NIMAVVFLIKMKVKK . . PAVVYMLHLAT AD			DPLIYFASSECQVWYS LICCK ESS		
HM1 (mACh)	NLLVLSIFKVNTELKT . . VNNYFLLS LAC AD			NPMCYALCNKFRFRDTRILILCR WD		
HM2 (mACh)	NLLVMVSIKVNRLQT . . VNNYFLFS LAC AD			NPACYALCNATFRKTRKELIMCH YKN		
HM3 (mACh)	NLLVMSIKVNRLQT . . VNNYFLFS LAC AD			NPACYALCNATFRKTRKELILCQ YRN		
HM5 (mACh)	NVLVMSIFKVNSQLKT . . VNNYFLLS LAC AD			NPICYALCNATFRKTRKELILCR WFK		
HM4 (mACh)	NILVIVSRKVNRLQT . . VNNYFLLS LAC AD			NPVCYALCNATFRKTRKELILCQ CDK		

**Abb. 23: Identifizierung von potentiellen hydrophoben Faltungsmotiven in den C-Termini und IZS1 von GPCR.** Die Daten wurden aus der SWISS-PROT- und EMBL-Datenbank entnommen. Die IZS1 und IZS4 Sequenzen wurden mit Hilfe des Wisconsin Programm angeglichen. Hervorgehoben sind von links nach rechts: 1.) Der hoch konservierte Asparaginrest von TMD1; 2.) zwei hydrophobe Reste in IZS1, wobei die Hydrophobizität des zweiten Restes höher konserviert ist; 3.) der hoch konservierte Asparaginrest in TMD2; 4.) das hoch konservierte NPXXY Motiv welches, das Ende der TMD7 anzeigt; 5.) das hydrophobe hxxxhxxhh Faltungsmotiv im C-Terminus, das beim V2-Rezeptor von den Resten V332, L336 und dem Dileucinmotiv L339/340 gebildet wird; 6.) die potentiell palmitoylierten Cysteinreste in den C-Termini. Potentiell interagierende Reste zwischen den C-Termini und IZS1 sind mit einem Stern markiert. Die Abkürzungen wurden von der SWISS-PROT- und EMBL-Datenbank direkt übernommen. V2A, V2-Arginin-Vasopressin-Rezeptor; V2\_pig, V2-Vasopressin-Rezeptor des Schweins; V2\_BOV, V2-Vasopressin-Rezeptor des Rindes; B1ADR,  $\beta_1$ -adrenerger Rezeptor; B3ADR,  $\beta_3$ -adrenerger Rezeptor; A1ADR,  $\alpha_1$ -adrenerger Rezeptor; A2bADR,  $\alpha_{2b}$ -adrenerger Rezeptor; A2ciiADR,  $\alpha_{2CII}$ -adrenerger Rezeptor; H1, Histamin-Rezeptor des Typ 1; D1, Dopamin-Rezeptor Typ 1; ADORA2a, Adenosin-Rezeptor Typ 2a; SHT1e, Serotonin-Rezeptor Typ 1e; SHT1, Serotonin-Rezeptor Typ 1; SHT7, Serotonin-Rezeptor Typ 7; SHT1c, Serotonin-Rezeptor Typ 1c; D2, Dopamin-Rezeptor Typ 2; 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; LHHC, 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 Typ 1a; D5, Dopamin-Rezeptor Typ 5; SHT1da, Serotonin-Rezeptor Typ 1da; EDG1, G-Protein-gekoppelter Rezeptor Typ 1 der Epithelzelle; H2, Histamin-Rezeptor des Typ 2; CckK1, C-C Chemokin-Rezeptor Typ 1; AT1a, vaskulärer Typ 1 Angiotensin II-Rezeptor; IL8a, Interleukin-8-Rezeptor; THR, Thrombin-Prorezeptor; HM1(mACh), muskarinerges Acetylcholin-Rezeptor HM1; HM2(mACh), muskarinerges Acetylcholin-Rezeptor HM2; HM3(mACh), muskarinerges Acetylcholin-Rezeptor HM3; HM5(mACh), muskarinerges Acetylcholin-Rezeptor HM5; HM4(mACh), muskarinerges Acetylcholin-Rezeptor HM4.

## 4.6 Gerichtete Mutagenesen zur Überprüfung des Strukturmodells

Bei Patienten mit NDI wurden interessanterweise auch Mutationen in der IZS1-Region gefunden, die mit dem C-Terminus interagieren könnten, so z.B. die Punktmutation L62P (KNOERS et al., 1994) und die  $\Delta$ L62-R64-Mutation (BICHET et al., 1994), die zur Deletion von drei Resten führt. Auch wenn der NDI-Phänotyp impliziert, dass die mutierten Rezeptoren nicht funktionell sind, war deren genauer Defekt nicht bekannt. Nach dem Strukturmodell für den V2-Rezeptor sollten auch hier transportdefekte Rezeptoren resultieren, die im ER retiniert werden. Um dies zu überprüfen, wurden die Mutationen in den unmarkierten und in den GFP-markierten V2-Rezeptor eingeführt.

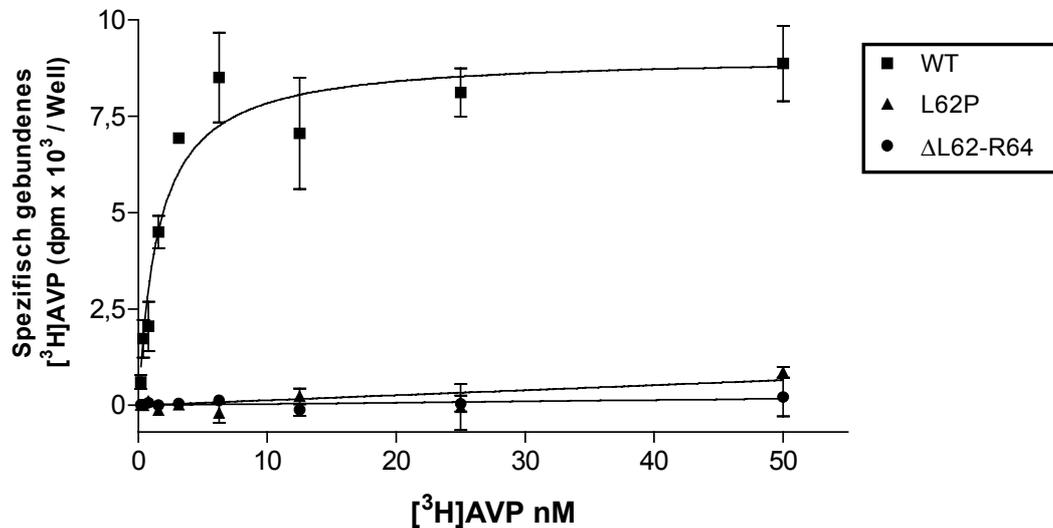
### 4.6.1 Einführung der Mutationen L62P und $\Delta$ L62-R64

Die Mutation L62P wurde in die Plasmide pRCDN2 und pEU367.GFP mit Hilfe des QuikChange™ Mutagenesis System direkt eingeführt (s. 3.2.11). Die benutzten Oligonukleotide waren PL62P 3' und PL62P 5' (s. 3.1.4.3). Es entstanden folgende Plasmide: pRCDN2.L62P und pEU367.L62P.GFP. Alle Mutationen wurden durch Sequenzierungen bestätigt (s. 3.2.12). Für die Mutation  $\Delta$ L62-R64 wurden die selben Ausgangsplasmide und das gleiche Mutageneseverfahren benutzt. Die verwendeten Oligonukleotide waren PAL62-R64 3' und PAL62-R64 5' (s. 3.1.4.3). Es entstanden die Plasmide: pRCDN2. $\Delta$ L62-R64 und pEU367. $\Delta$ L62-R64.GFP. Auch hier wurden alle Mutationen durch Sequenzierung bestätigt (s. 3.2.12).

### 4.6.2 Pharmakologische Charakterisierung der mutierten Rezeptoren L62P und $\Delta$ L62-R64

Die funktionelle Charakterisierung der mutierten Rezeptoren erfolgte mit Hilfe von [<sup>3</sup>H]AVP-Bindungsstudien an intakten, transient transfizierten HEK293-Zellen (s. 3.2.13) ( $K_D$ - und  $B_{MAX}$ -Bestimmung, s. Abb. 24) und durch Adenylylzyklase-

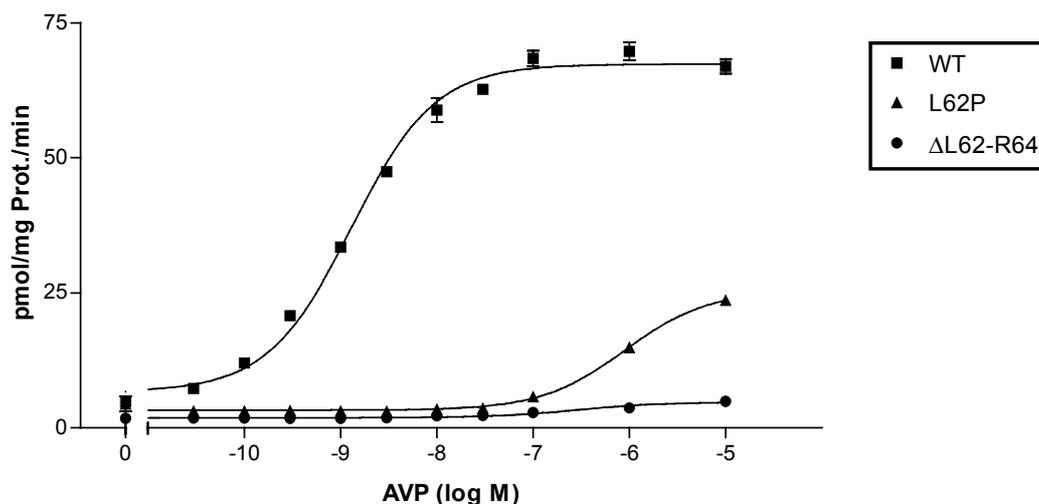
Versuche mit Gesamtmembranen (s. 3.2.17.1.2.1 und 3.2.18) ( $EC_{50}$ -Bestimmung, s. Abb. 25). Als Kontrolle diente jeweils der wildtypische V2-Rezeptor.



**Abb. 24: Spezifische Bindung von [<sup>3</sup>H]AVP an transient transfizierte HEK293-Zellen.** Einzelne Punkte stellen Mittelwerte und Standardabweichungen dar (n=3). Für den wildtypischen Rezeptor wurden  $K_D$  und  $B_{MAX}$  mit Hilfe des GraphPad Prism® Programms (Version 3.00) berechnet. Für die mutierten Rezeptoren konnte keine  $K_D$  und  $B_{MAX}$  berechnet werden.

Für beide mutierten Rezeptoren konnten keine spezifischen [<sup>3</sup>H]AVP Bindungsstellen nachgewiesen werden. Für den wildtypischen Rezeptor wurde eine Bindungskurve erhalten, die mit früheren Daten übereinstimmt ( $K_D$  von  $1,56 \pm 0,40$  nM und eine  $B_{MAX}$  von  $393,30 \pm 30,1$  fmol/mg Protein) (OKSCHE et al., 1998).

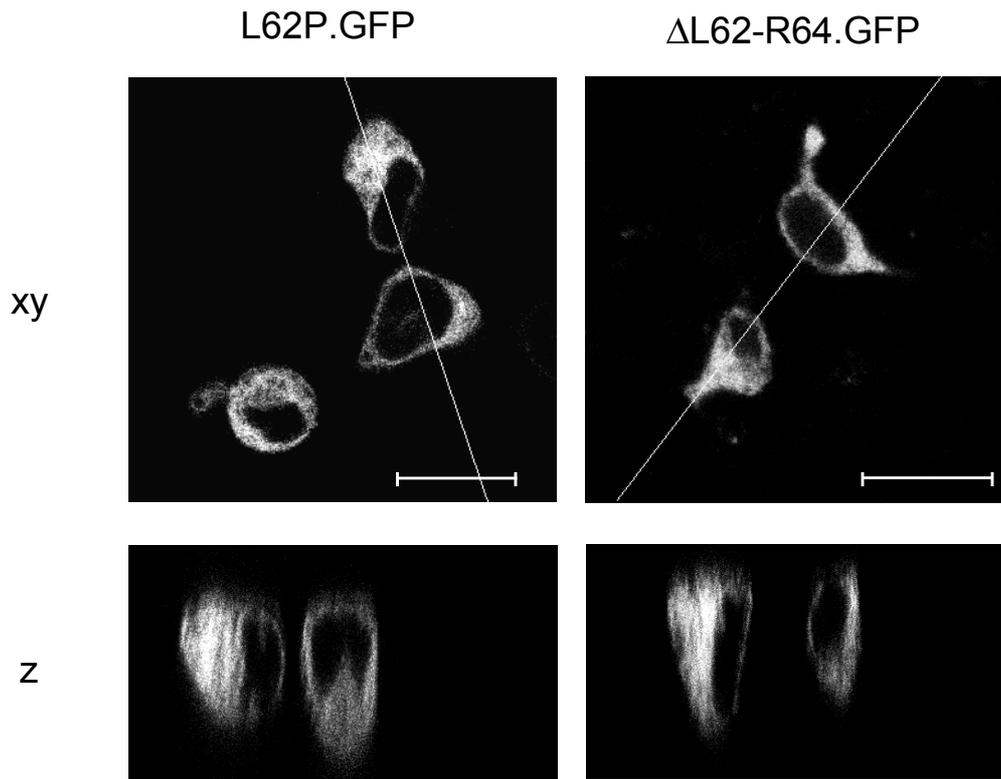
Für den mutierten Rezeptor  $\Delta L62-R64$  konnte auch keine Stimulierung der Adenylylzyklase nachgewiesen werden. Für den mutierten Rezeptor L62P war hier eine Restaktivität vorhanden. Diese war aber so gering, dass selbst mit 10  $\mu M$  AVP keine Sättigung erreichbar war. Die Angabe einer  $EC_{50}$  war deshalb nicht möglich. Der berechnete  $EC_{50}$ -Wert stimmte für den wildtypischen Rezeptor mit früheren Ergebnissen überein ( $1,29 \pm 0,18$  nM) (OKSCHE et al., 1998). Zusammengefaßt ergab die pharmakologische Charakterisierung, dass beide mutierten Rezeptoren nicht mehr funktionell waren.



**Abb. 25: Aktivierung der Adenylylzyklase in isolierten Membranen von transient transfizierten HEK293-Zellen.** Einzelne Punkte stellen Mittelwerte und Standardabweichungen dar (n=3). Für den wildtypischen Rezeptor wurde die Dosis-Wirkungskurve und der  $EC_{50}$ -Wert mit Hilfe des GraphPad Prism<sup>®</sup> Programm (Version 3.00) berechnet. Für die mutierten Rezeptoren konnten keine  $EC_{50}$ -Werte berechnet werden.

#### 4.6.3 Lokalisation der GFP-markierten Rezeptor-Mutanten in HEK293-Zellen

Sollten die Funktionsdefekte der Rezeptor-Mutanten L62P.GFP und  $\Delta$ L62-R64.GFP tatsächlich durch Faltungsdefekte verursacht werden, dann mussten die Rezeptoren, wie die entsprechenden Glutamat/Dileucinmotiv-Mutanten auch, im ER retiniert werden. Um dies zu überprüfen, wurde die Lokalisation der GFP-markierten Rezeptoren in transient transfizierten HEK293-Zellen (s. 3.2.13) mit Hilfe des LSM untersucht (s. 3.2.20). Für beide Rezeptor-Mutanten wurde eine diffuse GFP-Fluoreszenz detektiert, die das Zellinnere, mit Ausnahme des Zellkerns, ausfüllte (s. Abb. 26). Es konnte keine Überlappung dieser GFP-Fluoreszenzsignale mit den Plasmamembran-Marker Trypanblau gefunden werden (Daten werden nicht gezeigt), was eine ausschließlich intrazelluläre Lokalisation beider Mutanten zeigt.

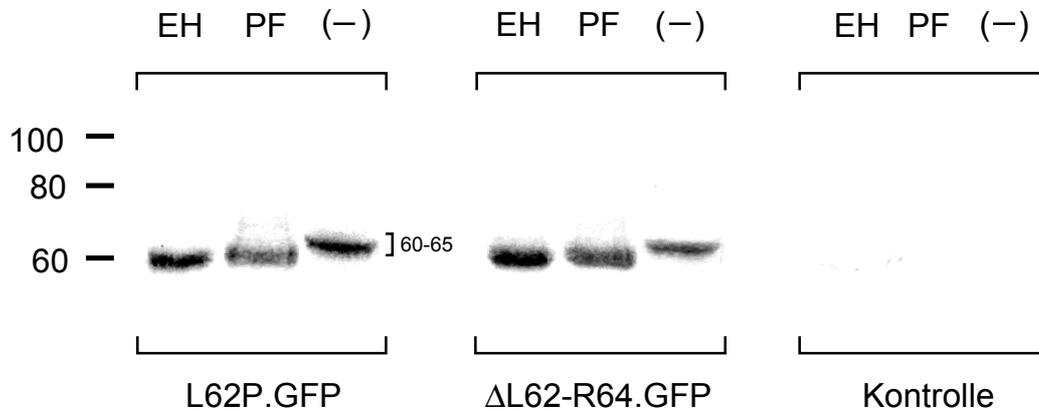


**Abb. 26: Lokalisierung von GFP-markierten V2-Rezeptor-Mutanten in transient transfizierten HEK293-Zellen.** Die GFP-Fluoreszenzsignale wurden mit Hilfe eines LSM aufgenommen. Die Bilder zeigen x/y-Scans (xy) und z-Scans (z) an den angegebenen Linien. Maßstab: 25  $\mu\text{m}$ .

#### 4.6.4 Analyse des Glykosylierungsstatus der GFP-markierten V2-Rezeptor-Mutanten

Um zu bestimmen, in welchem intrazellulären Membranenkompartiment die beiden mutierten Rezeptoren retiniert werden, wurde deren Glykosylierungsstatus untersucht (s. 3.2.15). Bei beiden mutierten Rezeptoren konnten im Western-Blot (s. 3.2.16) nur die mannosereich-glykosylierten 60-65 kDa-Formen nachgewiesen werden. Diese Banden waren *EndoH* und *PNGaseF* sensitiv und konnten, durch beide Enzyme, auf das Niveau der unmodifizierten 60 kDa Bande reduziert werden (s. Abb. 27). Diese Daten zeigen, dass sowohl die L62P als auch die  $\Delta\text{L62-R64}$  Mutanten im ER retiniert

und nicht zur Plasmamembran transportiert werden. Diese Daten stehen in Einklang mit der Vorstellung, dass IZS4 und IZS1 miteinander interagieren.



**Abb. 27: Analyse des Glykosylierungsstatus der mutierten Rezeptoren L62P.GFP und ΔL62-R64.GFP.** Der Immunoblot wurde mit Gesamtmembranen von transient transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt, die die GFP-markierten NDI-Mutanten (L62P.GFP und ΔL62-R64.GFP) exprimierten. Die Membranen (50 µg Protein) wurden mit *EndoH* (EH) oder *PNGaseF* (PF) verdaut oder blieben unbehandelt (-). Die immunoreaktiven Proteine wurden mit polyklonalem anti-GFP-Antiserum und [<sup>125</sup>I]-markiertem anti-Kaninchen IgG detektiert und autoradiographisch sichtbar gemacht. Als Kontrolle dienten nicht-transfizierte HEK293-Zellen.

## 5 Diskussion

Auf zwei Leucinresten basierende Sortierungssignale (Dileucinmotive) wurden bei mehreren nicht verwandten Membranproteinen beschrieben (JOHNSON UND KORNFELD, 1992; LETOURNEUR UND KLAUSNER, 1992; VALDENNAIRE et al., 1999). Funktionell sind bis heute zwei Typen bekannt: die konstitutiv aktiven Dileucinmotive und die durch Phosphorylierung von umgebenden Serinen und Threoninen aktivierbaren Motive (GEISLER et al., 1998). Dileucinmotive werden häufig von einem N-terminalen Glutamat- oder Aspartatrest begleitet (POND et al., 1995; DIETRICH et al., 1997; GEISLER et al., 1998; NAKAMURA UND ASCOLI, 1999). Die Motive findet man immer in der cytoplasmatischen Domäne eines membranständigen Proteins und mindestens 5-7 Aminosäuren von der TMD entfernt. Bisher wurden für Dileucinmotive folgende Funktionen belegt: 1.) Konstitutiv aktive Sortierung von Membranproteinen im TGN in Transportvesikel zu Endosomen, Lysosomen (JOHNSON UND KORNFELD, 1992; LETOURNEUR UND KLAUSNER, 1992; CALVO et al., 1999; GEISLER et al., 1998) oder zur basolateralen Plasmamembran von polarisierten Epithelzellen (HUNZIKER UND FUMEY, 1994; SHEIKH UND ISACKE, 1996), 2.) phosphorylierungsabhängige Sortierung von Membranproteinen in endocytotische Vesikel der Plasmamembran (LETOURNEUR UND KLAUSNER, 1992; GABILONDO et al., 1998; VINCENT et al., 1997; STEFANER et al., 1999).

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse für die <sup>335</sup>ELRSLL<sup>340</sup>-Sequenz des vollständigen V2-Rezeptors zeigen klar, dass dieses Motiv hier eine andere Funktion hat. Der Austausch von E335 durch Glutamin und L339 durch Threonin führte zu transportdefekten Rezeptoren, die im ER retiniert wurden. Bei der L340T-Mutante war der Transport zur Zelloberfläche deutlich vermindert (s. Abb. 5, 7 und 11). Diese Befunde zeigen, dass das Glutamat/Dileucinmotiv des V2-Rezeptors für den Transport vom ER zu Golgi-Apparat essentiell ist. Für diese Funktion ist offensichtlich die Hydrophobizität der Reste L339 und L340 ausschlaggebend und

nicht die strukturellen Eigenschaften der Leucine selbst. Ein konservierter Austausch von L339 und/oder L340 gegen ebenfalls hydrophobes Isoleucin zeigte keine Veränderung des Rezeptortransports (s. Abb. 5).

Eine mögliche Interpretation der Daten wäre, dass das Motiv des V2-Rezeptors als lineares Transportsignal das Einsortieren von ER-zu-Golgi-Vesikel steuern könnte. In diesem Fall wäre nach dem TGN und der Plasmamembran dann ein drittes Membrankompartiment identifiziert, in dem Dileucinmotive Sortierungsfunktionen haben können. Für die Funktion als Transportsignal sprach die Lage des Motivs in der Nähe der TMD und die zahlreichen benachbarten Serine als potentielle Phosphorylierungsstellen. Ferner konnte kürzlich gezeigt werden, dass ein hydrophobes Motiv bestehend aus zwei Phenylalaninresten tatsächlich als ER-zu-Golgi-Transportsignal funktionieren kann, in dem es die Coatomer  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\zeta$ -Untereinheiten bindet (FIEDLER et al., 1996). Wenn die beiden hydrophoben Leucine des V2-Rezeptors das Phenylalaninpaar ersetzen könnten, wäre es durchaus denkbar, dass dieser Bereich des V2-Rezeptors auch eine ähnliche Funktion erfüllen könnte.

Die zweite Interpretation der Ergebnisse ist, dass das Glutamat/Dileucinmotiv ein strukturbildendes Motiv darstellt, welches eine transportkompetente Faltung des ganzen Rezeptors vermittelt. Durch die Zerstörung des Glutamat/Dileucinmotivs würde eine falsche Faltung des Rezeptors resultieren, die vom Qualitätskontrollsystem des ER (HURTLEY UND HELENIUS, 1989; HAMMOND UND HELENIUS, 1995; ZHANG et al., 1997) erkannt wird und zur Retention des Rezeptors führt. Diese zweite Möglichkeit wurde durch eine Reihe von experimentellen Daten aus dieser Arbeit unterstützt.

Für alle im ER retinierten Mutanten (E335Q, L339T und L339/340T) konnte keine spezifische [ $^3$ H]AVP Bindung an Gesamtmembranen gemessen werden (s. Abb. 8). Die retinierten Rezeptoren waren nicht mehr funktionell, was in Einklang mit einem Faltungsdefekt steht. Obwohl die Funktionalität anderer GPCR in intrazellulären Kompartimenten gezeigt werden konnte (NAKAMURA UND ASCOLI, 1999; BRAILOIU et al., 1999), ist aber nicht klar, ob dies auch für den V2-Rezeptor auf der Stufe des ER gilt. Es ist daher noch nicht auszuschließen, dass ein Reifungsprozess

während des intrazellulären Transports stattfindet, der dem V2-Rezeptor seine Bindungseigenschaften erteilt.

Um beide möglichen Interpretationen, lineares Transportsignal vs. Faltungsmotiv, voneinander unterscheiden zu können, wurde für den intrazellulären C-Terminus ein System entwickelt, das Transportstudien unabhängig von der Gesamtzeptorfaltung erlaubt. Hierfür wurde der Bereich TMD2-TMD7 des V2-Rezeptors komplett deletiert, d.h. der C-Terminus wurde mit der IZS1 fusioniert (s. Abb. 14). Wenn das Glutamat/Dileucinmotiv ein lineares Transportsignal darstellt, hätte die Einführung der Glutamat/Dileucinmutationen (E335Q, L339T, L340T und L339/340T) auch bei diesen Rezeptorfragmenten zu einem transportdefekten Phänotyp führen müssen. Wenn das Glutamat/Dileucinmotiv aber für eine transportkompetente Faltung des V2-Rezeptors nötig sein sollte, dann hätten die Rezeptorfragmente transportkompetent bleiben müssen.

Alle mutierten V2-Rezeptorfragmente (71.E335Q.GFP, 71.L339T.GFP, 71.L340T.GFP und 71.L339/340T.GFP) konnten in transient transfizierten HEK293-Zellen an der Zelloberfläche detektiert werden (s. Abb. 19 A). Dieses Ergebnis wurde auch durch den Glykosylierungsstatus der Rezeptorfragmente bestätigt (s. Abb. 20 A). Diese Daten unterstützen daher ebenfalls die Interpretation, dass das Glutamat/Dileucinmotiv des V2-Rezeptors kein lineares ER zu Golgi-Transportsignal darstellt. Die Daten zeigen vielmehr, dass die Aminosäurereste E335, L339 und L340 sehr wahrscheinlich zu einem Motiv gehören, das eine transportkompetente Faltung des intakten Rezeptors erlaubt. Mutierte, fehlgefaltete Rezeptoren könnten demnach vom Qualitätskontrollsystem erkannt und im ER retiniert werden. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den negativen Ergebnissen der Bindungsstudien mit Gesamtmembranen (s. 4.2.3, s. Abb. 7).

Auch das berechnete Strukturmodell des V2-Rezeptors steht in Einklang mit der Hypothese, dass es sich bei dem Glutamat/Dileucinmotiv um ein Faltungsmotiv handelt. Das Strukturmodell des V2-Rezeptors sagt voraus, dass das Motiv Teil einer U-förmigen Schleife im intrazellulären C-Terminus ist (s. Abb. 21). Die einzelnen Aminosäuren des Motivs scheinen dabei aber verschiedene Funktionen zu haben:

L339 geht demnach mit der Aminosäure L62 und/oder A61 der IZS1 eine hydrophobe Wechselwirkung ein und verbindet Rezeptorregionen, die in der Primärsequenz weit von einander entfernt sind. Die Zerstörung dieser Wechselwirkung, durch die Mutation von L339, könnte daher zu einer Auffaltung des gesamten Rezeptormoleküls führen und den transportdefekten Phänotyp erklären. Nach diesem Modell wäre in dieser Region L339 der entscheidende Rest für die Etablierung eines transportkompetenten Faltungszustands des Rezeptors.

Im Gegensatz zu L339 sagt das Strukturmodell für L340 nur lokale hydrophobe Interaktionen voraus. Es stabilisiert die U-förmige Schleife des intrazellulären C-Terminus, indem es die hydrophobe Kernregion verstärkt. L340 würde damit nur eine indirekte Rolle bei der Interaktion von IZS4 und IZS1 spielen, indem es durch eine Stabilisierung der hydrophoben Kernregion die Voraussetzung dafür schafft, dass L339 richtig im Raum ausgerichtet wird.

Die aus dem Strukturmodell abgeleiteten Funktionen von L339 und L340 sowie die Hypothese, dass eine Fehlfaltung des V2-Rezeptors aufgrund fehlender hydrophober Wechselwirkungen Hauptursache für den gestörten Oberflächentransport der entsprechenden Mutanten ist, werden auch durch die Bindungseigenschaften der Dileucinmutanten an intakten COS.M6-Zellen unterstützt. Ein konservativer Austausch von einem Leucin oder beiden Leucinen durch ebenfalls hydrophobe(s) Isoleucin(e) wird in diesem Bereich toleriert, ein Threoninaustausch dagegen nicht. Nicht die Leucinreste selbst sind also für die Faltung entscheidend, sondern, in Übereinstimmung mit dem berechneten 3D-Strukturmodell, deren Hydrophobizität.

Das Modell wird auch dadurch unterstützt, dass nur die Substitution von L339 durch Threonin bzw. Alanin zu einem kompletten Verlust des Oberflächentransports (bzw. zur ER-Retention) führt und dass die Threonin- oder Alaninsubstitution bei L340 nur eine Verminderung des Oberflächentransport hervorruft. Eine Mutation von L339 würde die Faltung des Rezeptors entscheidend beeinflussen, da die Interaktion zwischen IZS4 und IZS1 direkt aufgehoben wäre. Im Gegensatz dazu wäre bei der L340T-Mutante nur eine von mehreren der hydrophoben, stabilisierenden Reste mutiert. V332 und L336 könnten die U-förmige Schleife auch ohne L340 noch in

einer annähernd richtigen Konformation halten. Dadurch könnte nur eine partielle Beeinträchtigung der Funktion dieses Bereiches und somit auch nur ein verminderter Oberflächentransport resultieren.

Aminosäure E335 bildet nach dem Strukturmodell eine Salzbrücke mit dem benachbarten Rest R337 und scheint so ebenfalls indirekt die korrekte Ausrichtung von L339 durch die Stabilisierung der U-förmigen Schleife zu stabilisieren. In Übereinstimmung mit dieser Vorstellung hat auch Aminosäure R337 einen starken Einfluß auf den Oberflächentransport des V2-Rezeptors (OKSCHE et al., 1998). Durch die Lokalisation von E335 im zentralen Bereich der U-förmigen Schleife kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich auch eine alternative Salzbrücke mit R346 bildet. In beiden Fällen wäre E335 aber eine faltungsrelevante Aminosäure, was den Transportdefekt des entsprechend mutierten V2-Rezeptors erklären würde.

Das V2-Rezeptor-Modell erlaubt auch Aussagen über die mögliche Transportrelevanz von anderen, benachbarten Aminosäureresten der IZS4. Die Hydrophobizität der Aminosäuren L336 und V332 sollten, wie die von L340, für die Stabilisierung des hydrophoben Kerns der U-förmigen Schleife wichtig sein. Eine Verringerung der Hydrophobizität dieser Reste, sollte zu einem ähnlich verminderten Transport des vollständigen Rezeptors führen, wie bei der L340T-Mutante. Ein ähnliches Ergebnis könnte man auch für die hydrophoben Aminosäuren P349, L351 und P353 erwarten, wenn sie ebenfalls an der Stabilisierung des hydrophoben Kerns im C-Terminus beteiligt sind. In Übereinstimmung mit diesen Überlegungen ist der Befund, dass eine Trunkierung des V2-Rezeptors an Position P349 (P349X Mutante; OKSCHE et al., 1998) zu einer um 60% verminderten Expression in der Plasmamembran führt.

Die postulierte Interaktion von IZS4 und IZS1 wird auch durch Untersuchungen von NDI-verursachenden Mutationen des V2-Rezeptors unterstützt. In zwei betroffenen Familien sind die zur Krankheit führenden Mutationen genau in der Region von IZS1 lokalisiert, in der L339 seinen potentiellen Bindungspartner hat: Bei einer Rezeptor-Mutante ist L62 durch Prolin ersetzt (L62P Mutante; KNOERS et al., 1994), so dass die Hydrophobizität der entsprechenden Region erniedrigt ist. Bei der zweiten Rezeptor-Mutante ist das Aminosäuretriplett L62, A63 und R64 deletiert ( $\Delta$ L62-R64

Mutante; BICHET et al., 1994) und dadurch die Hydrophobizität noch weiter erniedrigt. Die Analyse des Glykosylierungsstatus und die LSM-Lokalisation beider Mutanten in dieser Arbeit zeigen, dass sie ebenso wie die L339T-Mutante im ER retiniert werden. Diese experimentellen Daten stehen in Einklang mit der postulierten IZS1/IZS4 Interaktion, ein direkter Beweis steht allerdings noch aus.

Der Vergleich verschiedener GPCR-Sequenzen zeigt, dass viele Rezeptoren sowohl im C-Terminus (hxxxhxxhh) als auch in der IZS1 (hh) vergleichbare hydrophobe Motive aufweisen (s. Abb. 23). Einige Rezeptoren haben unmittelbar vor dem Dileucinmotiv zusätzlich noch eine negativ geladene Aminosäure (E oder D). Der Luteotropin/Choriogonadotropin-Rezeptor der Ratte (rLH) hat im C-Terminus zwei Dileucinmotive und einen N-terminal liegenden Aspartatrest. Das erste Motiv (L613/L614) reguliert die Internalisierung des Rezeptors negativ. Das zweite Dileucinmotiv (L615/L616) und der N-terminal liegende Aspartatrest haben dagegen, wie beim V2-Rezeptor, eine wesentliche Funktion beim Transport zur Plasmamembran, wobei L615 wichtiger als L616 ist (NAKAMURA UND ASCOLI, 1999). Auch wenn die genaue intrazelluläre Lokalisation der transportdefekten Rezeptoren in dieser Arbeit nicht untersucht wurde, postulieren NAKAMURA und ASCOLI (1999), dass - wie beim V2-Rezeptor - auch hier eine ER-Retention vorliegen könnte. Der rLH-Rezeptor hat in der IZS1 kurz nach der TMD1 auch eine analoge hydrophobe Region (V71/L72). Es ist daher recht wahrscheinlich, dass das Aspartat/Dileucinmotiv des rLH-Rezeptors ähnliche Funktionen wie das des V2-Rezeptors hat.

Wie die faltungsdefekten V2-Rezeptoren im ER zurückgehalten werden und wie eine Interaktion von IZS1 und IZS4 einen transportkompetenten Zustand vermitteln, ist völlig unklar. Eine falsche Faltung könnte zur Komplexbildung mit den ER-Chaperonen Calnexin/Calreticulin und/oder Bip führen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass bei falscher Faltung ein ER-Retentionssignal exponiert wird, welches bei korrekter Faltung nicht zugänglich ist. Ein solches Signal wurde kürzlich für metabolische K<sup>+</sup>-Kanäle (K<sub>ATP</sub>-Kanäle) (ZERANGUE et al., 1999) und für das CFTR-Protein beschrieben (CHANG et al., 1999). In beiden Fällen handelt es sich um ein RXR-Motiv, das höchstwahrscheinlich bei fehlgefalteten (CFTR) oder

unvollständigen ( $K^+$ -Kanäle) Formen exponiert wird und zur Retention führt. Der V2-Rezeptor verfügt in allen cytoplasmatischen Domänen über ähnliche Motive (s. Abb. 2). Eine besonders argininreiche Sequenz befindet sich in der IZS3 ( $^{251}RRRGR^{256}$ ). Es ist somit möglich, dass auch der V2-Rezeptor über derartige Retentionssignale verfügt.

Ein alle Daten einschließendes Modell für das Erreichen eines transportkompetenten Faltungszustands könnte für den V2-Rezeptor wie folgt aussehen: Sobald IZS4 bei der Synthese in der ER-Membran erschienen ist, kann die Bindung von IZS4 und IZS1 erfolgen. Durch diese Interaktion könnten Retentionssignale unzugänglich werden und der Rezeptor somit seinen transportkompetenten Zustand erreichen. Dieses Modell wäre insofern „sinnvoll“, als ein transportkompetenter Zustand erst dann erreicht wird, wenn der größte Teil des Rezeptorproteins synthetisiert ist.

Die Rezeptoren für die oben erwähnten RXR-Retentionsmotive sind noch unbekannt. Für das CFTR-Protein konnte bereits gezeigt werden, dass das Qualitätskontrollsystem des ER überprotektiv sein kann, d.h. dass auch prinzipiell funktionsfähige Proteine zurückgehalten werden ( $\Delta 508$  CFTR-Mutante; CHANG et al., 1999). In diesen Fällen wäre die Hemmung der Interaktion des RXR-Rezeptors mit dem Retentionssignal von erheblichem therapeutischen Interesse. Vorausgesetzt, dass auch beim V2-Rezeptor das ER Qualitätskontrollsystem in einigen Fällen überprotektiv wäre und dass tatsächlich RXR-Retentionsmotive existierten, könnten Hemmstoffe für die RXR-Rezeptor-Chaperoneninteraktion auch für NDI-Patienten mit transportdefekten V2-Rezeptoren therapeutisch relevant sein.

Eine weitere, noch offene Frage ist, in welcher Domäne des V2-Rezeptors sich das Sortierungssignal für den hauptsächlich basolateralen Transport in polarisierten Epithelzellen befindet. Vermutlich existiert ein solches Signal in den intrazellulären Domänen des Rezeptors, da alle bisher bekannten basolateralen Sortierungsmotive (Tyrosin- ( $YXX\Phi$ ) oder Dileucinmotiv) in cytoplasmatischen Sequenzen gefunden werden (KEEFER UND LIMBIRD, 1993; SHEIKE UND ISACKE, 1996; BEAU et al., 1998; DISTEL et al., 1998). Ein mögliches Sortierungssignal stellt die dihydrophobe Sequenz ( $^{157}ML^{158}$ ) in der IZL2 des V2-Rezeptors dar. Eine weitere

Möglichkeit wäre, dass nicht ein definiertes lineares Sortierungssignal, sondern eine komplexe 3D-Struktur den basolateralen Transport steuert. Diese Theorie würde der hier vorgestellten Hypothese eines transportkompetenten Faltungszustands nahekommen, aber die Suche nach basolateralen Sortierungsmotiven erschweren.

Viele dieser Fragen werden mit Sicherheit in den nächsten Jahren beantwortet werden. Die Ergebnisse werden es erlauben, die Biologie und Pathologie des intrazellulären Transports von GPCR besser zu verstehen.

## 6 Zusammenfassung

Bis heute ist wenig über den intrazellulären Transport von G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) bekannt. Frühere Studien an GPCR zeigten, dass Aminosäurereste vor den konservierten, palmitoylierten Cysteinresten in den intrazellulären C-Termini wichtig für den Transport an die Plasmamembran sind. Für den humanen V2-Vasopressin-Rezeptor wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Sequenz <sup>335</sup>EXXXLL<sup>340</sup> unmittelbar vor den palmitoylierten Cysteinen transportrelevant ist. Mittels Deletionen und Punktmutationen wurden verschiedenen V2-Rezeptor-Mutanten hergestellt und in COS.M6-Zellen transient exprimiert. Die Ergebnisse von [<sup>3</sup>H]AVP-Bindungsstudien an intakten COS.M6-Zellen sowie Immunfluoreszenzstudien an permeabilisierten und nicht permeabilisierten COS.M6-Zellen zeigen, dass die Reste E335 und L339 für den Rezeptortransport an die Plasmamembran notwendig sind. Der Rest L340 spielt eine wichtige, aber nicht essentielle Rolle. Mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen des V2-Rezeptors konnte an lebenden, transient transfizierten COS.M6-Zellen gezeigt werden, dass die transportdefekten Mutanten E335Q, L339T und L339/340T im ER retiniert werden und dass das Glutamat/Dileucinmotiv daher für den Transport von ER zu Golgi-Apparat notwendig ist. In Übereinstimmung mit diesen Befunden wurden bei diesen Mutanten keine komplexen Glykosylierungen gefunden. Für diese Ergebnisse sind zwei Interpretationen möglich: 1.) Das Glutamat/Dileucinmotiv könnte ein lineares Transportsignal darstellen, das von spezifischen ER-zu-Golgi-Vesikel-Proteinen erkannt wird. 2.) Es könnte sich um ein Motiv handeln, das für den Rezeptor faltungsrelevant ist und damit das Passieren des Qualitätskontrollsystems des ER ermöglicht. Um beide Möglichkeiten voneinander zu unterscheiden, wurde ein Rezeptorfragment hergestellt, das Transportstudien für den C-Terminus erlaubt, die unabhängig von der Gesamtzeptorfaltung sind. Hierfür wurde der Bereich zwischen TMDII-VII des V2-Rezeptors deletiert und die IZS1 an Position 71 mit dem C-Terminus fusioniert. Die Mutationen des Glutamat/Dileucinmotivs, die am gesamten Rezeptor zu einem Transportdefekt führten, wurden in das verkürzte Konstrukt

eingeführt und in transient transfizierten HEK293-Zellen hinsichtlich ihrer Transporteigenschaften untersucht. Alle mutierten Rezeptorfragmente konnten mittels Laser Scanning Mikroskopie an der Plasmamembran lokalisiert werden. Damit konnte gezeigt werden, dass das Glutamat/Dileucinmotiv kein lineares Transportsignal für ER zu Golgi-Vesikel darstellt. Die Daten zeigen vielmehr, dass das Motiv für eine transportkompetente Faltung des vollständigen Rezeptors notwendig ist. Diese Interpretation wurde auch durch ein 3D-Homologie-Strukturmodell des V2-Rezeptors unterstützt. Das Modell sagt voraus, dass das Motiv Teil einer U-förmigen Schleife im C-Terminus ist. Der Rest L339 könnte für das Zurückfalten des C-Terminus an die IZS1 notwendig sein, in dem er mit L62 eine hydrophobe Wechselwirkung eingeht. Bei Patienten mit nephrogenem *Diabetes insipidus* treten in der entsprechenden IZS1-Region Mutationen auf (L62P und  $\Delta$ L62-R64). Die Eigenschaften der mutierten Rezeptoren wurden in dieser Arbeit ebenfalls charakterisiert. Beide Mutationen führten zu transportdefekten V2-Rezeptoren, die im ER retiniert wurden. Diese Ergebnisse stehen ebenfalls in Übereinstimmung mit der postulierten IZS1/IZS4-Interaktion und dem Strukturmodell. Eine Datenbankanalyse zeigte, dass sowohl das hydrophobe Faltungsmotiv im C-Terminus als auch die entsprechende IZS1-Region in der GPCR-Familie konserviert sind.

## 7 Summary

Little is known concerning the intracellular transport of the G protein-coupled receptors (GPCR). Previous studies suggested a functional role for residues immediately preceding the conserved palmitoylated cysteine residues in the intracellular carboxyl termini of some GPCR in cell surface transport. The significance of a dileucine sequence with an upstream glutamate residue (EXXXLLCC) in mediating cell surface delivery was assessed for the human V2 vasopressin receptor. A series of deletion and point mutants in this region were constructed, and the mutant receptors were expressed in transiently transfected COS.M6 cells. By using [<sup>3</sup>H]arginine-vasopressin binding assays to intact cells and immunofluorescence studies with intact and permeabilised cells, it was shown that residues E335 and L339 are obligatory for receptor transport to the plasma membrane. Residue L340 has a minor but significant influence. Studies with green fluorescent protein-tagged receptors demonstrate that the bulk of the mutant receptors E335Q, L339T and L339/340T are trapped in the endoplasmic reticulum. Complex glycosylation was absent in these mutant receptors, supporting this conclusion. The motif may represent a transport signal that is recognised by a component of ER to Golgi vesicles. Alternatively, it may be necessary for transport-competent receptor folding to pass the quality-control system of the ER. To assess these two possibilities, a receptor fragment that allows transport studies independent of full-length receptor folding was constructed. Transmembrane domains II-VII were deleted, thereby fusing the intracellular C terminus to the first cytoplasmic loop. The mutations that impaired transport of the full-length receptor were introduced, and receptor fragments were localised in transiently transfected HEK293 cells. All mutant receptor fragments were detectable at the plasma membrane, demonstrating that the glutamate/dileucine motif does not function as a small, linear vesicular transport signal. Instead, the results strongly suggest that this motif is required for transport-competent folding of the full-length receptor. To assess the underlying conformational features, a three-dimensional homology model of the V2 receptor was computed. The model predicts that the

glutamate/dileucine motif contributes to a U-like loop within the intracellular C terminus. Residue L339 may be required for folding back the intracellular C terminus to residue L62 of the first cytoplasmic loop. The naturally occurring L62P and  $\Delta$ L62-R64 mutations in the first cytoplasmic loop were characterised and shown to lead to transport-defective full-length V2 receptors that are retained in the ER, consistent with the structure model and phenotype. A databank analysis revealed that these residues are part of a conserved region in the GPCR family.

## 8 Literaturverzeichnis

- ALFAIDY, N., BLOT-CHABAUD, M., BONVALET, J.-P. & FARMAN, N. (1997):  
Vasopressin potentiates mineralocorticoid selectivity by stimulating 11 $\beta$   
Hydroxysteroid Deshydrogenase in rat collecting duct.  
*J. Clin. Invest.* **100**, 2437-2442
- ANDERSEN-BECKH, B. DEHE, M., SCHÜLEIN, R., WIESNER, B., RUTZ, C.,  
LIEBENHOFF, U., ROSENTHAL, W. & OKSCHE, A. (1999):  
Polarized expression of the vasopressin V2 receptor in Madin-Darby canine  
kidney cells.  
*Kidney International* **56**, 517-527
- ATTRAMADAL, H., ARRIZA, J.L., AOKI, C., DAWSON, T.M., CODINA, J.,  
KWATRA, M.M., SNYDER, S.H., CARON, M.G. & LEFKOWITZ, R.J.  
(1992):  
Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family.  
*J. Biol. Chem.* **267**, 17882-17890
- BEAU, I., GROYER-PICARD, M.T., LE BIVIC, A., VANNIER, B., LOOSFELT, H.,  
MILGROM, E. & MISRAHI, M. (1998):  
The basolateral localization signal of the follicle-stimulating hormone receptor.  
*J. Biol. Chem.* **273**, 18610-18616
- BEAU, I., MISRAHI, M., GROSS, B., VANNIER, B., LOOSFELT, H., HAI, M.T.V.,  
PICHON, C. & MILGROM, E. (1997):  
Basolateral localization and transcytosis of gonadotropin and thyrotropin  
receptors expressed in Madin-Darby canine kidney cells.  
*J. Biol. Chem.* **272**, 5241-5248

BICHET, D.G., BIRNBAUMER, M., LONERGAN, M., ARTHUS, M.F., ROSENTHAL, W., GOODYER, P., NIVET, H., BENOIT, S., GIAMPIETRO, P., SIMONETTI, S., FISH, A., WHITLEY, C.B., JAEGER, P., GERTNER, J., NEW, M., DI-BONA, F.J., KAPLAN, B.S., ROBERTSON, G.L., HENDY, G.N., FUJIWARA, T.M. & MORGAN, K. (1994):

Nature and recurrence of AVPR2 mutations in X-linked nephrogenic diabetes insipidus.

*Am. J. Hum. Genet.* **55**, 278-286

BIEBERMANN, H. SCHÖNEBERG, T., SCHULZ, A., KRAUSE, G., GRÜTERS, A. SCHULZ, G. & GUDERMANN, T. (1998):

A conserved residue (Y601) in transmembrane 5 determines G protein coupling of the human thyrotropin receptors.

*FASEB J.* **12**,1461-1471

BIRNBAUMER, M., ANTARAMIAN, A., THEMME, A.P. & GILBERT, S. (1992):

Desensitization of the human V2 vasopressin receptor. Homologous effects in the absence of heterologous desensitization.

*J. Biol. Chem.* **267**, 11783-11788

BOCKAERT, J. & PIN, J.P. (1999):

Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success.

*EMBO J.* **18**, 1723-1729

BONATTI, S., MIGLIACCIO, G. & SIMONS, K. (1989):

Palmitoylation of viral membrane glycoproteins takes place after exit from the endoplasmic reticulum.

*J. Biol. Chem.* **264**, 12590-12995

BRAILOIU, E., FILIPEANU, C.M., TICA, C.P., DE ZEEUW, D. & NELEMANS, S.A. (1999):

Contractile effects by intracellular angiotensin II via receptors with distinct pharmacological profile in rat aorta.

*Br. J. Pharmacol.* **126**, 1133-1138

BUNNETT, N.W., BOUVIER, M. & DE BLASI, A. (1998):

Peptide G protein-coupled receptors meet at Erice.

*TiPS* **19**, 343-346

CALVO, P.A., FRANK, D.W., BIELER, B.M, BERSON, J.F. & MARKS, M.S. (1999):

A cytoplasmic sequence in human tyrosinase defines a second class of dileucine-based sorting signals for late endosomal and lysosomal delivery.

*J. Biol. Chem.* **274**, 12780-12789

CHANG, X., CUI, L., HOU, Y., JENSEN, T.J., ALEKSANDROV, A.A., MENGOS, A. & RIORDAN, J.R. (1999):

Removal of multiple arginine-framed trafficking signals overcomes misprocessing of  $\Delta F508$  CFTR present in most patients with cystic fibrosis.

*Mol. Cell* **4**, 137-142

CHARLTON, J.A. & BAYLIS, P.H. (1990):

Stimulation of rat renal medullary  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase by arginine vasopressin is mediated by the V2 receptor.

*J. Endocrinol.* **127**, 213-216

CHUANG, T.T., IACOVELLI, L., SALLESE, M. & DE BLASI, A. (1996):

G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and its implications.

*Trends Pharmacol. Sci.* **17**, 416-421

DERETIC, D., SCHMERL, S., HARGRAVE, P.A., ARENDT, A. & MCDOWELL, J.H. (1998):

Regulation of sorting and post-Golgi trafficking of rhodopsin by its C-terminal sequence QVS(A)PA.

*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 10620-10625

DIETRICH, J., KASTRUP, J. NIELSEN, B.L, ØDUM, N. & GEISLER, C. (1997):

Regulation and function of the CD3 $\gamma$  DxxxLL motif: A binding site for adaptor protein-1 and adaptor protein-2 in vitro.

*J. Cell Biol.* **138**, 271-281

DISTEL, B., BAUER, U., LE BORGNE, R. & HOFLACK, B. (1998):

Basolateral sorting of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor in Madin-Darby canine kidney cells.

*J. Biol. Chem.* **273**, 186-193

FIEDLER, K., VEIT, M., STAMNES, M.A. & ROTHMAN, J.E. (1996):

Bimodal interaction of coatamer with the p24 family of putative cargo receptors.

*Science (Washington D.C.)* **273**, 1396-1399

FRANZONI, L., NICASTRO, G., PERTINHEZ, T.A., OLIVIERA, E., NAKAIE, C.R., PAVIA, A.C.M., SCHREIER, S. & SPINSI, A. (1998):

Structure of two fragments of the third cytoplasmic loop of the rat angiotensin II AT1A receptor.

*J. Biol. Chem.* **274**, 227-235

GABILONDO, A.M., HEGLER, J., KRASEL, C., BOIVIN-JAHNS, V., HEIN, L. & LOHSE, M.J. (1998):

A dileucine motif in the C terminus of the beta2-adrenergic receptor is involved in receptor internalization.

*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 12285-12290

GEISLER, C., DIETRICH, J., NIELSEN, B.L., KASTRUP, J., LAURITSEN, J.P.H., ØDUM, N. & CHRISTENSEN, M.D. (1998):

Leucine-based receptor sorting motifs are dependent on the spacing relative to the plasma membrane.

*J. Biol. Chem.* **273**, 21316-21323

GOODMAN, O.B.,JR., KRUPNIK, J.G., SANTINI, F., GUREVICH, V.V., PENN, R.B., GAGNON, A.W., KEEN, J.H. & BENOVIC, J.L. (1996):

β-Arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β<sub>2</sub>-adrenergic receptor.

*Nature (London)* **383**, 447-450

GOODMAN, O.B.,JR., KRUPNIK, J.G., GUREVICH, V.V., BENOVIC, J.L. & KEEN, J.H. (1997):

Arrestin/clathrin interaction. Localization of the arrestin binding locus to the clathrin terminal domain.

*J. Biol. Chem.* **272**, 15017-15022

HAMMOND, C. & HELENIUS, A. (1995):

Quality control in the secretory pathway.

*Curr. Opin. Cell. Biol.* **7**, 523-529

HEYMANN, J.A. & SUBRAMANIAM, S. (1997):

Expression, stability and membrane integration of truncation mutants of bovine rhodopsin.

*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 4966-4971

HUNZIKER, W. & FUMEY, C. (1994):

A di-leucine motif mediates endocytosis and basolateral sorting of macrophage IgG Fc receptors in MDCK cells.

*EMBO J.* **13**, 2963-2969

HURTLEY, S.M. & HELENIUS, A. (1989):

Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum.

*Annu. Rev. Cell Biol.* **5**, 277-307

INGLESE, J., FREEDMAN, N.J., KOCH, W.J. & LEFKOWITZ, R.J. (1993):

Structure and mechanism of the G protein-coupled receptor kinases.

*J. Biol. Chem.* **268**, 23735-23738

INNAMORATI, G., SADEGHI, H. & BIRNBAUMER, M. (1996):

A fully active nonglycosylated V2 vasopressin receptor.

*Mol. Pharmacol.* **50**, 467-473

INNAMORATI, G., SADEGHI, H., EBERLE, A.N. & BIRNBAUMER, M. (1997):

Phosphorylation of the V2 vasopressin receptor.

*J. Biol. Chem.* **272**, 2486-2492

INNAMORATI, G., SADEGHI, H., TRAN, N.T. & BIRNBAUMER, M. (1998):

A serine cluster prevents recycling of the V2 vasopressin receptor.

*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 2222-2226

JACKSON, E.K. (1996):

Vasopressin and other agents affecting the renal conservation of water.

In HARDMAN, J.G., GOODMAN GILMAN, A. & LIMBIRD, L.E. (Hrsg.):

Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-

Hill, New York. 9. Aufl., 715-731

JOHNSON, K.F. & KORNFELD, S. (1992):

A His-Leu-Leu sequence near the carboxyl terminus of the cytoplasmic domain of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor is necessary for the lysosomal enzyme sorting function.

*J. Biol. Chem.* **267**, 17110-17115

KAISER, C. & FERRO-NOVICK, S. (1998):

Transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi.

*Curr. Opin. Cell. Biol.* **10**, 477-482

KEEFER, J.R. & LIMBIRD, L.E. (1993):

The  $\alpha_2$ -adrenergic receptor is targeted directly to the basolateral membrane domain of Madin-Darby canine kidney cells independent of coupling to Pertussis Toxin-sensitive GTP-binding proteins.

*J. Biol. Chem.* **268**, 11340-11347

KIM, G.-H., ECELBARGER, C.A., MITCHELL, C., PACKER, R.K., WADE, J.B. & KNEPPER, M.A. (1999):

Vasopressin increases Na-K-2Cl cotransporter expression in thick ascending limb of Henle's loop.

*Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **276** (Renal Physiol. **45**), F96-F103

KISHORE, B.K., MANDON, B., OZA, N.B., DIGIOVANNI, S.R., COLEMAN, R.A., OSTROWSKI, N.L., WADE, J.B. & KNEPPER, M.A. (1996):

Rat vasopressin V2 Receptor.

*J. Clin. Invest.* **97**, 2763-2771

KLUSSMANN, E., MARIC, K. & ROSENTHAL, W. (2000):

The mechanism of aquaporin control in the renal collecting duct.

*Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **141**, wird gedruckt.

KNOERS, N.V.A.M., VAN DEN OUWELAND, A.M.W., VERDIJK, M., MONNENS, L.A.H. & VAN OOST, B.A. (1994):

Inheritance of mutations in the V2 receptor gene in thirteen families with nephrogenic diabetes insipidus.

*Kidney International* **46**, 170-176

KRAUSE, G., HERMOSILLA, R., OKSCHE, A., RUTZ, C., ROSENTHAL, W. & SCHÜLEIN, R. (2000):

Molecular and conformational features of a transport-relevant domain in the C-terminal tail of the vasopressin V2 receptor.

*Mol. Pharmacol.* **57**, 232-242

KRUEGER, K. M., DAAKA, Y., PITCHER, J. A., & LEFKOWITZ, R. J. (1997):

The Role of Sequestration in G Protein-coupled Receptor Resensitization.

*J. Biol. Chem.* **272**, 5-8

KUEHN, M.J. & SCHECKMAN, R. (1997):

COPII and secretory cargo capture into transport vesicles.

*Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 477-483

LAEMMLI, U.K. (1970):

Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4.

*Nature (London)* **227**, 680-685

LETOURNEUR, F. & COSSON, P. (1998):

Targeting to the endoplasmic reticulum in yeast cells by determinants present in transmembrane domains.

*J. Biol. Chem.* **273**, 33273-33278

LETOURNEUR, F. & KLAUSNER, R.D. (1992):

A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains.

*Cell* **69**, 1143-1157

LIS, H. & SHARON, N. (1993):

Protein glycosylation. Structural and functional aspects.

*Eur. J. Biochem.* **218**, 1-27

MACHAMER, C.E. (1996):

ER-Golgi membrane traffic and protein targeting.

In: Protein Targeting. (Autor, Hurtley), S.M. Oxford University Press, Walton Street, Oxford OX2 6DP. 1. Aufl., 123-151

NAKAMURA, K. & ASCOLI, M. (1999):

A dileucine-based motif in the C-terminal tail of the lutropin/choriogonadotropin receptor inhibits endocytosis of the agonist-receptor complex.

*Mol. Pharmacol.* **56**, 728-736

NISHIMURA, N. & BALCH, W.E. (1997):

A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum.

*Science (Washington DC)* **277**, 556-558

NONOGUCHI, H., OWADA, A., KOBAYASHI, N., TAKAYAMA, M., TERADA, Y., KOIKE, J., UJIE, K., MARUMO, F., SAKAI, T. & TOMITA, K. (1995):

Immunohistochemical localization of V2 vasopressin receptor along the nephron and functional role of luminal V2 receptor in the terminal inner medullary collecting ducts.

*J. Clin. Invest.* **96**, 1768-78

OAKLEY, R.H., LAPORTE, S.A., HOLT, J.A., BARAK, L.S. & CARON, M.G. (1999):

Association of  $\beta$ -arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization.

*J. Biol. Chem.* **274**, 32248-32257

OAKLEY, R.H., LAPORTE, S.A., HOLT, J.A., CARON, M.G. & BARAK, L.S.

(2000):

Differential affinities of visual arrestin,  $\beta$ Arrestin1, and  $\beta$ arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two mayor classes of receptors.

*J. Biol. Chem.* **275**, 17201-17210

OKSCHE, A., BOESE, G., HORSTMAYER, A., FURKERT, J., BEYERMANN, M.,

BIENERT, M. & ROSENTHAL, W. (2000): Late endosomal/lysosomal targeting and lack of recycling of the ligand-occupied endothelin B receptor.

*Mol. Pharmacol.* **57**, 1104-1113

OKSCHE, A., DEHE, M., SCHÜLEIN, R., WIESNER, B. & ROSENTHAL, W.

(1998):

Folding and cell surface expression of the vasopressin V2 receptor: requirement of the intracellular C-terminus.

*FEBS Lett.* **424**, 57-62

OKSCHE, A. & ROSENTHAL, W. (1998):

The molecular basis of nephrogenic diabetes insipidus.

*J. Mol. Med.* **76**, 326-337

OKSCHE, A. & ROSENTHAL, W. (1999):

Molekulare Grundlagen des Diabetes insipidus centralis und renalis.

In GANTEN, D. & RUCKPAUL, K. (Hrsg.) Molekulare Medizin. Band 8: Endokrinopathien. Springer Verlag, Heidelberg

PARENT, J.L.; LABRECQUE, P.; ORSINI, M.J. & BENOVIC, J.L. (1999):

Internalization of the TXA<sub>2</sub> Receptor  $\alpha$  and  $\beta$  Isoforms.

*J. Biol. Chem.* **274**, 8941-8948

- PELEGRINI, M., ROYO, M., CHOREV, M. & MIERKE, D.F. (1997):  
Conformational characterization of the peptide mimetic of the third cytoplasmic loop of the G protein coupled parathyroid hormone/parathyroid hormone related receptor.  
*Biopoly.* **40**, 653-666
- PERBAL, B. (1988):  
A practical guide to molecular cloning.  
Wiley-Interscience Publications, New York. 2. Aufl.,
- PFEIFFER, R., KIRSCH, J. & FAHRENHOLZ, F. (1998):  
Agonist and antagonist-dependent internalization of the human vasopressin V2 receptor.  
*Exp. Cell. Res.* **244**, 327-339
- PIPPIG, S., ANDEXINGER, S., & LOHSE, M. J. (1995):  
Sequestration and recycling of beta 2-adrenergic receptors permit receptor resensitization.  
*Mol. Pharmacol.* **47**, 666-676
- POND, L., KUHN, L.A., TEYTON, L., SCHUTZE, M.P., TAINER, J.A., JACKSON, M.R., PETERSON, P.A. (1995):  
A role for acidic residues in di-leucine motif-based targeting to the endocytic pathway.  
*J. Biol. Chem.* **270**, 19989-19997
- RANDS, E., CANDELORE, M.R., CHEUNG, A.H., HILL, W.S., STRADER, C.D. & DIXON, R.A. (1990):  
Mutational analysis of *beta*-adrenergic receptor glycosylation.  
*J. Biol. Chem.* **265**, 10759-10764

RAPOPORT, T.A. (1990):

Protein transport across the ER membrane.

*TIBS* **15**, 355-358

RAY, K., CLAPP, P., GOLDSMITH, P.K. & SPIEGEL, A.M. (1998):

Identification of the sites of *N*-linked glycosylation on the human calcium receptor and assessment of their role in cell surface expression and signal transduction.

*J. Biol. Chem.* **273**, 34558-34567

RODRIGUEZ, M.C., XIE, Y.B., WANG, H., COLLISON, K. & SEGALOFF, L. (1992):

Effects of truncations of the cytoplasmic tail of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor on receptor-mediated hormone internalization.

*Mol. Endocrinol.* **6**, 327-336

ROSENTHAL, W., SEIBOLD, A., ANTARAMIAN, A., LONERGAN, M., ARTHUS, M.-F., HENDY, G., BIRNBAUMER, M. & BICHET, D.G. (1992):

Molecular identification of the gene responsible for congenital nephrogenic diabetes insipidus.

*Nature (London)* **359**, 233-235

ROTHMAN, J.E. & ORCI, L. (1992):

Molecular dissection of the secretory pathway.

*Nature (London)* **355**, 409-415

SADEGHI, H.M. & BIRNBAUMER, M. (1999):

O-glycosylation of the V2 vasopressin receptor.

*Glycobiology* **9**, 731-737

- SADEGHI, H.M., INNAMORATI, G. & BIRNBAUMER, M. (1997)a:  
An X-linked NDI mutation reveals a requirement for cell surface V2R expression.  
*Mol. Endocrinol.* **11**, 706-713
- SADEGHI, H.M., INNAMORATI, G. & BIRNBAUMER, M. (1997)b:  
Maturation of receptor proteins in eukaryotic expression systems.  
*J. Rec. and Signal Transd. Res.* **17**, 433-445
- SADEGHI, H.M., INNAMORATI, G., DAGARAG, M. & BIRNBAUMER, M. (1997)c:  
Palmitoylation of the V<sub>2</sub> Vasopressin Receptor.  
*Mol. Pharmacol.* **52**, 21-29
- SAUNDERS, C., KEEFER, J.R., BONNER, C.A. & LIMBIRD, L.E. (1998):  
Targeting of G protein-coupled receptors to the basolateral surface of polarized renal epithelial cells involves multiple, non-contiguous structural signals.  
*J. Biol. Chem.* **272**, 24196-24206
- SAUNDERS, C., KEEFER, J.R., KENNEDY, A.P., WELLS, J.N. & LIMBIRD, L.E. (1996):  
Receptor coupled to pertussis toxin-sensitive G proteins traffic to opposite surfaces in Madin-Darby canine kidney cells.  
*J. Biol. Chem.* **271**, 995-1002
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. (1989):  
Molecular cloning. A laboratory manual.  
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2. Aufl.

SCHÖNEBERG, T., LIU, J. & WESS, J. (1995):

Plasma membrane localization and functional rescue of truncated forms of a G protein-coupled receptor.

*J. Biol. Chem.* **270**, 18000-18006

SCHÜLEIN, R., HERMOSILLA, R., OKSCHE, A., DEHE, M., WIESNER, B., KRAUSE, G. & ROSENTHAL, W. (1998)a:

A di-leucine sequence and an upstream glutamate residue in the intracellular C-terminus of the vasopressin V2 receptor are essential for cell surface transport in COS.M6 cells.

*Mol. Pharmacol.* **54**, 525-535

SCHÜLEIN, R., KREFT, J., GONSKI, S. & GOEBEL, W. (1992):

Preprosubtilisin Carlsberg processing and secretion is blocked after deletion of amino acids 97-101 in the mature part of the enzyme.

*Mol. Gen. Genet.* **227**, 137-143

SCHÜLEIN, R., LIEBENHOFF, U., MÜLLER, H., BIRNBAUMER, M. & ROSENTHAL, W. (1996)a:

Properties of the human arginine vasopressin V2 receptor after site-directed mutagenesis of its putative palmitoylation site.

*J. Biochem.* **313**, 611-616

SCHÜLEIN, R., LORENZ, D., OKSCHE, A., WIESNER, B., HERMOSILLA, R., EBERT, J. & ROSENTHAL, W. (1998)b:

Polarized cell surface expression of the green fluorescent protein-tagged vasopressin V2 receptor in Madin-Darby canine kidney cells.

*FEBS Lett.* **441**, 170-176

SCHÜLEIN, R., RUTZ, C. & ROSENTHAL, W. (1996)b:

Membrane targeting and determination of transmembrane topology of the human vasopressin V2 receptor.

*J. Biol. Chem.* **271**, 28844-28852

SCHÜLEIN, R., ZÜHLKE, K., OKSCHE, A., HERMOSILLA, R., FURKERT, J. & ROSENTHAL, W. (2000):

The role of conserved extracellular cysteine residues in vasopressin V2 receptor function and properties of two naturally occurring mutant receptors with additional extracellular cysteine residues.

*FEBS Lett.* **466**, 101-106

SHAYAKUL, C., STEEL, A. & HEDIGER, M.A. (1996):

Molecular cloning and characterization of the vasopressin-regulated urea transporter of rat kidney collecting ducts.

*J. Clin. Invest.* **98**, 2580-2587

SHEIKH, H. & ISACKE, C.M. (1996):

A di-hydrophobic Leu-Val motif regulates the basolateral localization of CD44 in polarized Madin-Darby canine kidney epithelial cells.

*J. Biol. Chem.* **271**, 12185-12190

SHEN, T., SUZUKI, Y., POYARD, M., MIYAMOTO, N., DEFER, N. & HANOUNE, J. (1997):

Expression of adenylyl cyclase mRNA in the adult, in developing, and in the Brattleboro rat kidney.

*Am. J. Physiol.* **273**, C323-C330

SHIN, J., DUNBRACK, JR R.L, LEE, S. & STROMINGER, J.L. (1991):

Signals for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum studied with CD4 truncation mutants.

*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 1918-1922

SPINDLER, K.L. (1997):

Vergleichende Endokrinologie. Regulation und Mechanismen.  
Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, Stuttgart

STAR, R.A. (1990):

Apical membrane limits urea permeation across the rat inner medullary collecting duct.

*J. Clin. Invest.* **86**, 1172-1178

STEFANER, I., PRAETOR, A. & HUNZIKER, W. (1999):

Nonvectorial surface transport, endocytosis via a di-leucine-based motif, and bidirectional transcytosis of chimera encoding the cytosolic tail of rat FcRn expressed in Madin-Darby canine kidney cells.

*J. Biol. Chem.* **274**, 8998-9005

TABOR, S. & RICHARDSON, C.C. (1987):

DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA-Polymerase.

*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 4767-4771

TERASAKI, M. & REES, T.S. (1992):

Characterization of endoplasmic reticulum by co-localization of BiP and dicarbocyanine dyes.

*J. Cell. Sci.* **101**, 315-322

TSUKAGUCHI, H., MATSUBARA, H., TAKETANI, S., MORI, Y., SEIDO, T. & INADA, M. (1995):

Binding-, intracellular transport-, and biosynthesis-defective mutants of vasopressin type 2 receptor in patients with X-linked nephrogenic diabetes insipidus.

*J. Clin. Invest.* **96**, 2043-2050

UNGER, V.M., HARGRAVE, P.A., BALSWIN, J.M. & SCHERTLER, G.F.X. (1997):

Arrangement of rhodopsin transmembrane  $\alpha$ -helices.

*Nature (London)* **389**, 203-206

UNSON, C.G., CYPESS, A.M., KIM, H.N., GOLDSMITH, P.K., CARRUTHERS, C.J., MERRIFIELD, R.B. & SAKMAR, T.P. (1995):

Characterization of deletion and truncation mutants of the rat glucagon receptor.

*J. Biol. Chem.* **270**, 27720-27727

VALDENNAIRE, O., BARRET, A., SCHWEIZER, A., ROHRBACHER, E., MONGIAT, F., PINET, F., CORVOL, P. & TOUGARD C. (1999):

Two di-leucine motifs account for different subcellular localizations of the human endothelin-converting enzyme (ECE-1) isoforms.

*J. Cell Sci.* **112**, 3115-3125

VINCENT, V., GOFFIN, V., ROZAKIS-ADCOCK, M., MORNON, J.P. & KELLY, P.A. (1997):

Identification of cytoplasmic motifs required for short prolactin receptor internalization.

*J. Biol. Chem.* **272**, 7062-7068

VON ZASTROW, M. & KOBILKA, B.K. (1992):

Ligand-regulated internalization and recycling of human  $\beta$ 2-adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors.

*J. Biol. Chem.* **267**, 3530-3538

WARREN, G. & MELLMAN, I. (1999):

Bulk flow redux?

*Cell* **98**, 125-127

WEINSHANK, R.L., ZGOMBICK, J.M., MACCHI, M., ADHAM, N., LICHTBLAU, H., BRANCHEK, T.A. & HARTIG, P.R. (1990):

Cloning, expression, and pharmacological characterization of a human alpha 2B-adrenergic receptor.

*Mol. Pharmacol.* **38**, 681-688

WIELAND, F.T., GLEASON, M.L., SERAFINI, T.A. & ROTHMAN, J.E. (1987):

The rate of bulk flow from the endoplasmic reticulum to the cell surface.

*Cell* **50**, 289-300

WOZNIAK, M. & LIMBIRD, L.E. (1996):

The three  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtypes achieve basolateral localization in Madin-Darby canine kidney II cells via different targeting mechanisms.

*J. Biol. Chem.* **271**, 5017-5024

YEAGLE, P. L., ALDERFER, J. L., ALBERT, A. D. (1997):

Three-dimensional structure of the cytoplasmic face of the G protein receptor rhodopsin.

*Biochemistry* **36**, 9649-9654

ZENG, F.Y.; SOLDNER, A., SCHÖNEBERG, K. & WESS, J. (1999):

Conserved extracellular cysteine pair in the M3 muscarinic acetylcholine receptor is essential for proper receptor cell surface localization but not for G protein coupling.

*J. Neurochem.* **72**, 2404-2414

ZERANGUE, N., SCHWAPPACH, B., JAN, Y.N. & JAN, L.Y. (1999):

A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane  $K_{ATP}$  channels.

*Neuron* **22**, 537-548

- ZHANG, J.-X., BRAAKMAN, I., MATLACK, K.E.S. & HELENIUS, A. (1997):  
Quality control in the secretory pathway: The role of calreticulin, calnexin and  
BiP in the retention of glycoproteins with C-terminal truncations.  
*Mol. Biol. Cell.* **8**, 1943-1954

## 9 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei:

Herrn Prof. Dr. Walter Rosenthal für die Themaüberlassung, Orientierungshilfen und die Möglichkeit meine Doktorarbeit zu verwirklichen,

Herrn Prof. Dr. Ernst Petzinger für die konstruktive Kritik und Begutachtung der Doktorarbeit,

Herrn Dr. Ralf Schüle für die Leitung, Ideen, Unterstützung, Diskussionen, Motivation, Korrekturen und Spaß während meiner Arbeit,

Frau Dr. Claudia Rutz für ihre Unterstützung bei der Laborarbeit, Motivation und für die vielen Süßigkeiten,

Herrn Dr. Alexander Oksche für seine guten Ratschläge, Erklärungen und Ideen,

Herrn Dr. Gerd Krause für das wunderschöne Modell des V2-Rezeptors (Danke Gerd!),

Frau Jenny Eichhorst für die Unterstützung bei den vielen langen Bindungsversuchen, AC-Versuchen und Ihrer Geduld mit mir,

Herrn John "Magic" Dickson für seine ständige Hilfsbereitschaft und Kooperation bei der molekularbiologischen Arbeit und auf dem Fußballfeld,

Frau Petra Kronich für Ihre Hilfe bei den Western Blots,

Herrn Dr. Erhard Klausenz und Frau Barbara Mohs für ihren exzellenten Sequenzierservice,

Herrn Helmut Müller, Frau Dr. Gisela Papsdorf und Frau Renate Loose für Ihre ständige Hilfe in der Zellkultur,

Herrn Dr. Burkard Wiesner und Frau Brunhilde Oczko für Ihre Hilfe bei der Laser Scanning Mikroskopie,

Herrn Dr. Kenan Maric, der mir mit seiner Freundschaft und seiner Unterstützung meine Arbeit erleichtert hat,

allen anderen Mitarbeiter des RBI Gießen und FMP Berlin,

meinen Freunden in Santiago de Chile: Leo, David, Rossana, los Basultos; in Gießen: Moritz und Nona, Marcel und Sabine, Ralph, Anibal, Jairo, Pedro "la Momia", die Familie Kühle; und in Berlin: Marco und Catalina.

natürlich auch bei meinen Eltern für ihre permanente Unterstützung, meinem Bruder Carlos für so vieles und Tammy Hogland für ihre Hilfsbereitschaft.

dem Deutschen Akademischen Austauschdienst, der mir die Möglichkeit gegeben hat, einen Traum zu verwirklichen und bei Frau Hartmann, die ständig für mich und meine Probleme da war.

meiner Frau Loreto Montero, die mich über die ganzen Jahre meiner Arbeit unterstützt, motiviert und vorangetrieben hat. Ohne Sie hätte ich es niemals geschafft. Muchas gracias mi amor. Eres lo mejor! Te amo!