

Betegséget okozó V2 vazopresszin receptor mutációk vizsgálata

Doktori értekezés

Dr. Erdélyi László Sándor

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Hunyady László, az MTA levelező tagja, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Zelena Dóra, Ph. D., tudományos főmunkatárs

Dr. Osváth Szabolcs, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Falus András, az MTA rendes tagja, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Sármai Gabriella, az MTA doktora, egyetemi tanár

Dr. Zsembery Ákos, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2015.

Tartalomjegyzék

1.	Rövidítések jegyzéke.....	4
2.	Bevezetés.....	7
2.1.	A G-fehérje kapcsolt receptorok (GFKR) szerkezete és működése.....	7
2.1.1.	A G-fehérje kapcsolt receptorok aktivitása.....	8
2.1.1.1.	Bazális vagy konstitutív aktivitás.....	10
2.1.2.	A G-fehérje kapcsolt receptorok deszenzitizációja és internalizációja	11
2.1.2.1.	A deszenzitizáció.....	12
2.1.2.2.	Az arresztinek szerepe.....	12
2.1.2.3.	Az internalizáció.....	13
2.1.2.4.	β -arresztin függő jelátviteli folyamatok.....	15
2.1.3.	Jelátvitel-szelektív agonizmus.....	15
2.1.4.	G-fehérje kapcsolt receptorok mutációi és klinikai következményeik.....	18
2.1.4.1.	A receptor diszfunkció sejtelettani alapjai.....	18
2.1.4.2.	Funkcióvesztő GFKR mutációk.....	20
2.1.4.3.	Funkciónyerő GFKR mutációk.....	20
2.2.	Az arginin-vazopresszin rendszer fiziológiája.....	21
2.2.1.	A vese koncentráló és hígító működése.....	21
2.2.2.	Az arginin-vazopresszin.....	23
2.2.3.	Vazopresszin receptorok.....	23
2.2.3.1.	V1aR.....	24
2.2.3.2.	V1bR.....	24
2.2.3.3.	V2R.....	25
2.3.	Az arginin-vazopresszin rendszer patológiája.....	30
2.3.1.	Diabétesz inszipidusz.....	30

2.3.1.1.	Veleszületett centrális diabétesz inszpidusz.....	31
2.3.1.2.	Veleszületett nefrogén diabétesz inszpidusz (NDI)	32
2.3.2.	A veleszületett NDI klinikuma	38
2.3.2.1.	A veleszületett NDI tünetei	38
2.3.2.2.	A veleszületett NDI diagnózisa.....	39
2.3.2.3.	A veleszületett NDI terápiája	41
2.3.3.	Kóros antidiuretikus hormon szindrómák	46
2.3.3.1.	„Centrális” kóros antidiuretikus hormon szindróma.....	46
2.3.3.2.	Nefrogén kóros antidiurézis szindróma.....	47
3.	Célkitűzések	49
4.	Anyagok és módszerek.....	50
4.1.	Felhasznált anyagok	50
4.2.	Genomiális DNS szekvenálás.....	51
4.3.	Plazmid konstrukciók elkészítése.....	51
4.4.	Sejtkultúra fenntartás és a sejtek transzfekciója	53
4.5.	Biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) mérések	54
4.5.1.	A biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) technika rövid bemutatása	54
4.5.2.	A BRET mérések.....	55
4.5.3.	BRET alapú cAMP mérés	56
4.5.4.	BRET alapú β -arresztin kötési vizsgálat	57
4.5.5.	Plazmamembrán-receptor interakció vizsgálata BRET-tel	57
4.6.	Konfokális lézermikroszkópia.....	57
4.6.1.	Az N321K mutáció vizsgálata konfokális mikroszkópiával	58
4.6.2.	Az I130N mutáció vizsgálata konfokális mikroszkópiával.....	58
4.7.	Áramlási citometria	59

4.8.	Miográfia	60
4.9.	A kísérletek során felhasznált programok és statisztikai elemzés	60
5.	Eredmények	61
5.1.	Az N321K mutáció	61
5.1.1.	Az N321K mutáció azonosítása	61
5.1.2.	Az N321K-V2R sejten belüli elhelyezkedése	63
5.1.3.	Az N321K-V2R funkcionális vizsgálata	65
5.1.3.1.	Az N321K-V2R hatása a cAMP szintézisre	65
5.1.3.2.	Az N321K-V2R internalizációs tulajdonságai	69
5.1.3.3.	Az N321K-V2R agonista érzékenysége vizsgálatára	72
5.2.	Az I130N mutáció	76
5.2.1.	Az I130N mutáció azonosítása	76
5.2.2.	Az I130N-V2R sejten belüli elhelyezkedése	79
5.2.3.	Az I130N-V2R funkcionális vizsgálata	83
5.2.3.1.	Az I130N-V2R hatása a cAMP szintézisre	83
5.2.3.2.	Az I130N-V2R plazmamembrán elhelyezkedésének vizsgálata	87
5.2.3.3.	Az I130N-V2R internalizációs tulajdonságai	90
6.	Megbeszélés	94
7.	Következtetések	102
8.	Összefoglalás	103
9.	Summary	104
10.	Irodalomjegyzék	105
11.	Saját közlemények jegyzéke	123
12.	Köszönetnyilvánítás	124

1. Rövidítések jegyzéke

7TMR	7-transzmembrán receptor
ACTH	adrenokortikotrop hormon
ADNDI	autoszómális domináns nefrogén diabétesz inszipidusz
AgRP	agouti-szerű protein
AP	adapter protein
AQP	aquaporin
ARNDI	autoszómális recesszív nefrogén diabétesz inszipidusz
AsuAVP	Asu ^{1,6} -arginin-vazopresszin
AT1R	1-es típusú angiotenzin receptor
AVP	arginin-vazopresszin
BRET	biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer
cAMP	3'-5'-ciklikus adenozin-monofoszfát
CaSR	kalcium-érzékelő receptor
CDI	centrális diabétesz inszipidusz
CREB	cAMP válasz kötő fehérje
dDAVP	dezmopresszin
DI	diabétesz inszipidusz
DMEM	Dulbecco által módosított összetételű Eagle médium
DNdyn1	domináns-negatív dinamin1
dVDAVP	Val ⁴ -dezmopresszin
dyn1	dinamin1
ENaC	epitéliális nátrium csatorna
EP4R	EP4 prosztoglandin receptor
Epac	cAMP-aktivált kicserélő fehérje
ER	endoplazmás retikulum
ERK1	extracelluláris jel által regulált kináz
FBS	magzati borjú szérum
FRET	fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer
FSH	follikulus stimuláló hormon

GDP	guanozin-difoszfát
GEF	guanin nukleotid kicserélő faktor
GFKR	G-fehérje kapcsolt receptor
GHRH	növekedési hormont felszabadító hormon
GnRHR	gonadotropint felszabadító hormon receptor
GRK	G-fehérje kapcsolt receptor kináz
GTP	guanozin-trifoszfát
GTP γ S	guanozin-5'-O-[gamma-tio]trifoszfát
HA	hemagglutinin
HEK	humán embrionális vesesejt
I130N-V2R	I130N mutációt tartalmazó V2 vazopresszin receptor
IGFR	inzulin-szerű növekedési faktor receptor
IP3	inozitol-triszfoszfát
JNK	c-Jun N-terminális kináz
LH	luteinizáló hormon
LVP	Lys ⁸ -vazopresszin
LHR	luteinizáló hormon receptor
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
MC4R	4-es típusú melanokortin receptor
MEK	mitogén-aktivált protein kináz kináz 1
MP-YFP	mirisztoilálódó és palmitoilálódó fehérje - sárga fluoreszcens fehérje konstrukció
mRFP	monomer mutációt tartalmazó piros fluoreszcens fehérje
mVenus	monomer mutációt tartalmazó Venus fluoreszcens fehérje
N321K-V2R	N321K mutációt tartalmazó V2 vazopresszin receptor
NDI	nefrogén diabétesz inszipidusz
NLS	nukleáris lokalizációs szignál
NSIAD	nefrogén kóros antidiurézis szindróma
PBS	foszfát-pufferelt sóoldat
pEC50	félmaximális effektív koncentráció logaritmus
PGE2	prostaglandin E2
PH	pleksztrin homológ

PI3K	foszfatidil-inozitol-3-kináz
PIP2	foszfatidil-inozitol-biszfoszfát
PKA	protein kináz A
PKB	protein kináz B
PLC β	foszfolipáz C β
PVDAVP	deamino-Pen ¹ ,Val ⁴ -dezmopresszin
RFI	relatív fluoreszcens intenzitás
Rluc	<i>Renilla</i> luciferáz
RTK	receptor tirozin kináz
SIADH	kóros antidiuretikus hormon szindróma
SLC12A1	nátrium/kálium/klorid transzporter
Sluc	szuper <i>Renilla</i> luciferáz
T3/T4	trijód-tironin/tiroxin
TAL	felszálló vastag szegmentum
TRPV1	tranziens receptor potenciál V1
TSHR	tiroideastimuláló hormon receptor
UT-A1	urea transzporter
V1a/bR	V1 a/b vazopresszin receptor
V2R	V2 vazopresszin receptor
VT-V2R	vad típusú V2 vazopresszin receptor
XNDI	X-hez kötött nefrogén diabétesz inszipidusz
YFP	sárga fluoreszcens fehérje
β 1AR	β 1 adrenerg receptor
β 2AR	β 2 adrenerg receptor
μ -OR	μ opioid receptor

2. Bevezetés

2.1. A G-fehérje kapcsolt receptorok (GFKR) szerkezete és működése

A G-fehérje kapcsolt receptorok (GFKR), illetve másnéven 7 transzmembrán receptorok (7TMR) szupercsaládja az egyik legnagyobb fehérjecsalád az emlős genomban (1). Alapvető kommunikációs csatolók a sejten kívüli és sejten belüli tér információs egységének létrehozásában. Ezek a membránfehérjék közvetítik hormonok, parakrin faktorok és neurotranszmitterek sejtekre gyakorolt hatását, valamint a látás, szaglás és ízézés alapvető molekulái. A receptorszupercsaládon belül igen nagy a variabilitás, azonban az ide tartozó fehérjék közös jellemzője, hogy mind rendelkeznek 7 darab, egyenként 25-35 aminosavból álló szekvenciával, amelyek hidrófób α -hélixeket képeznek a sejtek membránjában. Ezeket a hélixeket intra- és extracelluláris hurkok kapcsolják össze, valamint a receptorok rendelkeznek változatos hosszúságú, sejten kívül elhelyezkedő N-terminális és sejten belüli C-terminális doménnel is (2). A 7TMR szupercsalád további jellemzője, hogy a receptorok ligandkötése G-fehérjék aktivitásának megváltozásával jár.

Több osztályozási rendszert is leírtak, napjainkban azonban filogenetikai és strukturális hasonlóságok miatt öt osztályba soroljuk a G-fehérje kapcsolt receptorokat: a rodopszin típusúak (A), szekretin (B) – és glutamát család (C), valamint adhíziós (D) és frizzled/taste2 (E) típusú receptorok (2). A legtöbb fehérjét magába foglaló család a rodopszin család, a dolgozat középpontjában álló V2 vazopresszin receptor (V2R) is ide tartozik. Az utóbbi pár év kutatásainak eredményeként robbanásszerűen megnőtt a családba tartozó, felderített kristálystruktúrával bíró receptorok száma, amely a receptorok működésének megértéséhez is jelentősen hozzájárult. A receptorok ligandjukkal egy ligandkötő „zseben” keresztül hoznak létre kapcsolatot. A ligandkötéshez közvetlenül a 3., 6. és 7. transzmembrán hélix extracelluláris oldal felé néző része járul hozzá (3). Ezen kívül a ligandkötéshez a vizsgálatok alapján szükséges a 2. extracelluláris hurok is: a ligand felismeréséhez és szelektivitáshoz szükséges,

valamint a kötés kinetikáját is befolyásolhatja (4-6). A transzmembrán hélixek kommunikációs kapcsolatot képeznek a ligandkötő zseb és a jelátviteli utak aktiválásában szerepet játszó intracelluláris hurkok között. Az intracelluláris régiók közvetlenül részt vesznek az effektor fehérjékkel történő interakciókban. A receptorok működésében elengedhetetlen szerepet játszik a 3. transzmembrán hélix citoplazmatikus végében elhelyezkedő DRY (aszpartát-arginin-tirozin) szekvencia, amelynek arginin aminosava a G-fehérje C-terminálisához közvetlenül kapcsolódik (7). Hasonlóan kiemelt szereppel bír a 7. transzmembrán domén ugyancsak citoplazmatikus végén elhelyezkedő NPXXY (aszparagin-prolin-X-X-tirozin) motívum. A GFKR ezen része receptortól függően G-fehérje kötésben, ligand iránti affinitásban és az arresztin kötésben is szerepet játszhat (8,9).

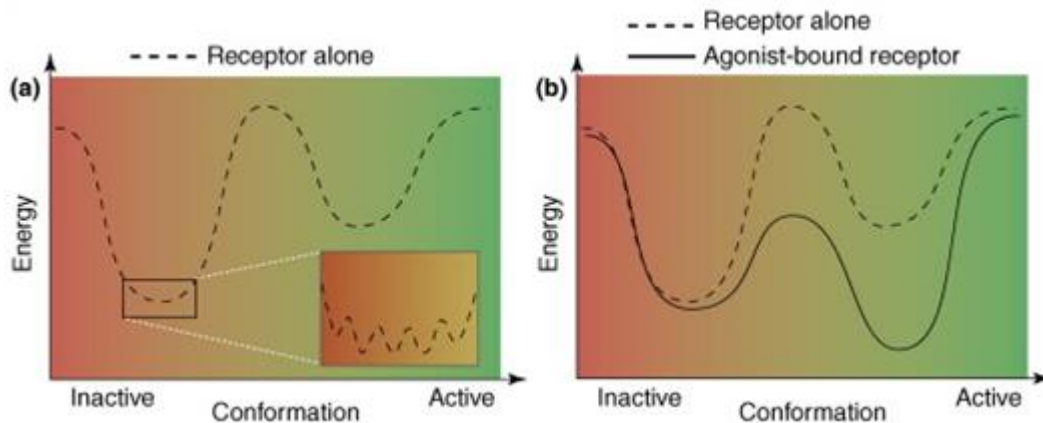
A GFKR ligandkötését követő aktivitás fokozódása jelátviteli utak aktiválódását és/vagy gátlását vonja maga után. A GFKR működésének alapja heterotrimer G-fehérjék aktiválása: az aktív receptor és a heterotrimer G-fehérje interakciója a GDP (guanozin-difoszfát) disszociációját okozza, amelyet a sejtekben magasabb koncentrációban jelen levő GTP (guanozin-trifoszfát) kötése követ. A GTP-kötött α -alegység egyrészt hidrolizálja a GTP-t GDP-vé, így saját működését limitálja, másrészt a $\beta\gamma$ alegységgel egyetemben más jelátviteli enzimek és ioncsatornák működését szabályozza közvetlenül vagy másodlagos hírvivőkön keresztül (10). Az aktív receptor egymást követően több G-fehérjét aktiválhat, amely a sejten belüli jel erősítéséhez vezet. Fontos hangsúlyozni, hogy egy adott GFKR nem csak egy típusú α -alegységet aktiválhat, egyes receptorok esetében szövet- illetve sejtspecifikus lehet a létrehozott G-fehérje aktiválódási mintázat (11).

2.1.1. A G-fehérje kapcsolt receptorok aktivitása

A receptorok aktivitása egyrészt ligandok kötődésétől függ, másrészt a receptor saját tulajdonsága, hogy mekkora a bazális - tehát agonista hiányában mutatott - aktivitása. A legkorábbi elképzelések szerint a „kulcs – zár” modell írta le a receptorok működését. Eszerint az agonista ligand kötődése a neki megfelelő környezetbe - a ligandkötő zsebbe - hozza létre azt az aktív konformációt, amely G-fehérje aktiválódáshoz vezet. A modell

használatát korlátozza, hogy egyrészt a fehérjék konformációja kismértékben dinamikusan változik, másrészt nem magyarázza az olyan ligandok működését, amelyek a receptorok aktivitását egyéb ligandok hiányában csökkentik (inverz agonisták) (12). A farmakológiai vizsgálatok alapján a receptor működés és receptor aktivitás változás leírható a konformáció-szelekciós modellel. A modell (illetve az ebből továbbfejlesztett bonyolultabb modellek) figyelembe veszi, hogy receptoroknak lehet bazális aktivitása, tehát spontán képes aktív vagy inaktív konformációt felvenni. Ha a ligand kötődése a konformációk eltérő affinitása miatt nagyobb valószínűséggel történik az aktív konformációhoz és stabilizálja azt, akkor agonista a ligand. Parciális agonista, ha nem hoz létre maximális biológiai választ a receptor. Inverz agonista az a ligand, amely nagyobb affinitással kötődik és stabilizálja az inaktív konformációt. Antagonista ligand a receptor mindkét konformációjához ugyanakkora affinitással kötődik és ezért nem változtatja meg az eredeti inaktív-aktív konformációk eloszlásából fakadó összaktivitást egy sok receptorral bíró rendszerben. Az antagonistá ugyanakkor gátolja az agonisták aktivitást fokozó hatását (13).

Ezt a modellt egészíti ki, illetve finomítja Kobilka és munkatársainak elképzelése a GFKR konformációkról. A megközelítés alapja, hogy a receptoroknak nem kétféle konformációja (aktív-inaktív) létezik, hanem folyamatos átmenettel végtelen számú konformációt vehet fel a receptor az aktivitás teljes hiánya és a maximális aktivitású állapot között. A receptor bazális konformációban (tehát ligand hiányában) alacsony energiájú állapotokat vesz fel, amely az alacsony aktivitású konformációkra jellemző. Ebből más konformációba is átalakulhat, ennek valószínűsége a két konformáció energiaszintjétől és a köztük levő energia különbség nagyságától függ. Így agonista az a ligand, ami a különbség mértékét és/vagy az aktívabb konformáció energiáját csökkenti (1. ábra) (14).



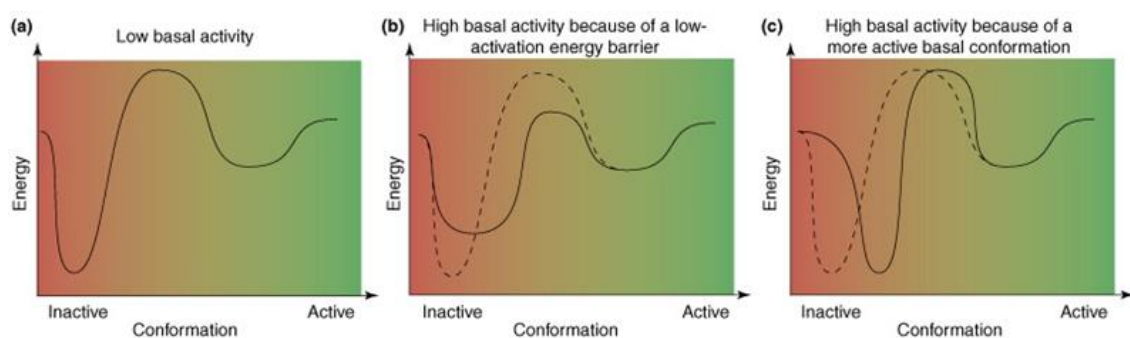
1. ábra

GFKR elméleti energiaképe Kobilka és munkatársa szerint. (a) GFKR konformációs állapotai ligand hiányában. A receptor folyamatos átmenettel végtelen számú konformációt vehet fel. Alacsony aktivitású állapotokra alacsonyabb energiaszint jellemző, magas aktivitású állapot kisebb valószínűséggel fordul elő. (b) Agonista kötődése az állapotok közötti energia különbséget és/vagy az aktívabb konformáció energiaszintjét csökkenti (14).

2.1.1.1. Bazális vagy konstitutív aktivitás

A GFKR-ok ligand hiányában mutatott aktivitását nevezzük bazális vagy konstitutív aktivitásnak. Több, mint 60 GFKR-ról kimutatták, hogy rendelkezik bazális aktivitással (15). Fontos tudni, hogy a legtöbb ilyen receptort tranziensen kifejezve sejtkultúrákban, a sejtfelszíni receptorszám többszöröse lehet az endogén receptorszámnak. Az előzőekben leírtak szerint azonos inaktív-aktív konformációs eloszlást feltételezve a mesterséges rendszerben nagyobb számú aktív receptor van jelen, amely így a konstitutív aktivitást fokozza. Egyes receptorok esetén kérdéses lehet a bazális aktivitás fiziológiai relevanciája, ugyanakkor több receptor esetén bizonyított, hogy a natív szövetben is rendelkezik konstitutív aktivitással. Ilyen a 4-es típusú melanokortin receptor (MC4R, az egyetlen fiziológiásan előforduló inverz agonsita, az AgRP - agouti-szerű protein a ligandja), a H3 hisztamin receptor vagy a CB1 kannabinoid receptor a központi idegrendszerben (16-18). Léteznek olyan receptorok is, amelyek egyáltalán nem rendelkeznek konstitutív aktivitással: ilyen például a folliculus stimuláló hormon (FSH) receptora vagy a bifázisos konformációval bíró rodopszin (14,19). Több

receptor esetében leírták, hogy a vad típushoz képest fokozott bazális aktivitással rendelkeznek egyes splicing variánsok vagy polimorfizmusok, amelyek a mutációkkal szemben a populációban relatíve nagy prevalenciával jelennek meg (20). A GFKR-ok ritka, funkciónyerő szomatikus mutációi számos betegség patofiziológiai alapjai, a későbbiekben részletesen kifejtésre kerülnek. A bazális aktivitás alapja, hogy a receptor flexibilitása miatt többféle, eltérő aktivitással bíró konformációt is felvehet a ligand hiányában, illetve hogy nagyobb G-fehérje affinitással rendelkezik. A fokozott bazális aktivitás magyarázható egyrészt az aktív és inaktív konformáció közötti alacsony energiaszint különbséggel és így az aktív konformációba alakulással, amely nagyobb valószínűséggel történik meg. Amennyiben a receptor túlnyomórészt egy adott konformációban fordul elő, úgy ezen konformáció G-fehérje iránti emelkedett aktivitásával magyarázható (2. ábra) (14).



2. ábra

Alacsony és magas bazális aktivitású GFKR elméleti energiaképei Kobilka és munkatársa szerint. (a) Alacsony bazális aktivitással rendelkező GFKR konformációs állapotai. (b) GFKR-ok alacsony energia különbség miatt létrejövő fokozott bazális aktivitás konformációs állapotai. (c) Alacsony energiaszintű, de magas bazális aktivitással járó konformációval rendelkező GFKR képe (14).

2.1.2. A G-fehérje kapcsolt receptorok deszenzitizációja és internalizációja

Minden jel, így a GFKR-ok által létrehozott biológiai jel esetében is alapvető fontosságú a jel kezdetét szabályozó mechanizmusokon kívül a jel végét meghatározó folyamatok ismerete. A deszenzitizáció (a GFKR szétkapcsolása a G-fehérjétől) és az internalizáció (a sejtfelszíni receptorszám csökkentése) régóta intenzíven kutatott

folyamatok, alapvető szerepet játszanak a receptorok működésének szabályozásában. A GFKR-t kifejező sejt válaszkészségét a deszenzitizáció és az internalizáció a sejtre ható agonista koncentrációhoz illeszti: érzékenysége ismétlődő vagy hosszantartó agonista stimulus esetén csökken (21).

2.1.2.1. A deszenzitizáció

A deszenzitizációnak két alapvető mechanizmusát különböztetjük meg: a heterológ és a homológ deszenzitizációt. A heterológ deszenzitizáció alapja a másodlagos hírvivő-függő kinázok (protein-kináz A és protein-kináz C) aktiválása (22,23). Ezek a kinázok mind az agonistát kötő aktív, mind az inaktív receptorokat egyes szerin és treonin oldalláncaikon foszforilálják és így deszenzitizálják (24). A homológ deszenzitizáció folyamata során G-fehérje receptor kinázok (GRK) foszforilálják a receptort. Fontos különbség az előzőhöz képest, hogy a GRK-k képesek felismerni és megkülönböztetni az agonistát kötő, aktív konformációjú receptort, amelynek foszforilációja és a következményes β -arresztin kötés sztérikusan gátolja a továbbiakban a G-fehérje kötetést és aktiválást (25). A rendelkezésre álló bizonyítékok alapján egyes receptoroknál -mint pl. az 1-es típusú angiotenzin receptor (AT1R)- a másodlagos hírvivő-függő kinázok és a GRK szerepének fontossága a deszenzitizációban agonista koncentráció függő (26). A hét, emberben kifejeződő GRK izotípus közül kettő csak a retinában (GRK1 és -7) a GRK4 pedig szinte csak a herében fejeződik ki. A sokféle szövetben kifejeződő, alapvetően citoplazmatikus GRK2 és -3 C-terminális PH-doménjük segítségével G-fehérje $\beta\gamma$ -alegység- és PIP2-függő (foszfatidil-inozitol-biszfoszfát) módon kerülnek a plazmamembránba és az aktív receptorok közelségébe. A GRK5 lipid modifikáció által, a GRK6 foszfolipidek kötésén keresztül rögzül a plazmamembránhoz (21).

2.1.2.2. Az arresztinek szerepe

A receptor foszforilált tirozinjaihoz arresztin fehérjék kapcsolódnak, sőt csak így jöhet létre teljes homológ deszenzitizáció (27). Mind az agonista kötésekor létrejövő aktív konformáció, mind a GRK általi foszforiláció szerepet játszik az arresztin kötődésében

(28). A családba négy arresztin (1-4) izotípus tartozik, amelyek közül kettő csak a retinában fejeződik ki (arresztin1 és -4). A többi sejtben a β -arresztin1 és -2 (arresztin2 és -3) játszik szerepet a deszenzitizációban és internalizációban. A β -arresztinek és a receptorok kapcsolatának megértéséhez mutációs vizsgálatok, valamint a fehérjék kristálystruktúrájának feltérképezése vezetett (29-31). Általánosságban elmondható, hogy az arresztinek egy rövid α -hélix kivételével β -redőkből és az azokat összekötő hurkokból álló elnyújtott fehérjék. Két fő doménjuket, az N- és C-terminális domént egy poláros mag köti össze. Az aktivált receptor felismerésében és kötésében az N-terminális régió játszik elengedhetetlen szerepet. Ezt követően a C-terminális domén konformációja és a két fő domén egymáshoz való relatív helyzete is megváltozik, így az arresztin aktivált állapotba kerül (32). Az aktivált arresztinek a GFKR deszenzitizációján túl a receptor endocitózisához vezetnek - csökkentve a sejtfelszíni receptor számot -, valamint az utóbbi években jelentős figyelmet élvező G-fehérje független jelátviteli utakat aktiválnak a sejtekben.

2.1.2.3. Az internalizáció

A receptorok által ligandkötés hatására (illetve konstitutív aktivitás esetén annak hiányában is) közvetített jel nagyságát és időtartamát a deszenzitizáció mellett, az internalizáció is befolyásolja. A folyamat során a plazmamembránban elhelyezkedő sejtfelszíni receptorok bekerülnek a sejt belsejébe, amely lehet reverzibilis és irreverzibilis is (32). A GFKR-ok internalizációja klasszikus felosztás szerint klatrin-függő, kaveolin-függő és ezektől független utakba sorolható. A GFKR-ok esetén legintenzívebben kutatott útvonal a klatrin-függő internalizáció. A klatrin szétágazó, háromlábú molekula (triszkelion (33)), amely a 190 kDa nagyságú nehézlánc és -25 kDa nagyságú könnyűláncból álló alegység trimerje. Ez az triszkelion képezi az alapját annak hálózatos struktúrájának, amely az öt- és hatszögeket képez oligomerizációjuk esetén (34). A folyamat kezdeti lépéseként a β -arresztin kötött GFKR a klatrinburkos gödröcskébe kerül. A klatrinburkos gödröcskében, valamint lefűződés után a vezikulában a második legnagyobb mennyiségben előforduló fehérjék az adapter proteinek (AP) komplexei. A GFKR-ok internalizációjában kiemelendő az AP-2

komplex (35). Az aktivált receptorhoz kötött β -arresztin molekula kapcsolódhat közvetlenül a klatrin fehérjéhez vagy az AP-2 komplexen keresztül (36,37). A receptor a klatrinburkos gödröcske lefűződésével jut a sejt belsejébe. A klatrin-függő endocitózissal internalizálódó GFKR-okat két csoportra oszthatjuk a folyamat során mutatott β -arresztin kötés minősége alapján. Az A-osztályba tartozó receptorok (pl. β 2 adrenerg receptor - β 2AR) a β -arresztin2-t nagyobb affinitással kötik, mint a β -arresztin1-et, valamint az arresztin leválik a receptorról a klatrinburkos vezikula lefűződését követően. A B-osztályra ezzel szemben az jellemző, hogy az ide tartozó receptorok (pl. V2 vazopresszin receptor - V2R) a két nem-vizuális arresztin izoformát körülbelül egyforma affinitással kötik. Ez a kötés az internalizáció folyamán stabilan fennmarad és az endocitotikus vezikuláig követhető az arresztin molekula (38). A klatrinburkos gödröcske vezikulaként lefűződik és a sejt belsejébe jut. A lefűződéshez elengedhetetlen a GTPáz aktivitással rendelkező dinamin molekula jelenléte. A GTP-áz aktivitás mutációval vagy GTP γ S (guanozin-5'-O-[gamma-tio]trifoszfát) hozzáadásával történő gátlásával megakadályozható a gödröcske lefűződése a plazmamembránról (39,40).

A receptorok lefűződést követően a korai endoszómákba jutnak, ahol a savas pH hatására a ligand disszociál a receptorról. A korai endoszómákat követően a receptor sejten belüli mozgása több útvonalon keresztül történhet. Az egyes kompartmentek közötti transzport Rab kis G-fehérjékkel jellemezhető. A sejt felszínre - korai endoszóma transzportot követően (Rab5)- a receptor visszajuthat közvetlenül (Rab4) vagy közvetetten, reciklizáló endoszómák érintésével (Rab11, Rab4). A korai endoszómákból a receptorok a késői típusúba juthatnak (Rab7), amelyet lizoszómális degradáció vagy Golgiba jutás követ (Rab9) (41). A lehetséges útvonalakból következik, hogy a GFKR sejt felszíni mennyiségének szabályozása negatív irányba lebontáson keresztül történhet, azonban fontos megjegyezni, hogy a sejt hormonérzékenységének fentartása is endocitotikus folyamatoktól függ. A reciklizáció során a receptor visszajut a plazmamembránba és ismét hormont köthet. Egyes agonisták esetében (pl. morfin) az endocitózis és így a reciklizáció elmaradása az érzékenység csökkenésével és tolerancia kialakulásával jár (42). Az internalizáció azonban történhet β -arresztin független módon is: egyes receptorok caveolin-függő módon kerülhetnek a sejt belsejébe. Ezen receptorok (pl. B-típusú endotelin receptor)

internalizációja érzéketlen domináns negatív β -arresztin jelenlétére, ugyanakkor domináns negatív dinamin hatékony gátolja a folyamatot (43).

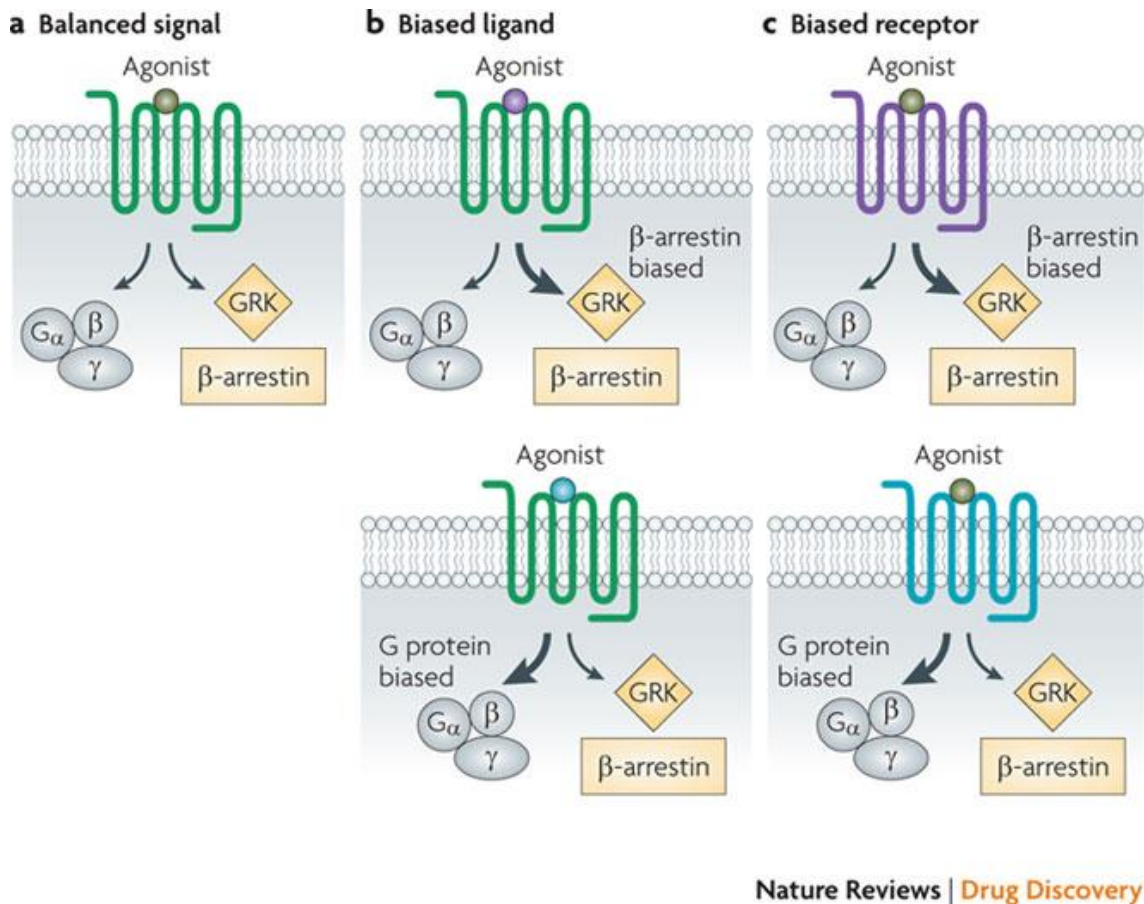
2.1.2.4. β -arresztin függő jelátviteli folyamatok

A β -arresztinek központi szerepét a GFKR-ok működésében az is mutatja, hogy szemben a korai elképzelésekkel, nem csak a receptorok deszenzitizációjában és internalizációjában játszanak szerepet, hanem képesek jelátviteli utakat aktiválni. A β -arresztinek mint adapter fehérjék vesznek részt Src családba tartozó tirozin kinázok aktiválásában, valamint az ERK (extracelluláris jel által regulált kináz), JNK (c-Jun N-terminális kináz) és p38 MAPK (mitogén-aktivált protein kináz) esetében is kimutatták aktiváló hatásukat (44). Az első felfedezést Luttrell és munkatárai tették, bizonyítva hogy a β 2AR (β 2 adrenerg receptor) képes c-Src-t aktiválni β -arresztin1-en keresztül, amely fehérje domináns negatív formájának alkalmazása ERK válasz csökkenést okozott (45). A kutatócsoport kimutatta továbbá, hogy a β -arresztin2-höz közvetlenül kapcsolódik a Raf1 és ERK1/2, a MEK1 (mitogén-aktivált protein kináz kináz 1) viszont csak közvetetten, az előzőeken keresztül (46). Ez az ERK aktiváció azonban különbözhet a G-fehérje függő ERK választól, mint azt az AT1R esetében kimutatták. Egyrészt G-fehérjét nem kötő mutáns receptorral kimutatták, hogy ligandkötés hatására aktiválódik ERK, azonban a a fehérjék magba történő áthelyeződése elmarad. Másrészt, bár a citoszolikus ERK aktivitás kimutathatóan megnövekszik arresztin függő módon, a következményes transzkripció változások elmaradnak (47,48). A β -arresztin függő jelátviteli utak fiziológias és patofiziológias jelentőségét a jelátvitel szelektív agonizmus utóbbi években egyre kiterjedtebb vizsgálata mutatta meg.

2.1.3. Jelátvitel-szelektív agonizmus

A jelátvitel-szelektív agonizmus egyes receptor-ligand komplexek jellemzője, amely komplexek nem az adott sejtre jellemző jelátviteli kaszkádok teljes spektrumú kombinációit aktiválják (pl. G-fehérje aktiválás, deszenzitizáció-internalizáció, β -arresztin függő jelátvitel), hanem „elfogultak” (angol nyelvű irodalomban „bias”) egyes

jelátviteli utak iránt, azokat szelektíven aktiválják. Az alapkonceptió szerint két mechanizmussal jöhet létre jelátvitel szelektív receptor konformáció (3. ábra): vagy a receptorszekvenciában bekövetkező mutáció változtatja meg a fiziológias ligand kötésekor létrejövő konformációt (jelátvitel szelektív receptor), vagy a nem-természetes ligand kötése vezet ilyen konformációhoz (jelátvitel szelektív ligand) (49).



3. ábra

Jelátvitel szelektív ligandok és receptorok működése Rajagopal és munkatársai szerint. (a) Agonista kötődése kiegyensúlyozott jelátvitel esetén G-fehérje és β -arresztin függő útvonalakat aktivál, valamint a receptor deszenzitizációjához és internalizációjához vezet. (b) Jelátvitel szelektív ligand kötődése a receptorhoz elfogultá teszi a jelátvitel a G-fehérje függő vagy β -arresztin függő útvonal felé. (c) Kiegyensúlyozott ligand kötődése elfogult receptorhoz is szelektíven aktiválhat jelátviteli utakat (49).

Az AT1R esetén az elsőre példa a DRY/AAY mutáns receptor, amely nem aktivál G-fehérjét, azonban képes β -arresztint kötni és ERK választ aktiválni (50,51). Egyéb

ligandok is képesek hasonló tulajdonságokkal rendelkező konformáció létrehozni: a módosított AngII, a [Sar¹, Ile⁴, Ile⁸]AngII csak G-fehérje független jelátviteli utakat aktivál és internalizációt hoz létre, G_q-kötés (heterotrimer G-fehérje izoforma) nélkül (46,51). Tágabb értelemben véve jelátvitel szelektívek azon ligandok, amelyek az adott GFKR-hoz kötődve nem aktiválják az összes G-fehérje izotípust. Ezt a jelenséget figyelték meg muszkarinos acetilkolin receptor esetében: a karbakol egyformán aktiválja a G_s és G_q heterotrimer G-fehérjéket, a pilokarpin azonban csak a G_q-függő foszfolipáz C-t aktiválja (52,53). Fontos megjegyezni, hogy nem csak a teljes jelátvitel szelekció (egyes jelátviteli útvonalak aktiválásának teljes hiánya) bírhat jelentőséggel, hanem a részleges jelátvitel-szelektív aktiválás is lehetséges. Az egyes útvonalak aktivációjának hatékonyságát, hatáserősségét és egyéb mérhető paramétereit mátrixba foglalva meghatározható, hogy mennyire kiegyensúlyozott az adott ligand vagy receptor (54). A jelátvitel szelekció farmakológiai és jövőbeli terápiás jelentőségét nem lehet túlbecsülni. β -arresztin knock-out egerekben végzett vizsgálatok kimutatták, hogy G-fehérje szelektív ligandokkal stimulálva a receptorokat csökkenthetővé válna a gyógyszerek biológiai hatékonyságának időben progrediáló csökkenése (tachyphylaxis). A β -arresztinek szerepét a folyamatban igazolták a β 1AR (β 1 adrenerg receptor) - szívelégtelenség, β 2AR - asthma bronchiale és μ -OR (μ opioid receptor) - analgézia vonatkozásában is (55-58). A β -arresztinek által mediált jelátviteli útvonalak jelentőségét mutatják és lehetséges terápiás vonatkozással bírnak egyes jelátvitel szelektív ligandok. A β 1AR függő szelektív β -arresztin aktiválás kardioprotektív hatásokkal rendelkezik, amelyeket ezen jelátviteli útvonal irányában elfogult ligandok (pl. karvedilol) esetében vizsgálnak (59,60). Az AT1R β -arresztin jelátvitel szelektív ligandjának, a TRV027-nek jelenleg klinikai vizsgálatát végzik, mely az akut szívelégtelenség lehetséges terápiájaként szerepelhet (61). A vegyület alkalmazásának előnye az lehet, hogy korábban megfigyelték, hogy a jelátvitel szelektív ligand az artériás középnyomást csökkenti, miközben meglepő módon – szemben az AT1R antagonistákkal - a szív teljesítményét és pumpafunkcióját javítja (62).

2.1.4. G-fehérje kapcsolt receptorok mutációi és klinikai következményeik

A GFKR-ok által precízen szabályozott élettani folyamatokból következik, hogy ezen receptorok mutáció miatti funkcióváltozása betegségek kialakulásához vezethet. A GFKR-ok kutatásának történetéhez szorosan kapcsolódik, hogy egy adott receptor cDNS-ének megismerését általában szorosan követte a szekvenciában bekövetkező mutáció következményeként kialakult betegség megismerése és az ok-okozati viszony felismerése. Körülbelül 30 betegséget ismerünk, amelyek hátterében GFKR mutáció áll. A mutációkat két csoportra oszthatjuk attól függően, hogy hogyan változtatja meg a konformációváltozás a receptor funkciót. Funkcióvesztő mutáció esetén a receptor bazális vagy ligand-indukált aktivitása csökken, illetve megszűnik. Funkciónyerők azok a mutációk, amelyek az egyébként alapaktivitással nem rendelkező receptort konstitutív aktivitással ruházzák fel vagy a bazális aktivitást a vad típusú receptoréhoz képest növelik. A mai napig több, mint 600 funkcióvesztő- és közel 100 funkciónyerő mutációt ismertünk meg (63).

2.1.4.1. A receptor diszfunkció sejtelettani alapjai

A mutáció mechanizmusát tekintve megfigyelhetők misszenz- (aminosav cserét okoz), mRNS leolvási keret eltolódást okozó- (frameshift) és nonszenz mutációk (korai stop kodon miatt leáll a transzláció), illetve előfordulhat nagyobb, komplex szakaszok inzerciója és delécioja. A misszenz mutációk esetén természetesen nagyobb valószínűséggel marad meg a receptor csökkent funkcionalitása, valamint funkciónyerő mutációk esetén az aktivitás fokozódhat is. Nonszenz és frameshift mutációk esetén általában a fehérjeszekvenciának olyan jelentős változása következik be, amely a GFKR működését teljesen lehetetlenné teszi. Hasonló probléma jelentkezik a nagyobb szekvenciadarabok kiesésének vagy eltérő helyre történő beépülésének következményeként kialakuló konformációk esetén is. A Schöneberg és munkatársai által összegyűjtött GFKR mutációkból megállapítható, hogy a többségük misszenz mutáció (65%) (63).

A mutáció többféle módon vezethet a GFKR funkcióváltozáshoz. A receptor szintézis folyamatában okozhat változást azáltal, hogy az eltérő mRNS szekvencia

annak érését befolyásolja. Kimutatták a kalcium érzékelő receptorról, hogy öröklődő mutációja az mRNS splicing-ot befolyásolja, ezáltal a transzláció folyamata során az olvasási keret megváltozása korai stop kodon megjelenését okozza (64). A fehérjeszintézis az endoplazmás retikulum (ER) riboszómáin történik, a receptor a lumenbe jut. A szintézist követően a fehérje felvesz egy olyan konformációt, amely az ER-ből a Golgi-n keresztül a plazmamembránra történő kijutását lehetővé teszi. Ettől eltérő konformáció jöhet létre a mutáció és a következményes rossz fehérje hajtogatódás miatt. Ebben az esetben a rosszul hajtogatódó fehérje nem jut ki a plazmamembránra (65,66). Ez a patomechanizmus igen gyakran vezet GFKR mutáció függő betegség kialakulásához. Először a rodopszinról, majd a 2-es típusú vazopresszin receptorról írták le, hogy mutáció esetén visszamaradnak az ER-ban (67,68). Amennyiben a mutáció ellenére a receptor átjut az ER minőségellenőrző rendszerén, kikerül a plazmamembránra. A plazmamembránban elhelyezkedő mutáns receptor funkcióját befolyásolja a vad típustól eltérő konformáció: érintheti a ligandkötést, G-fehérje kötést és –aktiválást, valamint a jelátvitel és internalizáció folyamatát.

A ligand illetve hormon affinitás csökkenése számos receptor mutációjának esetén bizonyított: kimutatták jelentőségét MC4R, TSHR (tiroideastimuláló hormon receptor), V2R és a GnRHR (gonadotropint felszabadító hormon) által mediált folyamatokban (69-72). Fontos azonban megjegyezni, hogy az affinitás csökkenése nem bizonyítja önmagában, hogy a mutáció miatt megváltozott aminosav részt vesz közvetlenül a ligandkötésben. Elképzelhető, hogy a mutáció miatt megváltozott harmadlagos szerkezet olyan konformációt jelent, amely befolyásolja a ligandkötő zseb hozzáférhetőségét vagy a kötésben esszenciális szerepet játszó aminosavak helyzete változik meg. A ligand affinitás változásával együtt és attól izoláltan is csökkenhet a receptor G-fehérje kötő- és aktiváló képessége. Utóbbi jelenséget mutatták ki az R137H V2R mutációnál. Hasonló elváltozás jelentkezik a Hirschsprung betegséget okozó B-típusú endotelin receptor mutációnál is (73,74).

2.1.4.2. Funkcióvesztő GFKR mutációk

Az előzőekben leírtak szerint nagyobb számban fordulnak elő olyan mutációk, amelyek a receptor funkciót elrontják és kisebb a valószínűsége, hogy a mutáció miatti változás a receptor alap aktivitását fokozza, illetve létrehozza. A mutációk GFKR-ok széles körét érinthetik, számos betegség alapját képezve. Ebben a fejezetben röviden bemutatunk öröklődő GFKR mutációkat és az általuk okozott betegségeket, a Dolgozat központi témájául szolgáló V2R mutációkat és következményeiket a későbbiekben részletesen ismertetjük (75).

A rodopszin génjében bekövetkező mutáció retinitisz pigmentosa betegség kialakulásához vezet. A rodopszin GFKR a retinában elhelyezkedő pálcikák fotonok érzékelését lehetővé tevő fehérje. A mutációi miatt kialakuló betegség az első felismert GFKR függő monogénes öröklődésű betegség (76). A növekedési hormon felszabadító hormon (GHRH) receptorában bekövetkező mutáció a növekedési hormon elválasztásának elégtelensége miatt törpeséghez vezet (77). A kóros elhízások 1-6%-ban a táplálékfelvétel szabályozásában szerepet játszó MC4R mutáció a kiváltó ok (78). Érdekes felvetés ugyanakkor, hogy az MC4R esetén a funkcióvesztés a fiziológiás konstitutív aktivitás károsodását jelentheti (79). A TSH receptorának inaktiváló mutációja a pajzsmirigy működésének elégtelenségéhez vezet a T3/T4 (trijód-tironin/tiroxin) hormonok képződésének, felszabadulásának és a szerv fenntartásának zavara miatt (80). A GnRH receptor funkcióvesztő mutációja hipogonadotróp hipogonadizmushoz, a hormon által szabályozott FSH (follikulus stimuláló hormon) és LH (luteinizáló hormon) receptorának öröklött zavara pedig hipergonadotróp hipogonadizmushoz vezet (81-83). A közel sem teljes felsorolás rámutat, hogy a GFKR által szabályozott élettani folyamatok elégtelensége milyen komplex betegségekhez vezet azok funkcióvesztő mutációi esetén.

2.1.4.3. Funkciónyerő GFKR mutációk

A funkciónyerő mutációk sokkal ritkábban fordulnak elő, mint a funkcióvesztők: mindössze a betegséget okozó GFKR mutációk 13%-ban találtak agonista független

aktivációhoz vezető mutációt (63). A funkciónyerő mutációk kissé eltérő tulajdonságokkal rendelkeznek, mint a funkcióvesztők. Az általuk okozott betegségek általában domináns módon öröklődnek, illetve embrionálisan letálisak lehetnek. Ez utóbbi esetben természetesen csak szerzett formája fordulhat elő a betegségnek. Előfordulhat, hogy a betegség nem jelentkezik súlyos tünetekkel, a szervezet kompenzatórikus folyamatai miatt csak bizonyos társbetegségek esetén kerül felfedezésre a mutáció, mint például a későbbiekben részletesen kifejtett NSIAD (nefrogén kóros antidiurézis szindróma) betegség esetében. Az egyik elsőként felfedezett konstitutív aktivitást okozó GFKR mutáció, amelyet öröklődő betegséghez kapcsolnak, a luteinizáló hormon receptorának (LHR) mutációja. A domináns módon öröklődő, csak férfiakban jelentkező pubertás precox a receptor aktivitás miatt korai életkorban bekövetkező tesztoszteron termelés következménye (84). A TSHR aktivitást fokozó mutációja autoszomális domináns öröklődést mutató veleszületett hipertireózist okoz (85). A parathormon felszabadulását szabályozó CaSR (kalcium-érzékelő receptor) konstitutív aktivitást fokozó mutációi a többi GFKR-hoz képest igen nagy számban vannak jelen a populációban (eddig több, mint 80 ilyen mutáció ismert) (86). A CaSR túlműködésének következménye az autoszomális domináns hipokalcémia.

2.2. Az arginin-vazopresszin rendszer fiziológiája

2.2.1. A vese koncentráló és hígító működése

A szervezet vízhomeosztázisának fenntartásában kulcsszerepet játszik a vese koncentráló és hígító működése. A folyadék egyensúly megteremtésének érdekében és a plazma fiziológiás ozmolalitásának (290-295 mOsm/kg H₂O) biztosításában nemcsak a felvételi oldal (szomjúság), hanem a víz kiválasztása is precízen szabályozott (87). A vese működésének alapvető logikája szerint nagy volumenű, a vérplazma alkotóelemei közül szinte csak a fehérjéket nem tartalmazó szűrlet képződését követően a víz és egyéb anyagok nagy mennyiségben visszaszívódnak a nefronok és gyűjtőcsatornák lumenéből. Az ionokat és vizet tekintve a visszamaradó kisebbik hányad vizeletként kerül eltávolításra a szervezetből. Fiziológiás körülmények között a glomeruláris

filtráció közelítőleg 180 l/nap primer szűrletet produkál, amelynek túlnyomó része visszaszívódik (88). A vízreabszorpció mértékét fiziológiásan a környezeti hatások, úgymint a víz és só bevitel, illetve a kiválasztás aktuális állapota határozza meg. Amennyiben a szervezet vízkiválasztása csökken az egyensúly megtartása érdekében, a vese koncentrált vizeletet választ el, amely az oldott anyagokat a szabályozás következtében nagymértékű reabszorpció után nagy koncentrációban tartalmazza. A híg vizelet esetén nagy volumenű a vizeletképződés, oldott anyagokat kis koncentrációban tartalmaz.

A vízmozgás hajtóereje az ozmotikus gradiens, koncentráló vese esetén a kéregpapilla vonatkozásban egyre növekvő ozmotikus koncentrációt mérhetünk a vese interstíciumában (89). A magas intersticiális ozmotikus koncentráció létrehozásában kiemelt szerepe van a vastag felszálló szegmentumnak (TAL). A TAL vízre nem átjárható, azonban SLC12A1 (nátrium/kálium/klorid transzporter) transzporterek segítségével Na^+ és Cl^- ionokat juttat az interstíciumba (90). Ez a mechanizmus a hosszú kacsú nefronok esetében a víz reabszorpcióján keresztül, rövid kacsú nefronok esetén NaCl lumenbe jutásán keresztül a vastag leszálló szegmentum ozmotikus koncentrációját növeli, megteremtve az ellenáramú sokszorozás lehetőségét. A TAL-t működésének sajátossága miatt hígító szegmentumnak is szokás nevezni. További NaCl eltávolítás megy végbe a disztális kanyarulat csatornában: SLC12A3 transzporter felelős a transzportért (89). A gyűjtőcsatornát elérő filtrátum igen hipozmotikus, további változása a gyűjtőcsatorna vízpermeabilitásától függ: amennyiben nincs további vízmozgás alacsony ozmotikus koncentrációjú vizelet ürül (hígító vese). Ha azonban a vese koncentrálni akar, akkor az arginin-vazopresszin rendszer működésének következményeként az ellenáramú sokszorozó rendszer által felépített ozmotikus gradiens mentén vízreabszorpció történik, a vizelet ozmotikus koncentrációját növelve. Fontos az előzőeket kiegészíteni azzal, hogy a koncentráló működéshez szükséges az urea intersticiális koncentrációjának emelkedése is, amely urea transzport szintén az arginin-vazopresszin rendszertől függ (91).

2.2.2. Az arginin-vazopresszin

A vízhomeosztázis szabályozásában kritikus szerepet játszik az arginin-vazopresszin (AVP), ami egy 9 aminosavból álló peptid hormon. Az arginin megjelölés különbözetit meg a más fajokban fiziológiásan előforduló analógoktól (sertésben például lizin-vazopresszin van jelen) (92). A peptid tartalmaz egy diszulfid hidat a Cys¹ és Cys⁶ aminosavak között. A hormont kódoló AVP gén a hipotalamusz magnocelluláris (szupraoptikus és paraventriculáris mag) és parvocelluláris neuronjaiban fejeződik ki (87). A szintézis során a prekursor fehérje AVP-re, neurofizin 2-re és kopeptinre vágódik (93). Ez utóbbi egyik jelentősége, hogy plazmában történő mérése egyszerűbb lehet, mint a vele ekvimoláris mennyiségben képződő AVP-é (94). A hormon felszabadulását és szisztémás keringésbe jutását a vérplazma ozmolaritásának emelkedése, a magas- és alacsonynyomású baroreceptorok csökkent stimulációja fokozza. A hipotalamusz előbb említett magnocelluláris neuronjai hiperozmolaritás esetén a sejt térfogatváltozására válaszolnak. A szenzoros működés alapja a plazmamembránban elhelyezkedő TRPV1 (tranziens receptor potenciál V1) mechanoszenzitív csatorna jelenléte: depolarizáció jön létre a sejtek zsugorodásakor. A depolarizációt AVP felszabadulása követi (95). Az alacsonynyomású baroreceptorok csökkent aktivitása az alacsony keringő térfogat és csökkent vénás visszaáramlás következménye és hatékonyan emeli a plazma AVP szintet (96). Megfelelő stimulus esetén az AVP felszabadulás helye a hipofízis hátsó lebenye, ahová a magnocelluláris neuronok axonja húzódik. Ebben az anatómiai lokalizációban nincs jelen a vér-agy gát, így a felszabaduló AVP a kapillárisokon keresztül a véráramba jut (97).

2.2.3. Vazopresszin receptorok

Az AVP fiziológiás és patofiziológiás hatásait GFKR-on hozza létre. A sejtélettani következményeket három receptor jelátviteli aktivitása biztosítja: az 1a típusú vazopresszin receptor (V1aR), 1b típusú vazopresszin receptor (V1bR) és 2-es típusú vazopresszin receptor (V2R) ligandja fiziológiás körülmények között az AVP. Jelentős homológiát mutatnak az oxitocin hormon receptorával, bár a V1aR és V1bR izotípusok

jobban hasonlítanak, mint a V2R (98). A hangsúlyt a receptorok ismertetése során a Dolgozat szempontjából központi szerepet betöltő V2R-ra helyezzük.

2.2.3.1. V1aR

A V1aR heptahelikális szerkezetű receptor, amely a vaszkuláris simaizomsejtekben, hepatocitákban és az agyban expresszálódik (98). Jelátvitelére jellemző, hogy a receptor G_q fehérjét képes aktiválni, amely foszfolipáz $C\beta$ -n ($PLC\beta$) keresztül a foszfatidil-inozitol metabolizmust befolyásolja. A foszfatidil-inozitol-biszfoszfát (PIP_2) bontása inozitol-triszfoszfát (IP_3) koncentráció emelkedéshez vezet. IP_3 receptorokon keresztül az endoplazmás retikulumból Ca^{2+} szabadul fel, amely mint másodlagos hírvivő számos további jelátviteli utat képes aktiválni (99). Az erek falában kifejeződő V1aR hatására vazokonstriktió jön létre, amelynek mértéke dózis és szövet függő. Amíg a bőrben, vázizomzatban, hasnyálmirigyben és a pajzsmirigyben erős vazokonstriktor, az agyi, koronária és mezenterialis hatása mérsékeltebb (100). Az agyban az AVP vazodilatációt okozhat, NO felszabadulásán keresztül, amelyet angiográfiás vizsgálatokkal bizonyítottak (101). Kimutatták továbbá, hogy egyazon érben dózisfüggő módon konstriktiót és relaxációt is okozhat az AVP (102). A V1aR a vese medulla ereinek falában is jelen van, ahol az elképzelések szerint a velő perfúzióját szabályozza (103). Kifejeződik továbbá a vese gyűjtőcsatorna interkaláris sejteiben is. Bizonyították, hogy egerekben a V1aR jelenléte szükséges az aldosteron-függő sav-bázis szabályozás működéséhez (104).

2.2.3.2. V1bR

A V1bR-t a többi vazopresszin receptortól eltérő ligandspecificitásának segítségével azonosították patkányok elülső hipofízis lebenyében (105). A receptor által aktivált jelátviteli utak a V1aR-hoz hasonlóan Ca^{2+} mobilizáláshoz vezetnek G_q -fehérjén keresztül. Fiziológiai szerepe kevésbé tisztázott, mint a másik két izoformaé. A V1bR stimulációja a hipofízis elülső lebenyében fokozza az ACTH (adrenokortikotrop

hormon) felszabadulást, ezáltal a stressz válaszban lehet szerepe (106). Emberben is kimutatták memóriára és tanulásra kifejtett hatását (107).

2.2.3.3. V2R

A V2R heptahelikális szerkezete a GFKR-ok rodopszin családjára jellemző tulajdonságokat mutatja: az aktivációhoz szükséges ligandkötésben szerepet játszik a receptor extracelluláris N-terminálisa, a jelátviteli funkcióhoz pedig szükséges a receptor C-terminálisa és a harmadik intracelluláris hurok (98).

A sejtfelszíni receptorszámot a szintézis és az endocitózist követő lizoszómális lebontás vagy plazmamembránra történő visszajutás egyensúlya határozza meg. A szintézis az ER riboszómáin történik, az ER-Golgi útvonalon keresztül jut a receptor a felszínre miközben poszttranszlációs módosulásokon megy keresztül. A receptor glikozilációja a 22-es pozícióban található aszparagin és N-terminális szerin-treonin láncain történik, azonban ezen aminosavak elmutálása bár láthatóan megváltoztatta a glikozilációt, nem érintette a receptor sejtfelszíni kifejeződését és funkcióját (108). Ezzel szemben a receptor palmitoilálása a 341. és 342. pozíció ciszteinjein növeli a sejtfelszíni receptorszámot (elegendő a kettő közül az egyik módosulása). A lipidmodifikáció teljes hiányában csökken a receptorszám a plazmamembránban, de a receptorfunkciót (ligand affinitás, cAMP jel, internalizáció) nem érinti (109). A 112-es és 192. pozícióban elhelyezkedő ciszteinek a feltételezések szerint diszulfid hidat képeznek. A diszulfid híd alapvető szerepet játszik a receptor konformáció kialakításában, bármelyik aminosav elmutálása intracelluláris retenciót okoz, a receptor valószínűleg nem jut át az ER minőségellenőrző rendszerén (110).

A fiziológias ligand, az AVP megkötését követően a V2R jelátviteli utakat aktivál. Mint GFKR, ligandkötést követően heterotrimer G-fehérje függő szignalizációt indít be a receptor. G_s G-fehérjét aktivál, amelynek GTP-kötött α -alegysége adenilát-cikláz enzim aktivitását fokozza (111). Az ATP-cAMP (3'-5'-ciklikus adenzin-monofoszfát) átalakulás következtében a citoplazmatikus cAMP koncentráció hormonstimulus hatására emelkedik. A cAMP hatására párhuzamosan több útvonal

aktiválódhat. Egyrészt a cAMP által szabályozott kináz, a PKA (protein kináz A) aktiválódhat (98). Régóta ismert, hogy AVP hatására V2R-on keresztül a belső velő gyűjtőcsatorna sejtekben emelkedik a citoplazmatikus Ca^{2+} koncentráció (112,113). Gátlószeres vizsgálatokkal bizonyították, hogy a Ca^{2+} oszcilláció, amelyet AVP indukál a gyűjtőcsatorna sejtekben, cAMP-függő és nem befolyásolja a PKA. Szelektív agonistával bizonyították, hogy a Rap-GEF-ként (guanin nukleotid kicserélő factor) megismert Epac (cAMP-aktivált kicserélő fehérje) képes cAMP által szabályozottan Ca^{2+} oszcillációkat létrehozni rianodin receptorokon keresztül (114). A PKA mellett más protein-kinázok, így a PKB/Akt (protein kináz B) is aktiválódik V2R hatására. Ez az aktiváció PI3K-függő (foszfatidil-inozitol-3-kináz) módon történik, több feltételezett útvonalon keresztül: Ca^{2+} /kalmódulin, G-fehérje (mind α -, mind $\beta\gamma$ -alegységen keresztül) és a β -arresztinek szerepét is felvetették (115). Fontos azonban kiemelni, hogy ebben a vizsgálatban ERK1/2 foszforiláció csökkenését mérték, amely ellentétben áll az eredménnyel, amely szerint Src és RTK (receptor tirozin kináz) transzaktiváción keresztül a V2R G-fehérje független módon ERK1/2 útvonalat aktivál belső velő gyűjtőcsatorna sejtekben (116). A munkacsoport később leírta, hogy ebben az esetben a β -arresztinek egyrészt elengedhetetlenek az aktiválás folyamatában, másrészt a transzaktiváció során az inzulinszerű növekedési faktor receptorától (IGFR) függően aktiválódnak és nem azonosak a V2R által közvetlenül aktivált β -arresztin készlettel (117). A vizsgálat egyúttal megerősítette a PI3K aktiváció egyik lehetséges útvonalát, amely szerint IGFR-függő lehet.

Az AVP megkötését követően a V2R a G-fehérje függő jelátviteli utak mellett aktivál GRK-okat. A GRK foszforilálja az agonista kötött receptort. A klasszikus felfogás szerint a következményes β -arresztin kötés szétkapcsolja a V2R-t a G-fehérjétől, majd a receptor internalizálódik klatrin-függő és független útvonalakon. A vizsgálatok szerint a receptor-arresztin komplex stabil, nemcsak a plazmamembrán közelében, hanem a korai endoszómákban is fennáll. A megfigyelés alapján a V2R B-osztályú GFKR az internalizáció szempontjából (118). Az általánosan elfogadott nézetekkel szemben, egy vizsgálat felvetette, hogy a V2R cAMP szignalizációját nem kapcsolja le a β -arresztin kötés a plazmamembránon. A mérések szerint a receptor aktivitása a korai endoszómákban fenntartott, csak később az endoszómális retromer

komplex állítja le a jelátvitelt (119). Az internalizációs mechanizmus működésének szempontjából kritikus elem a V2R C-terminális farkának NPxxY motívuma. A terminális tirozin elmutálása a receptor internalizációt gátolta, ugyanakkor nem érintette az adenilát-cikláz jelátviteli út működését (120). Szemben az GFKR-nál általános mechanizmussal (a korai endoszómában történő megjelenés és ligand disszociáció után a receptor rövidebb vagy hosszabb útvonalon visszakerül a plazmamembránra vagy lebontásra kerül) a V2R rendelkezik néhány különleges tulajdonsággal. Kimutatták, hogy a V2R nem képes hamar visszajutni a plazmamembránra (118). Az is régóta ismert, hogy a lizoszómális degradációra kerülő receptorokkal együtt az AVP is kimutatható a kompartmentben (121). A V2R lebontása ubikvitinálódás függvénye: alaphelyzetben lassú ez a folyamat, ligand kötését követően azonban felgyorsult ubikvitináció mérhető (122). A teljes képet a V2R internalizációt követő reciklizációjáról és lebontásáról Bouley és munkatársai tárták fel. A jelenlegi elképzelés szerint a V2R az internalizációt követően teljes mértékben lizoszómális degradációra kerül, a membránra kijutó receptorok mind *de novo* szintézis termékei. A fehérjeszintézis gátlása esetén a munkacsoport nem tudott plazmamembránra kijutó V2R-t kimutatni. Mindez összhangban áll az elképzeléssel, hogy a vesevelőben uralkodó speciális körülmények között (hiperozmotikus és alacsony pH-jú közeg) történik a V2R AVP kötése. A savas karakterű endoszómákban ezért nem disszociál az AVP, így a receptor reciklizációja sem történhet meg (123). Azonban nemcsak az internalizációt befolyásolja a hiperozmotikus és acidótikus környezet, az AVP-V2R specifikus interakciót is biztosítja a belső velőben. Ilyen körülmények között a V1aR AVP affinitása lecsökken, illetve a receptorcsalád ligandja, az oxitocin sem kötődik a V2R-hoz (124).

A V2R eloszlása és működése a szervezetben

V2R a vesében

A vese gyűjtőcsatornáiban található V2R alapvető szerepet játszik a vízhomeosztázis szabályozásában. A legnagyobb mennyiségben a gyűjtőcsatorna fősejtjeinek bazolaterális membránjában található a receptor. Kimutatták azonban jelenlétét az apikális membrán ciliumaiban is (125). Bár a vizsgálatok tárgya nagyjából a

bazolaterális V2R volt, ciliopátiák mutatják, hogy fiziológias funkcióval bírnak (126). A gyűjtőcsatorna epitél sejtjeinek vízpermeabilitását és így a koncentráls-hígítás szabályozását a V2R aquaporin (AQP) csatornák sejten belüli elhelyezkedésének regulációján keresztül végzi. Az AQP3 és -4 csatornák folyamatosan jelen vannak a sejt bazolaterális membránjában, azonban az AQP2 elhelyezkedése V2R-függő (127). Az AVP hormon hiányában az AQP2 intracelluláris vezikulák membránjában található, így az epitél sejt vízre nem átjárható (128). A V2R AVP kötése adenilát-cikláz – cAMP – PKA útvonalon keresztül az AQP2 plazmamembránon történő feldúsulásához vezet (127). A vezikula-plazmamembrán viszonylatban az AQP2 kompartmentek közötti mozgását a V2R mind a kihelyeződés fokozásával, mind a vízcsatorna endocitózisának gátlásával szabályozza (129,130). Az AQP2 Thr²⁴⁴, Ser²⁵⁶, Ser²⁶¹, Ser²⁶⁴ és Thr²⁶⁹ aminosavai az irodalomban általánosan elfogadott foszforilációs helyek (131). A Ser²⁵⁶ a kihelyeződésben bizonyult kulcsfontosságú szabályozási pontnak (132). A Ser²⁶¹ foszforilációja (szintetikus agonisták hatására) csökkenti a plazmamembrán expressziót (133). A Ser²⁶⁹ és előzetes Ser²⁶⁵ foszforiláció endocitózist gátol (134,135). A V2R AQP2 hatásai nem azonos időben jelentkeznek. Az exocitózis szabályozáshoz képest később jelentkezik az aktivált V2R hatása az endocitotikus folyamatokra (89).

Az AQP2 génextpressziós szinten is szabályozott. A V2R hosszú távon befolyásolja a csatorna kifejeződését a cAMP – PKA - CREB (cAMP válasz kötő fehérje) útvonal által fokozott transzkripció fokozással (136,137). A V2R jelátvitelében szereplő Epac fehérje rövid és hosszú távú hatásokért is felelős. Utóbbi az AQP2 kifejezésének regulációját jelenti és független a PKA-CREB rendszertől (138). Az Epac által létrehozott Ca²⁺ oszcillációk a PKA foszforiláció mellett alapvetően szükségesek az AQP2 exocitózisához (114). A vazopresszin a vese gyűjtőcsatornáinak urea permeabilitását is szabályozza V2R-on keresztül. A koncentrálsó vese magas intersticiális urea koncentrációjáért az UT-A1 urea transzporter V2R-függő foszforilációja felelős a belső velőben (139)). A gyűjtőcsatornák mellett a V2R kifejeződik a TAL epitélsejtjeiben is. Az SLC12A1 transzporter működése ebben a szegmentumban V2R által szabályozott, így az AVP a TAL szintjén is szabályozza a vizelet koncentrálsát (140). A Na⁺ kiválasztást is szabályozza a V2R azáltal, hogy a disztális kanyarulat csatorna és a gyűjtőcsatorna ENaC (epitélialis nátrium csatorna) csatornáinak aktivitását fokozza (141).

V2R az endotéliumban

A vesén kívül kifejeződő V2R fiziológias funkciói kevésbé részletesen feltártak. Az endotél sejtek V2R-ainak izgatása a véralvadásban szerepet játszó von Willebrand faktor felszabadulását hozza létre (142). A VIII. faktor felszabadulását serkentő hatása a hemofília A kezelésében lehet hasznos (98).

V2R a központi idegrendszerben

A központi idegrendszer perfúzióját befolyásolta a V2R szelektív agonista dezmozpresszin adása. A perfúzió emelkedése a vaszkuláris rezisztencia csökkenésének következménye volt (143). A receptor jelenlétét reverz transzkripció – polimeráz láncreakció segítségével igazolták patkány hippocampus és cerebellum régiókban (144). A receptor fiziológias funkciója a központi idegrendszerben nem tisztázott, a humán vonatkozás kétséget kizáró kísérletes bizonyítása még várat magára.

2.3. Az arginin-vazopresszin rendszer patológiája

2.3.1. Diabétesz inszpidusz

Az arginin-vazopresszin rendszer koncentrálsási funkciójának alulműködési zavara a diabétesz inszpidusz (DI) betegségszoport. Jellemzője a nagy mennyiségű napi vizelet (>30 ml/ttkg/nap), a hiposztenuria (híg vizelet; <250 mmol/kg) és a folyadékennyisúly fenntartásához szükséges következményes polidipszia. A klasszikus triász (poliuria, polidipszia, hiposztenuria) a DI-t megkülönbözteti a diabétesz mellitustól. DI esetén nincs nagy mennyiségű cukor a vizeletben, eredetileg a nevét is a megkülönböztetés miatt kapta: az inszpidusz „íztelent” jelent. A definíció megkülönbözteti továbbá a többi ozmotikus diurézis formától is.

A DI betegségszoport négy formája ismert (ezekben az esetekben teljesül a fenti definíció): centrális DI (CDI), nefrogén DI (NDI), gesztációs DI és a primer polidipszia (145). A CDI esetén a probléma az AVP elválasztásával van, abszolút vagy relatív hormonhiányos állapot alakul ki. NDI betegségről beszélünk, ha a jelenlévő AVP hormon a vese célsejtek valamilyen defektusa miatt hatástalan. A gesztációs DI a terhességben bekövetkező (kór)élettani változások következménye és bár hasonlóságot mutat a CDI-vel, az eltérő mechanizmus indokolja a különválasztást. Ebben a speciális betegszoportban ugyan elválasztásra kerül az AVP, mégis relatív hiány alakul ki a fokozott lebontás miatt. A primer polidipszia esetében az arginin-vazopresszin rendszer működése zavartalan. Sőt, a nagymennyiségű folyadékbevitelre adott kompenzációs válasznak tekinthetők a változások. A belgyógyászati gyakorlatban külön szokták választani a többi formától az igen eltérő mechanizmus miatt.

CDI és a NDI esetén megkülönböztetünk szerzett és veleszületett formákat. A Dolgozatban csak a veleszületett formákról értekezünk, a szerzett DI patológiája igen szerteágazó és nem kapcsolódik a bemutatandó kutatás koncepciójához. A veleszületett formák a DI-os esetek kb. 10%-áért felelnek (145). A genetikai alapon kialakuló betegségekre jellemző, hogy terápiájuk tervezése csak az egyes mutációk sejtélettani következményének megértésével lehetséges. A következőkben bemutatjuk a veleszületett DI molekuláris szintű alapjait és az ezek alapján alkalmazható lehetséges

terápiás stratégiákat, különös tekintettel a V2R funkcióvesztő mutációk által okozott NDI-re.

2.3.1.1. Veleszületett centrális diabétesz inszpidusz

A veleszületett CDI esetén a genetikai mutáció olyan eltérést okoz, amely csökkent AVP elválasztáshoz vezet. Az *AVP* gén több, mint 50 mutációja ismert, amely mutációk autoszómális domináns vagy recesszív módon öröklődve CDI-hez vezetnek (145). A mutációk többféle mechanizmussal is létrehozhatják a fenotípusra jellemző AVP hiányt. A genetikai megbetegedésekre jellemző protein tekeredési hibából fakadó mechanizmus ismert a CDI esetében is. A mutáció következtében az ER-ban nem történik meg a megfelelő fehérjekonformáció kialakulása, emiatt az nem jut tovább a Golgiba. A CDI ezen formájában az érdekesség, hogy a hibás AVP felhalmozódása citotoxikus és a magnocelluláris neuronok sejthalálát okozza. A mechanizmus egyúttal magyarázat a betegség autoszómális domináns öröklődési mintázatára (146). Hasonló mechanizmusú az a CDI típus, amelyben az ER retenciót súlyosbítja a vad típusú és a mutáns AVP között létrejövő heterodimerizáció. A vizsgálatok szerint a mutáns protein domináns negatív tulajdonsággal bír (147). A magnocelluláris neuronok pusztulásával járó CDI formákra jellemző, hogy az akkumuláció és a következményes sejthalál időben elhúzódó folyamat. Emiatt – szemben a születés után azonnal tüneteket okozó veleszületett NDI-vel - a betegség általában az első életévet követően jelentkezik (148). A recesszíven öröklődő CDI sokkal hamarabb manifesztálódhat. Jellemző továbbá, hogy a betegség megjelenésének súlyossága is változatos lehet (145).

A betegség terápiája az AVP hatásának pótlása az egyébként egészséges V2R-okon. Az AVP adásnak azonban súlyos mellékhatásai lehetnek, amelyek közül kiemelendők a V1aR-on keresztül létrehozott kardiovaszkuláris hatások. A CDI terápiájában az áttörést az AVP analóg dezmpresszin (dDAVP) megjelenése okozta. A dDAVP-t a az AVP strukturális módosításával hozták létre a 1973-ban Manning laboratóriumában (149). A dDAVP előnye, hogy affinitása jelentősen nagyobb a V2R-hoz, mint V1aR-hoz. Ez standardizált körülmények között *in vivo* patkányokban mérve 3000-szer nagyobb antidiuretikus hatást jelent, mint vazopresszor választ (150). A peptid előnyös tulajdonsága, hogy féléletideje és hatástartama hosszabb, mint a

fiziológiás hormoné. A betegek életminőségét jelentősen javította, hogy a desmopresszin készítmények nemcsak parenterálisan, hanem intranazálisan is adagolhatók. Mindezek hatására a dDAVP a CDI betegség terápiájában elsőként választandó szer az elmúlt évtizedekben, jól tolerálható mellékhatásokkal (151).

2.3.1.2. Veleszületett nefrogén diabétesz inszpidusz (NDI)

A veleszületett NDI genetikai alapja az *AVPR2* vagy *AQP2* génekben bekövetkezett mutáció, amely elváltozások szinte minden – a fenotípust egyértelműen mutató - NDI betegen kimutathatók. A veleszületett NDI hátterének felfedezése szorosan összekapcsolódik a betegségben érintett gének klónozásával. Az *AVPR2* gén érintettségét a szekvencia leírását követően több munkacsoport is kimutatta. Egy évvel később került klónozásra az *AQP2* gén és rövidesen kimutatták oki szerepét egyes NDI betegeknél (89). A veleszületett NDI különböző formáit az eltérő öröklődési mintázattal különítjük el a nomenklatúrában. Az *AVPR2* gén mutációin alapuló NDI X-kromoszómához kötötten, recesszíven öröklődik (XNDI). Az *AQP2* mutáció autoszómális domináns vagy recesszív öröklődést mutat (ADNDI és ARNDI).

Autoszómális DI

Az autoszómálisan öröklődő DI formák az *AQP2* csatornában bekövetkező mutációk következményei és a veleszületett DI esetek 10%-áért felelősek. A 12. kromoszómán elhelyezkedő *AQP2* gén terméke a 271 aminosavból álló *AQP2* csatorna. A 6 transzmembrán doménből álló monomer fehérje tetramerizációja hozza létre a vízcsatornát (152). A vízcsatorna sejten belüli elhelyezkedését fiziológiásan a V2R aktivitása befolyásolja a vese gyűjtőcsatorna sejtjeiben. A DI-hoz vezető *AQP2* mutációk mechanizmustól függően recesszív vagy domináns öröklődésmentet mutatnak.

Autoszómális domináns nefrogén diabétesz inszpidusz

Az ARNDI esetében olyan 40 mutáció ismert, amely kóroki szereppel bír (153). A poliuria alapja, hogy a V2R aktivitás fokozódásának ellenére nem következik be a csatornák kihelyeződése az epitelsejt apikális membránjába. Az esetek túlnyomó többségében misszenz mutáció okoz aminosavcserét a vízcsatornában. A megváltozott tekeredés miatt a V2R mutációkra jellemző ER retenció következik be. A felhalmozódó AQP2 fehérjék végül lebontásra kerülnek (154). A felhalmozódó vízcsatornák egy része a kísérletes adatok alapján funkcionális lehet a retenció megszüntetése esetén (155).

Autoszómális recesszív nefrogén diabétesz inszpidusz

A veleszületett DI betegségek közül az ADNDI fordul elő a legritkábban (<1%), az ismert mutációk mennyisége is kevesebb, mint a többi formában. Szemben az előző formával, ADNDI mutációk minden esetben funkcionális csatornát eredményeznek, mert a mutációk kivétel nélkül a csatorna vízvezetésben részt nem vevő C-terminálisán helyezkednek el (153). Ezek a mutációk a csatorna sejten belüli elhelyezkedését befolyásoló irányító szakaszokat érintik, ezért az nem jut ki az apikális membránra (154). Ezek a csatornák nem maradnak vissza az ER-ban és képesek tetramerbe rendeződni (156). Minden olyan tetramer, amely tartalmaz mutáns alegységet, érintetté válik. Ez a gyűjtőcsatorna epitél sejtjének szintjén azt jelenti, hogy minden 16. vízcsatorna funkcióképes a csak vad típusú monomer összetétel miatt (153). Erre vezethető vissza, hogy az ADNDI betegek tüneti későbbi életkorban kezdődnek, enyhébbek, mint az ARNDI-ben és a betegek részlegesen válaszolnak dDAVP adására (154).

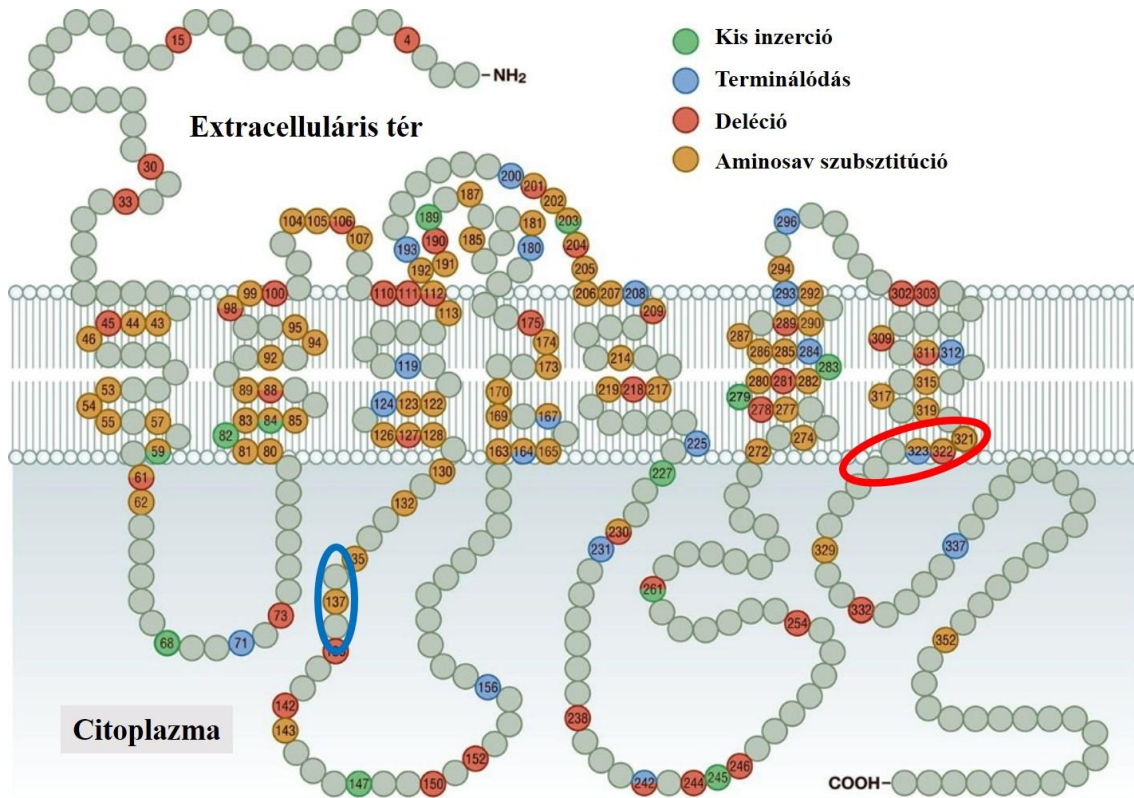
X-hez kötött nefrogén diabétesz inszpidusz

A veleszületett NDI-s betegek kb. 90%-ban a betegség hátterében a V2R funkcióvesztő mutációja áll (153). A betegségre az öröklődésmenetből fakadóan jellemző, hogy túlnyomórészt férfiak érintettek. Ismertek azonban esetek, amelyekben nők is különböző súlyosságú NDI tüneteket mutattak (157). Egy japán populáción végzett

vizsgálat alapján az *AVPR2* mutációt hordozó nők negyedében volt kimutatható poliuria, 6%-ban pedig ez a tünet túlmutatott az enyhe diabétesz inszpiduszon, a teljes formát mutatva (158). A hordozó nőkben létrejövő tünetek alapja az egyenlőtlen X-inaktiváció: az apai és anyai kromoszómák inaktiválódásának aránya a szervezet sejtjeiben normál eloszlást mutat, amelynek maximumhelye az 50-50%-os arányon áll. Léteznek női betegek, akiknek sejtjeiben az inaktiválódási arány eltolódott az egészséges *AVPR2* gént tartalmazó X-kromoszóma kárára (157). Fontos felismerés ugyanakkor, hogy az X-inaktivációs mintázat vizsgálatára általánosságban használt limfociták nem feltétlenül tükrözik a betegségben érintett vese mintázatát (159).

Az XNDI alapját képező *AVPR2* mutációkból jelenleg több, mint 250 féle ismert, amely mutációk kb. 300 családban voltak kimutathatóak (160). Ismert továbbá több, mint 20 polimorfizmus, amelyek a populáció kb. 1%-ban vannak jelen, azonban NDI tüneteket nem okoznak (153). Ugyan a betegek jelentős része egyedi mutációt hordoz, ismertek olyan mutációk, amelyek egyes területen jelentős halmozódást mutatnak. Ilyen mutációk a Hopewell (T71X) és Cannon (L312X) mutációk. Az XNDI incidenciája becsléseken alapul és területi eltéréseket a mutathat: 8,8 ($\pm 4,4$)/1 millió férfi elveszületésre tehető (89).

Spanakis és munkatársai kiterjedt vizsgálattal (326 fő 211-féle mutációja) megállapították, hogy a mutációk közül a leggyakoribb típus a misszenz mutáció, amely 48,34%-os frekvenciával bírt és a családok több, mint a fele érintett volt. A második helyen az 50 nukleotidnál nagyobb szekvenciák deléciója állt (16,66%). Ugyancsak relatíve gyakori típus a frameshift deléció (mérettől függetlenül összesen több, mint 21%) és a nonszenz mutáció (9%). Egyéb típusok lényegesen ritkábban fordulnak elő (160). A receptort sematikusán a 4. ábra szemlélteti, feltüntetve az ismert funkcióvesztő mutációk egy részét és a kiemelt fontosságú DRY- és NPXXY motívumokat.



4. ábra

A V2R és az ismert funkcióvesztő mutációk. Piros kiemeléssel az NPXXY-, kék kiemeléssel a DRY motívum került jelölésre. Moeller és munkatársainak ábrája, módosítva (161).

Az XNDI sejtélettani alapjai

A V2R funkcióvesztésén alapuló XNDI háttérben álló mutációkat sejtélettani mechanizmus és funkció alapján csoportosítják, mintául véve a cisztikus fibrózis klasszifikációját. A csoportok számozásában az irodalomban lehetnek ugyan kismértékű eltérések (külön csoport vagy alcsoport képzés), de a lényegük, illetve a csoportosítás alapja ugyanaz. A mutációk szekvenciájának analízise nem elégséges a csoportba soroláshoz, a mutáns V2R-okat minden esetben funkcionális vizsgálatok alá kell vetni ahhoz, hogy a fenotípust létrehozó sejtélettani mechanizmusra fény derüljön.

I. osztályúak azok a mutációk, amelyek esetén nincs effektív V2R protein szintézis. Ennek oka lehet a mRNS szintézisében, érésében és a transzlációjában is. A mutáns szekvencia megváltoztathatja a promotert, a splicing helyét az mRNS-ben, illetve ismertek olyan mutációk, amelyek az mRNS stabilitását érintik. Fontos, hogy

ebbe a csoportba tartoznak azok a frameshift mutációk, amelyek annyira rövid protein szintéziséhez vezetnek a korai stop kodon miatt, ami gyorsan lebontásra kerül. Ha a degradáció nem történik meg, akkor a V2R mutáns másik osztályba tartozik (153). Az osztályba sorolható példák a korai stop kodont okozó W284X, Q119X, R337X és W71X mutációk (154,162,163). Hasonlóan viselkedik a deléción miatti frameshiftet (és következményes korai terminálódást) okozó 458delG; 161X mutáció (164). A 733-738insG és 700delC mutánsok esetében a transláció elégtelen vagy rendkívül gyors a degradáció, mert nincs protein produktum a sejtekben (165,166).

A II. osztályba tartozik az *AVPR2* misszenz mutációk túlnyomó többsége, így az összes XNDI-t okozó mutációk több, mint 50%-a (154). A típusra jellemző hogy a misszenz mutáció teljes hosszúságú proteint eredményez (nonszenz mutációk is ismertek, késői stop kodonnal), azonban az aminosav csere következtében a V2R nem képes felvenni a megfelelő konformációt (tekeredési defektus) az ER-ban chaperon fehérjék hatására. Az ER minőségellenőrző rendszere a hibásan tekeredett V2R-t felismeri és visszatartja (153). A visszatartott receptorok végül proteozómális degradációra kerülnek (167). Bár a legtöbb esetben a retenció az ER-ban történik, ismertek olyan mutánsok is, amelyek az érés későbbi fázisáig eljutnak, és a Golgiban történik a felhalmozódásuk (168). A terápia szempontjából kiemelendő, hogy az ide tartozó *AVPR2* mutációk funkcióra képes V2R-t kódolhatnak, a probléma az ER retenció miatti alacsony plazmamembrán kifejeződéssel van (160).

A III. osztályra jellemző, hogy a misszenz mutáció teljes hosszúságú V2R proteint eredményez, kijut a plazmamembránra, de a receptor csökkent funkciójú vagy funkciótelen. Egyik altípusában (IIIa) a fiziológiás hormon megkötését követően a mutáns receptor aktív konformációja csökkent G-fehérje kötéssel és/vagy aktiválási tulajdonsággal bír (153). A V2R jelátvitelének ennyire durva hibája a fiziológiás működést ellehetetleníti és XNDI betegséghez vezet. A IIIa osztályba tartozik a D85N és P322S mutáció is. A IIIb altípus (egyres szerzők IV. osztálynak nevezik) elégtelen funkciója a csökkent ligandaffinitás következménye. Míg a IIIa osztályba tartozó mutációk jellemzően a transzmembrán és intracelluláris receptorrégiókban fordulnak elő, a IIIb osztályú mutációk inkább transzmembrán és extracelluláris szakaszokra jellemzőek (153). Míg a ligandkötő zsebben (és környékén) elhelyezkedő aminosavak mutációja IIIb-osztályú elváltozást okoz, addig fontos hangsúlyozni, hogy ez fordítva

nem feltétlenül igaz (165). Eltérő régióban bekövetkező aminosav szubsztitúció miatt is változhat úgy a receptor harmadlagos szerkezete, hogy az a ligandkötéshez kevésbé optimális konformációt eredményezhet.

Az R137H mutáció azonosítása szükségessé tette egy további (IV.) osztály létrehozását, mert az eddigiektől eltérő mechanizmussal hoz létre XNDI-t. Barak és munkatársainak vizsgálata alapján az R137H mutáns agonista jelenléte nélkül, inaktív (G-fehérjét nem kötő) konformációban foszforilálódik és β -arresztint köt. A β -arresztinnel együtt a receptor endocitózisra kerül és intracelluláris vezikulákban halmozódik. A folyamat következménye az alacsony plazmamembrán kifejeződés és AVP érzéketlenség (169).

Ismertek továbbá olyan mutációk, amelyek több osztály tulajdonságaival is rendelkeznek. Jellemzően ezek olyan misszenz szekvencia eltérések, amelyek részleges ER retenciós V2R-t eredményeznek, a receptorok egy hányada kijut a sejtfelszínre. A kijutott receptorok azonban a III. osztályra jellemző zavartól is szenvednek. Robben és munkatársai az R113W, G201D és T204N mutánsok esetén mutattak ki ilyen kombinált mechanizmust (170).

A komplett XNDI teljes V2R funkciózavarral jár és a mutációk túlnyomó többségére ez a forma jellemző. Ismertek azonban olyan mutációk, amelyek bizonyos fokig megtartott V2R funkcióval járnak együtt, ezt a betegséget részleges XNDI-nek nevezi az irodalom (89). Az első megismert részleges XNDI-t okozó mutáció a D85N mutáció volt (171). Ismertek olyan mutációk, amelyek mind részleges-, mind teljes XNDI-t okozhatnak, ilyen például a V88M mutáció (89). A részleges fenotípust okozó mutációk a II. osztályba tartoznak, a megtartott funkció hátterében pedig a változatos arányban plazmamembránra kijutó, ER retenciótól megmenekülő V2R-k állnak.

2.3.2. A veleszületett NDI klinikuma

2.3.2.1. A veleszületett NDI tünetei

A DI betegségcsoport legnyilvánvalóbb tünete a poluria és a következményes polidipszia. A poliuria definíciója a 3 l/nap mennyiséget meghaladó vizeletprodukciónál felnőtteknél és a 2 l/m²-nél nagyobb gyermekeknél (172). A veleszületett DI-os betegek felnőtteként a vízhomeosztázis szabályozásának eredményeként megjelenő szomjúságérzetet extrém vízfelvétellel kompenzálják. Amennyiben a vízfelvétel és a vizelet mennyisége egyensúlyban van, felnőttekben egyéb nyilvánvaló tünetek nem alakulnak ki. A NDI felnőttkorban megfelelő körülmények között nem okoz életveszélyt, ugyanakkor az életminőséget jelentősen rontja. A betegekre jellemző a 10 l/nap mennyiséget meghaladó vizeletmennyiség, amely vizeletürítési gyakoriság és az egyensúly fenntartásához szükséges nagy mennyiségű vízfelvétel precízen szervezett és kompromisszumokkal teli életmódot kíván. Igen hátrányos továbbá a betegekre nézve, hogy a nokturia és éjszakai vízivás gyakorisága miatt gyakorlatilag nem alszanak át egy éjszakát sem. A veleszületett NDI csecsemőkben nyilvánvaló tüneteket okozva hamar felkelti a szülők gyanúját. A poliuria miatt a csecsemő nagyon gyakran, erőteljesen szopik. Ugyanakkor a csecsemők esetében probléma, hogy a gasztrointesztinális rendszerük fejletlensége miatt a nagymennyiségű folyadékfelvétel refluxot, közvetlenül a szoptatás után hányást hoz létre (89).

Az előzőekben leírtak szerint a felnőttek folyadékfelvétellel kompenzálják a poliuriát és általában nem alakul ki súlyos szövődmény az NDI talaján. A csecsemők azonban sérülékenyebbek, mert nem képesek a szülők felé specifikusan a szomjúságérzésüket közvetíteni. A nagymennyiségű, híg vizelet produkció nem-adekvát folyadékfelvétellel kombinálódva hipernatrémiás hipovolémiát okozhat a csecsemőkben (89). Az ismétlődő hipernatrémiás dehidráció a gyermekek mentális retardációját vonhatja maga után (173). A fejlett világ egészségügyi rendszerében a hipernatrémiás hipovolémia kezelhető állapot, így az NDI talaján kialakuló mentális retardáció extrém ritka. Ugyanakkor kimutatták, hogy az NDI-s gyermekek között igen gyakori a figyelemhiányos hiperaktivitás-zavar (174). Bockenbauer és Bichet felvetette, hogy ez a zavar állatkísérletek alapján lehet a magasabb plazma AVP koncentráció központi

idegrendszeri hatásának is a következménye is (89). Fontos azonban megjegyezni, hogy ez esetben nem akut AVP hatásról lehet szó, hiszen a vizsgált iskoláskorú gyermekek már képesek egyensúlyt tartani vízfelvétellel, így nem várunk emelkedett Na^+ és AVP plazmakoncentrációt.

2.3.2.2. A veleszületett NDI diagnózisa

A veleszületett NDI diagnózisának felállításához szükséges differenciáldiagnosztikai lépéseket klinikai ajánlások foglalják össze és szabályozzák (175). A következőkben ezeket ismertetjük. A poliuria differenciáldiagnózisa során az ozmotikus diurézis különböző formáit és a primer polidipsziát kell a DI betegségcsoporttól elkülöníteni. A DI csoporton belül a veleszületett – szerzett, centrális – nefrogén formák felismerésén van a hangsúly. A diagnosztikus stratégia szerint az anamnézis (kifejezetten fontos a családi anamnézis) felveti a gyanút, amelyet specifikus klinikai tesztek erősítenek meg. Szabad folyadékfelvétel mellett a plazma nátrium koncentrációja ritkán hasznos. A veleszületett NDI esetén a pontos eltérés csak a genomiális DNS megfelelő génjeinek szekvenálásával állapítható meg.

Anamnézis: a poliuria megjelenésének ideje alapvető segítséget nyújt a differenciáldiagnózisban. A felnőttkorban, hirtelen jelentkező DI szinte kizárólag a szerzett forma esetén fordul elő. A veleszületett NDI túlnyomó részt a születést követő első héten poliuriával jelentkezik, a veleszületett CDI az első életévben, igen ritkán fiatal felnőttkorban jelentkezik (145). A korábbiakban leírtaknak megfelelően az ADNDI és ARNDI esetében is van megjelenési eltérés a patomechanizmus különbözősége miatt.

Családi anamnézis: Mind a CDI, mind az NDI veleszületett formáiban a családi anamnézis precíz felvételével jellegzetes halmozódást lehet felfedezni. Az öröklődési mintázat (X-hez kötött – autoszómális) alapvető segítséget nyújt az NDI-ben érintett genetikai háttér becsléséhez.

Vizeletürítés mérése: a napi vizelet mennyiség mérése a DI betegségcsoport diagnosztikus követelményei közül a legalapvetőbb.

Plazma- és vizelet laboratóriumi vizsgálata: a poliuria háttérében álló CDI, NDI és primer polidipszia betegségeket a vizelet alacsony ozmolaritása különbözteti meg az

ozmotikus diurézisektől. Szabad vízfelvétel mellett a felnőttekben nem várható hipernatrémia, de magas-normális plazma Na^+ koncentráció alacsony vizeletozmolalítással előfordulhat és segíthet a diagnózis felállításában. Normális plazma Na^+ koncentráció melletti 600 mOsm/kg víz feletti vizelet ozmolaritás kizárja a DI lehetőségét. A hipernatrémia a csecsemőkben alacsony vizeletozmolalítással párosulva előfordulhat és nagy segítség a DI felvetésében. Alacsony plazma Na^+ (<137 mM) és vizeletozmolalítás (kevesebb, mint a plazmaozmolalítás fele) a primer polidipsziára patognómikus.

Vízmegvonás teszt: a primer polidipszia, a CDI és NDI elkülönítésének „gold-standardja” a vízmegvonás teszt. A vízmegvonás során egészséges egyéneknél a plazmaozmolalítás emelkedése az AVP koncentráció fokozódásán keresztül a vizeletozmolalítás emelkedését vonja maga után. Egészségesekben a 295-300 mOsm/kg plazmaozmolalítás elérése és/vagy 145 mM plazma Na^+ koncentráció meghaladása maximális vese AVP hatást hoz létre, így a teszt során diagnosztikus célból adott dDAVP nem fejt ki további vizeletkoncentráló hatást. A teszt során a felnőttek vízmegvonása 600 mOsm/kg víz feletti vizeletozmolalítás végpontnál befejeződik, mert intakt AVP felszabadulást és hatást jelez. A primer polidipsziás betegek diagnózisa ennél a végpontnál felállítható. Nincs olyan részleges DI, amely ezt a vizeletozmolalítást lehetővé tenné. Amennyiben az előző végpontot a teszt során nem éri el a beteg, dDAVP-t adunk a következő köztes pontok elérésekor: az emelkedő plazmaozmolalítás ellenére a vizelet ozmolalítása stabil 2-3 egymást követő óránkénti mérésben vagy a plazma ozmolalítása meghaladja a 295-300 mOsm/kg víz értéket és/vagy a 145 mM plazma Na^+ koncentrációt. Az intravénás (hozzáférhetőség 100%) vagy intranazális (kevésbé invazív) dDAVP adást követően elkülöníthetők a centrális és nefrogén DI formák. NDI-ben nincs dDAVP válasz, CDI-ben pedig több, mint 100%-os vizeletozmolalítás emelkedést mérhetünk. A részleges formák esetén a dDAVP adása után létrejön válasz, sőt az emelkedés százalékosan nagymértékű lehet. Az elkülönítést egyértelművé teszi a jelenség, miszerint a CDI esetén a vizelet izozmotikus vagy hiperozmotikus lesz az agonista hatására, szemben a részleges NDI-vel. Gyermekekben a teszt kissé módosított változatát végezzük. Csecsemőkre és kisgyermekekre veszélyes lehet a vízmegvonás, ezért a korábban leírt laboratóriumi tendenciák esetén csak a dDAVP adás történik meg (hiszen a primer polidipszia már kizárásra került). Ha mégis

sor kerül a megvonásra, az szigorú monitorizálás mellett történik, számos biztonsági végpont által határoltan.

AVP koncentráció mérése: Az AVP koncentráció mérése történhet a plazmában és a vizeletben is. A korábban leírtak szerint, a mérésnek csak a vízmegvonásos teszt alatt van értelme, egyébként nem informatív. A hormon koncentrációjának emelkedése a teszt alatt kizárja a CDI-t, az emelkedés mellett létrejövő megfelelő vizelet koncentráció pedig kizárja az NDI-t. A tesztnek komoly limitációi vannak: az egyes tesztek érzékenysége igen alacsony lehet, az AVP pedig instabil a plazmában (176). A korábban említett kopeptin mérés jelenthet megoldást a problémákra.

2.3.2.3. A veleszületett NDI terápiája

A klinikumban rutinszerűen alkalmazott terápia csak szupportív, a tünetek enyhítésére koncentrálni, a poliuriát megszüntetni nem tudja. Az NDI, a V2R és az AQP2 elmúlt két évtizedben intenzív kutatási témák voltak, így több nem-konvencionális terápiás stratégia is felvetésre került. Ezen új lehetőségek a sejtelettani patomechanizmusok megértésén alapulnak, és biztató jövőképet festenek a veleszületett NDI terápiájában.

Jelenlegi terápia

Diéta

A vese működéséből következik, hogy a kiválasztott vizelet térfogata az ozmotikus terheléstől függ. A megfelelő formulákkal kiszámolható az az optimális ozmotikus terhelés, amelyet a táplálékfelvétellel juttat be a beteg (177). Természetesen fontos ügyelni arra, hogy a csecsemőkorban a folyadék és energia bevitel szorosan összefügg, ezért az ozmotikus terhelés minimalizálása mellett kell biztosítani a megfelelő protein és energia bevitelt (89).

Tiazid diuretikumok

A tiazid diuretikumok igen régóta a klinikumban használt terápia sarokkövei, ugyanakkor működési mechanizmusuk nem teljesen tisztázott. A tiazid diuretikumok hatását az 1950-es években bizonyították (178). Egészen az elmúlt időszakig a vegyületek működési mechanizmusában a tiazid diuretikum-érzékeny SLC12A3 transzporter szerepét tartották egyedülállónak. Az elképzelés szerint a transzporter gátlása csökkenti a disztális kanyarulat csatornában a NaCl rezorpciót, amely következményes vizelet ozmolalitás emelkedéshez vezet. A Na⁺ veszteség miatt csökken a keringő térfogat, amely végül a glomeruláris filtráció csökkenésén keresztül járul hozzá a vizelet mennyiségének redukációjához (89). Az elmélet azonban nem alkalmas önmagában ezen diuretikumok hatásának megértéséhez. Egy közelmúltban publikált közlemény szerint a tiazidok hatása megmaradt a transzportert kódoló gén *knock out* egerekben. A jelenség magyarázatában a Na⁺ visszaszívás csökkenését tartották kulcspontnak. A szénsav-anhidráz gátlása tiazid diuretikummal a munkacsoport szerint növeli a proximális tubulusban a Na⁺ koncentrációt, amely a tubuloglomeruláris feedback mechanizmus által a filtrációt és így a vizelet mennyiségét is csökkenti (179).

PGE2 szintézis gátlók

A nem-szteroid gyulladásgátlók közül a klinikumban az indometacint használják a NDI-os betegek tiazid terápiájának kiegészítésére. A feltételezések szerint az indometacin csökkenti a PGE2 (prostaglandin E2) Na⁺-rezorpció gátló hatását. A proximális tubulus fokozott só visszaszívása vízmozgással jár, ami végül csökkenti a kiválasztott vizelet mennyiségét (180). A mechanizmus előnyös hatása DI-ban az 1980-as évek óta ismert (181).

Ígéretes terápiás lehetőségek

V2R antagonisták

A NDI lehetséges jövőbeli terápiájának legígéretesebbjei a farmakológiai chaperonként funkcionáló nem-peptid V2R ligandok. NDI-t okozó V2R mutáción mutatták ki Morello és munkatársai, hogy a II. osztályba tartozó mutáns receptor funkciója

megmenthető (182). A koncepció nemcsak a V2R mutációk vizsgálatában jelentett óriási áttörést, hanem hasonló patomechnizmussal tüneteket okozó, más GFKR funkcióvesztő mutációinak lehetséges terápiájának bizonyult (183). Az ER retencióban szenvedő V2R funkcionálisan ép lehet (tehát képes ligandot kötni és jelátviteli utakat aktiválni), de nem jut ki a sejtfelszínre, ahol a fiziológias peptid agonistával, az AVP-vel találkozhat. A V2R nem-peptid antagonistái sejtpemeabilis ligandok, átjutnak a plazmamembránra, a receptorhoz kötődve az ER-ban a V2R konformációját megváltoztatják. Az antagonista-V2R komplex új konformációja átjut az ER minőségellenőrző rendszerén és a receptor kijut a plazmamembránra. A farmakológiai chaperon elnevezés a vegyületek tulajdonságaira utal: chaperonként segítik a receptor megfelelő hajtogatódását és szemben a kémiai chaperonokkal, amelyek a fehérjék érését nem specifikusan segítik, ezek a vegyületek egy adott receptor ligandjai. Az antagonista a plazmamembránra kijutott receptorról disszociál, így képes ahhoz a fiziológias agonista kötődni és jelátvitelt aktiválni. Morello és munkatársai felfedezését számos vizsgálat követte, amelyek alapján számos mutációt képesek az antagonisták megmenteni (184-187). Szerencsére a V2R-függő NDI betegségek nagy része misszenz mutáció miatt alakul ki (ebben az esetben van esély arra, hogy a receptor funkciójának egy része megmaradjon) és ezek közül igen gyakoriak a II. osztályba tartozók, amely körülmények a terápiás metódus fontosságát hangsúlyozzák. Az *in vitro* kísérleteket egy esetben *in vivo* klinikai vizsgálat követte. Az eddig egyetlen XNDI-s betegekben végzett vizsgálatban a V1aR specifikus SR49059 vegyületet használták. A szerzők elgondolása alapján a kisebb V2R affinitás ugyan mérsékeltebb ER kimentést és plazmamembrán expressziót okozhat, de előnyösebb az AVP bekötésének szempontjából a gyorsabb antagonista disszociáció. A vizsgált öt betegben a vegyület sikeresnek bizonyult, ugyan mérsékelten, de csökkentette a vizelet mennyiségét (188). A későbbi felhasználást sajnos limitálja, hogy a vegyület egyéb klinikai vizsgálatokban hepatoxikusnak bizonyult és betiltották. Ez azonban nem zárja ki a lehetőségét, hogy más vegyületek a későbbiekben a terápia részévé váljanak.

V2R agonisták

A nem-peptid V2R agonisták kis száma és korlátozott elérhetősége miatt eddig egy *in vitro* vizsgálat mutatta be a vegyületek ígéretes hatékonyságát. Robben és munkatársai három nem-peptid agonista működését vizsgálták ER retencióban. Az antagonistákkal szemben egyértelműnek tűnik az agonisták előnye a hiányzó receptor-gátló hatás miatt. A munkacsoport azonban további érdekességeket tárt fel. A vegyületek intracelluláris receptorok jelátvitelét voltak képesek aktiválni, anélkül, hogy az aktivált receptorok degradálódtak volna, szemben a plazmamembrán elhelyezkedésű V2R-ral (189).

Prostaglandin receptor agonisták

XNDI egérmodellben mutatták be először az prosztaglandin E2 EP4 receptorának stimulációját követő vizeletkoncentrációt és volumencsökkenést (190). A jelenség hátteréül a V2R független cAMP jelpálya aktiválás szolgálhat, amely kihelyezi az AQP2-t a gyűjtőcsatornák apikális membránjába. Hasonló vizelethatásokkal bírt az EP2R agonista adása V2R gátolt patkányokban (191). A koncepció teljes elfogadása várat magára, mert éles ellentétben áll a korábbiakban is említett indometacin terápiával (177).

Szekretin receptor agonisták

A szekretin receptor agonisták használata hasonló alapon működhet XNDI-s betegben, mint a prosztaglandin agonistáké. A gyűjtőcsatornasejtek G_s-kapcsolt szekretin receptorainak izgatása áthidalná a V2R mutáció okozta defektust. *AVPR2* kondicionális knock out egerekben az agonista jelentősen emelte a vizelet ozmolalitást (192). Agyályokat vetn fel azonban a szekretin egyéb hatásainak súlyossága (hányás, hasmenés, ájulás).

Foszfodiészteráz gátlók

A gyűjtőcsatornák cAMP szintjének emelése a lebontás gátlásával megoldást jelenthetne a NDI-s betegek számára. Sajnos, amíg a vegyületek egérmodellben emelték a cAMP koncentrációt a sejtekben, emberben hatástalanoknak bizonyultak (177).

2.3.3. Kóros antidiuretikus hormon szindrómák

2.3.3.1. „Centrális” kóros antidiuretikus hormon szindróma

Az arginin-vazopresszin rendszer alulműködési zavara nefrogén diabétesz inszpidusshoz vezet, túlműködési zavarát kóros antidiuretikus hormon szindrómának hívjuk (syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion- SIADH). A betegséget Schwartz és munkatársai írták le 1957-ben, egyes könyvek Schwartz-Bartter szindrómának is hívják (193). A betegség hiponatrémiát okoz a túlzott AVP szekréció és a következményes vizeletkoncentráció miatt. A SIADH jelenlegi ismereteink szerint csak szerzett lehet, nem ismerünk „centrális” veleszületett formát. A betegség kialakulásának hátterében gyakrabban ektópiás AVP termelés áll, különösen a tüdő kissejtes karcinómái képesek a hormon kifejezésére (194). A központi idegrendszer érintettsége is gyakran szerepel az okok között. Iszkémiás és vérzéses stroke, valamint fertőzések és koponya-agyi trauma lehet az etiológia. Egyéb, ritkábban szereplő kórok is előfordulhatnak, az exogén AVP (illetve dDAVP) adáskor hematológiai zavarokban (195). A betegség kezelési lehetőségei közül kiemelendő a V2R inverz agonista tolvaptan terápiás hatása (196).

A krónikus SIADH-ban a betegek érdekes módon nem koncentrált vizelet választhatnak ki az AVP-escape mechanizmus miatt. Ez azt jelenti, hogy a kezdeti koncentrált vizelet kihígul, a plazma Na^+ koncentráció pedig egy új, alacsony szinten stabilizálódik (197). A mechanizmus egyes részletei állatmodellben már tisztázottak. Egyrészt csökken, másrészt az ozmolalitástól függetlenné válik az AQP2 kifejeződése (198,199). A koncentráció csökkenésének másik komponense az egyébként AVP-függő expressziót mutató UT-3 transzporter gyűjtőcsatorna bazolaterális membránjában történő megjelenésének csökkenése (200,201).

A SIADH betegségnek a későbbiekben részletezett veleszületett renális formája alacsony plazma AVP koncentrációval jár együtt. A hormon szintje azonban nem különbözteti meg a SIADH szerzett, „centrális” formájától, differenciáldiagnosztikai szempontból kiemelendő, hogy előfordul SIADH alacsony, sőt mérhetetlenül alacsony AVP szinttel. Felvették, hogy emiatt helyesebb lenne az elnevezésben „antidiuretikus

hormon” helyett „antidiurézis”-t használni és így SIAD-nak rövidíteni a betegséget (202). Az irodalomban „ozmosztát rezet”-nek hívják, a termosztát-hőmérséklet szabályozó analógiájára (203). Egyes betegségekben (hipovolémia, kvadriplégia, pszichózis, malnutrició) az ozmoreceptorok egyébként normális szabályozó funkciója egy új, a fiziológiásnál alacsonyabb szintre áll be. A betegeknek stabil, enyhe hiponatrémiája van, változó só- és vízbevitel mellett. Ebben az esetben terápia nem szükséges, a kiváltó okot kell kezelni (195).

2.3.3.2. Nefrogén kóros antidiurézis szindróma

A nefrogén kóros antidiurézis szindróma (nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis-NSIAD) egy közelmúltban feltárt betegség. A Feldman és munkatársai által 2005-ben leírt kórkép a SIADH veleszületett, nefrogén formája (202). A betegség kialakulásának a középpontjában a V2R funkciónyerő mutációja áll. A betegséget egy 3 hónapos és egy 2,5 hónapos fiú csecsemőben diagnosztizálták, akik irritabilitással és generalizált rohamokkal kerültek felvételre. A fiatal életkor és a mérhetetlenül alacsony AVP szint alapján merült fel a V2R funkciónyerő mutációjának lehetősége a vizsgálatot végzőkben. *In vitro* vizsgálat megerősítette a feltevést, a mutáns R137C és R137L receptorokat kifejező sejtekben jelentősen emelkedett bazális (agonista stimulus hiányában) cAMP koncentrációt mértek. A vizsgálatban kontrollként az addig már ismert R137H mutációt használták, amely IV. osztályú mutánsként NDI-t okoz.

Rochdi és munkatársai vizsgálták tovább sejtes rendszerekben az említett receptorokat. Kísérleteikben igazolást nyert, hogy az NSIAD-hoz vezető konstitutív aktivitás az R137C/L receptorok konstitutív β -arresztin kötésével és internalizációjával jár együtt. Az internalizáció gátlása tovább fokozta az R137C/L receptorok aktivitását. Ezek alapján arra a következtetésre jutottak, hogy amíg a konstitutív internalizáció az R137H mutáció esetén létrehozza az NDI fenotípust, addig az NSIAD-os betegek tüneteit mérsékli. Az emelkedett bazális aktivitással bíró mutáns receptorok cAMP termelése AVP adásával nem volt tovább fokozható, továbbá nem volt gátolható V2R agonista tolvaptan vegyülettel. Ugyanakkor AVP adása az internalizációt fokozta, így felvetették a lehetőségét, hogy a betegek kezelésénél is ezt a jelenséget kellene kihasználni. Mivel az aktivitás nem fokozódna AVP hatására, az alacsonyabb

plazmamembrán receptorszám a tüneteket enyhíthetné (204). A felvetés klinikai felhasználhatóságát limitálja, hogy az említett terápia súlyos mellékhatásokkal járhat. Más agonista (dDAVP) felhasználhatósága felmerül, illetve az eredeti közlemény szerint a gyermekek állapotát végül szupportív terápia rendezte (202).

Egészen 2012-ig kellett várni a második mutációs lókuszfelfedezésére. Az R137C/L mutációk mellett a jelenlegi ismereteink szerint csak a Carpentier és munkatársai által publikált F229V mutáció ismert, mint NSIAD-ot okozó genetikai eltérés. A mutációt a kutatók egy 3 hónapos fiú csecsemőben azonosították, aki felső légúti infekcióval és apnoeal került hospitalizációra. A kivizsgálás során azonosították hiponatrémiáját és alacsony plazma AVP szintjét. A későbbi hónapokban az apnoe ismétlődött, felvételt követően perzisztáló hiponatrémiát és rendkívül alacsony AVP koncentrációt mértek. Genetikai vizsgálat vetette fel, hogy az F229V, mint ismeretlen mutáció NSIAD-ot okozhat. A mutáns V2R *in vitro* vizsgálata az addig ismert R137C/L mutánsoktól eltérő tulajdonságokat tárt fel. Az F229V-V2R konstitutív cAMP termelése nem jár együtt β -arresztin kötéssel és internalizációval. További fontos különbség, hogy a receptor káros aktivitása V2R inverz agonista tolvaptannal és satavaptannal gátolható, AVP-vel tovább fokozható volt. Mindezek alapján a szerzők felvetették, hogy ezen mutációt hordozók esetén a tolvaptan lehet a terápia alapja. Fontos továbbá megjegyezni, hogy e mutáció publikációjáig az irodalom az NSIAD felismerésében a tolvaptan-rezisztens SIADH klinikai képének szükségességét hangsúlyozta (205).

Jelenleg az eddig bemutatott R137C, R137L és F229V NSIAD mutációk ismertek. Felvetették, hogy a V266A mutáció is esetleg hasonló eltéréshez vezethet, de Armstrong és munkatársainak eredményei alapján a V266A polimorfizmus, amely nem vezet NSIAD-hoz (206,207). A mutációk felfedezését követően az R137C eltérést kimutatták más hiponatrémiás családokban is. Az érintett családok közös jellemzője, hogy amíg a betegség felnőttekben tünetmentes lehet, a csecsemők fokozott vulnerabilitást mutatnak, a tünetek leggyakrabban tónusos-klónusos, generalizált görcsök formájában jelentkeznek (206-208).

3. Célkitűzések

Kísérletes munkánk alapkonceptiója betegséget okozó GFKR mutációk vizsgálata volt. Bár számos betegség patomechanizmusában funkcionyerő vagy –vesztő GFKR mutációk játszanak alapvető szerepet, vizsgálataink középpontjába a V2R-t helyeztük. Alapfeltevésünk szerint a V2R mutációk intenzív kutatásának ellenére létezhetnek ismeretlen mutációk, illetve az ismertek csak kis töredékének esetében feltárt a mutáció sejtélettani következménye. Munkahipótesisünk szerint a klinikai betegség azonosítását követően genetikai vizsgálatokkal az *AVPR2* gén mutációja, mikroszkópos és funkcionális vizsgálatokkal a következményes patológiás eltérés molekuláris mechanizmusa felderíthető, valamint az eredmények alapján terápiás stratégia is felvethető.

A Dolgozatban bemutatott kísérletekben a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Milyen genetikai eltérés mutatható ki a II. sz. Belgyógyászati Klinikán kezelt nefrogén diabétesz inszpiduszos betegben? Az eltérés milyen sejtélettani következményekkel jár, mi a betegség patomechanizmusa? Milyen terápiás stratégia lehet célravezető a konvencionális terápiára nem reagáló betegnél?
2. Van-e hatása a receptor funkcióra egy németországi családban azonosított, eddig nem ismert, NSIAD betegséghez vezető V2R mutációnak? Milyen tulajdonságokkal jellemezhető a mutáció miatt létrejövő receptor konformáció? Milyen terápiás módszer jöhet szóba a mutációt hordozó család esetében?

4. Anyagok és módszerek

4.1. Felhasznált anyagok

A molekuláris biológiai módszerekben felhasznált enzimeket és puffereket a Fermentas (Vilnius, Litvánia) és a Stratagene (La Jolla, CA, USA) cégektől vásároltuk. A DMEM (Dulbecco által módosított összetételű Eagle médium), Opti-MEM®, pcDNA™ 3.1, magzati borjú szérum (FBS), Lipofectamine 2000™, Versene® anyagokat az Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) cégtől vásároltuk. A cölelenterazine h-t a Regis Technologies (Morton Grove, IL, USA) szállította. Az anti-HA Alexa488 a Life Technologies, illetve névváltást követően a Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, CA, USA) cégektől rendeltük. A sejt kultúrák fenntartásához, transzfekciókhoz és a mérésekhez használt edényeket a Greiner Bio-One-tól vásároltuk (Kremsmünster, Ausztria). A mérésekben használt HEK-293 (humán embrionális vese) sejteket az ATCC-től (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) szereztük be. Minden más, külön nem jelölt anyagot a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) cégtől vásároltuk.

A vizsgálatainkban használt 2-es típusú vazopresszin receptor cDNS-ét (a klón azonosítója: AVR0200000; GenBank száma: AY242131) az S&T cDNA Resource Center-től vásároltuk. Az Epac-BRET szenzorhoz felhasznált TEPAC^{vv} konstrukciót Dr. Kees Jalink fejlesztette és bocsátotta rendelkezésünkre (209). Az eYFP-N1 (sárga fluoreszcens fehérje, Clontech, Mountain View, CA, USA) konstrukciót vásároltuk. A β -arresztin2 konstrukciók alapját képező β -arresztin2-eGFP plazmidot Dr. Marc G. Carontól kaptuk. Ebből kiindulva a β -arresztin2-mVenus (monomer mutációt tartalmazó Venus fluoreszcens fehérje) konstrukció Dr. Szidonya László β -arresztin2-YFP plazmidjából készült laborunkban (210). Az MP-YFP (mirisztoilálódó és palmitoilálódó fehérje - sárga fluoreszcens fehérje konstrukció) plazmid elkészítéséhez az alapot Zacharias és mtsai munkája jelentette (211). A Lyn kináz MGCIKSKRKDNLNDDE aminosav szekvenciája került a YFP plazmidba (212). A konstrukcióban található YFP Ceruleanra történő cseréjével készült az MP-Cerulean plazmid. Az NLS-mRFP (nukleáris lokalizációs szignál-monomer mutációt tartalmazó piros fluoreszcens fehérje) laborunkban készült (Dr. Gulyás Gergő munkája) az NLS

(nuclear localization signal) szekvencia (DPKKKRKV) \times 3 linkerrel történő (SGLRSRAQASNSRV) mRFP C1-es plazmidba illesztésével. A vad típusú és K44A domináns negatív dynamin konstrukciókat Dr. K. Nakayama bocsátotta rendelkezésünkre (213). A miográfiás vizsgálatokban felhasznált egereket (C57BL/6J, Cnr1tm1zim) Andreas Zimmer professzortól kaptuk (214).

4.2. Genomiális DNS szekvenálás

A II. sz. Belgyógyászati klinika NDI-os betegének vizsgálatát írásos, tájékozott beleegyezését követően kezdtük el. A genomiális DNS izolálása perifériás vér fehérvérsejtjeiből történt Dr. Patócs Attila laboratóriumában DNS izolációs kit segítségével (Boehringer Mannheim Co., Németország). A genomiális DNS-ből PCR-rel két részletben sokszorosítottuk az *AVPR2* gént. A felhasznált primerek a következők voltak: 5'-ATCACCTCCAGGCCCTCAGA-3' és 5'-ATGGGACGGCAGATGGCAC-3' valamint 5'-TGATCCTGGCCATGACGCTG-3' és 5'-AGAGGCAAGACACCAACA GC-3'. A PCR során a következő protokollt használtuk: 95°C – 5 perc; //95°C – 1 min, 60 °C – 45 mp, 72°C – 3 perc// 35x; 72°C- 6 perc, 4°C kivétel. A PCR minták méretét agaróz gélen futtatással ellenőriztük. A PCR termékeket tisztítást követően mindkét irányban az Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Németország) cég szekvenálta.

4.3. Plazmid konstrukciók elkészítése

A jelöletlen, vad típusú V2R plazmidjának elkészítésekor a szekvenciáját EcoRI és XhoI restrikciós vágóhelyek segítségével pcDNA3.1 vektorba illesztettük. A HA-V2R (HA-jelölt V2 vazopresszin receptor) elkészítésekor hasonlóan jártunk el, azonban a PCR segítségével a receptortól 5' irányban elhelyeztük az influenza hemagglutinin antigénjének TATCCTTATGACGTCCCTGACTAT szekvenciáját és ezt követően illesztettük pcDNA3.1 vektorba. A V2R-Sluc konstrukciók elkészítéséhez PCR segítségével (primerek: 5'-ATATGAATTGCCACCATGCTCATGGCGTCCACC-3' és 5'-TATAACCCGGTCCTCCTCCCGATGAAGTGTCCTTGGC-3') EcoRI és AgeI vágóhelyeket hoztunk létre a jelöletlen konstrukció receptor szekvenciájának végén.

Ellenőrzést és tisztítást követően a szuper *Renilla* luciferázt tartalmazó pEYFP-N1 vektorba illesztettük (215). A V2R-mVenus létrehozásakor az előzőekben foglaltak szerint jártunk el, a terméket azonban az mVenus szekvenciát tartalmazó pEYFP-N1 vektorba jutattuk. A mVenus a Venus fluoreszcens fehérje A206K mutációt tartalmazó módosítása, amely mutáció miatt monomer formában fejeződik ki a fehérje (211). A receptor konstrukciók N321K és I130N variánsait site directed mutagenézis segítségével hoztuk létre. Az N321K esetén 5'-AACAGCTGCACCAAGCCCTGGATCTATGCATC-3' és 5'-GAAAGATGC-ATAGATCCAGGGCTTGGTGCAGCT-3' primereket, az I130N receptor esetén pedig a 5'-TCTGCAAATGGTGGGCATGTATGCCTCCTCCTACATGAACCTGG -3' és 5'-TGGCCAGGTTTCATGTAGGAGGAGGCATACATGCCCACCATTTGC-3' oligonukleotidokat használtuk a PCR során. A PCR protokoll a következő volt: 95°C – 5 perc; //95°C – 30 mp, 60 °C – 30 mp, 68°C – 10 perc// 20x; 68°C- 20 perc, 4°C kivételig. DpnI emésztés után a előzőekben leírtaknak megfelelően EcoRI/XhoI vagy EcoRI/AgeI restrikciós emésztést követően a mutáns receptor inzertet az eredeti plazmidba illesztettük vissza. A módszer segítségével csak a kívánt szakaszon következett be - ellenőrzött körülmények között - mutáció. Az Epac-BRET szenzorhoz kiindulásként az ^TEPAC^{VV}-konstrukciót használjuk. A mTurquoise szekvenciájának lecseréléséhez Sluc-ot (szuper *Renilla* luciferáz) használtunk fel. A PCR-t 5'-ATATAAGCTTGCCACCATGGCTTCCAAGGTG-3' és 5'- ATATGATAT-CGCTTCAGCACTCTCTCCACGAAGC-3' primerek segítségével végeztük. Az Sluc beillesztéséhez a HindIII és EcoRV enzimeket használtuk fel. Valamennyi plazmidot elkészítését követően az Eurofins MWG Operon automatizált rendszerével szekvenálással ellenőriztük. A kísérletekhez használt plazmid konstrukciókat az 1. táblázat foglalja össze.

Plazmid	Funkció
Epac-BRET	Epac alapú, intramolekuláris BRET szonda cAMP méréshez
β -arresztin2-Rluc	Energiadonorról jelölt β -arresztin2
MP-YFP	Plazmamembránba irányított energiaakceptor
NLS-mRFP	Sejtmagba irányított piros fluoreszcens fehérje
MP-Cerulean	Plazmamembránba irányított fluoreszcens fehérje
dyn1	Vad típusú dinamin1
DNdyn1	Domináns negatív dinamin1
VT/N321K/I130N-V2R	Jelöletlen vad típusú/mutáns V2 vazopresszin receptorok
HA-V2R	HA-jelölt V2 vazopresszin receptor
V2R-Sluc	Energiadonorról jelölt V2 vazopresszin receptor
V2R-mVenus	Energiaakceptorral jelölt V2 vazopresszin receptor

1. táblázat

A kísérletekben használt plazmidkonstrukciók és funkciójuk.

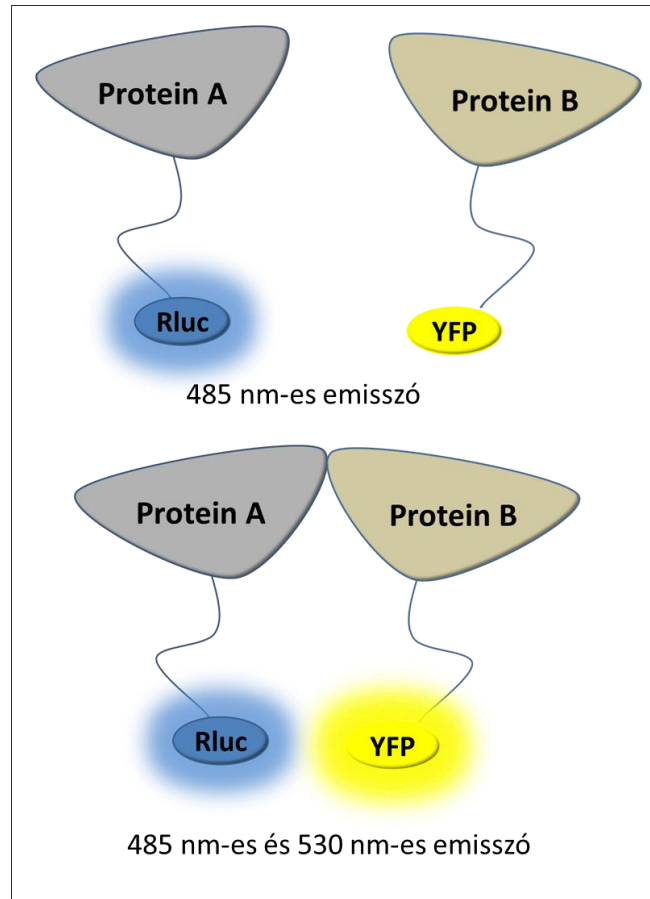
4.4. Sejtkultúra fenntartás és a sejtek transzfekciója

A kísérleteinkben használt HEK-293 (humán embrionális vese) sejteket DMEM médiumban tartottuk fent, amely médium 10% FBS-t, 100 IU/ml penicillint és 100 μ g/ml streptomycint tartalmazott. A sejteket inkubátorban tenyésztettük, a párasított közeg 37°C hőmérséklettel és 5%-os CO₂ koncentrációval bírt. A sejtek transzfekciója során poli-L-lizinnel előkezelt lemezekkel vagy fedőlemezekkel dolgoztunk. A transzfekciós oldatok a plazmid konstrukciókat, valamint Lipofectamine 2000™ transzfekciós reagenst tartalmazták. A transzfekció során Opti-MEM® médiumot használtunk. A protokoll szerint az oldatot 6 óra múlva DMEM médiumra cseréltük, a méréseket pedig 24 órával a transzfekciót követően végeztük. A sejtek transzfekcióját részletesen az egyes kísérletes módszerek leírásánál ismertetjük.

4.5. Biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) mérések

4.5.1. A biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) technika rövid bemutatása

A GFKR-ok kutatását alapvetően átformálták a rezonancia energiatranszfer alapú mérések. Kísérleteinkben a BRET technikát alkalmaztuk, a módszer elve rendkívül hasonló a fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer működéséhez (FRET) (216). A technikával távolság változást regisztrálni két jelölés között nanométeres nagyságrendben lehetséges. A kísérleti felállástól függően nemcsak fehérje-fehérje interakció monitorozható, de egy fehérjén belül is lehetséges konformációváltozást regisztrálni. A technika alapja, hogy az energiadonor és –akceptor fehérje között távolságfüggő módon energiaátadás jön létre. Ez az energiatranszfer függ a partnerek távolságától, orientációjától és természetesen a donor emissziós és az akceptor excitációs spektrumának átfedésétől. Az általunk is használt BRET módszer esetén energiadonorként a *Renilla* luciferáz enzimet (Rluc) vagy annak egy optimalizált tulajdonságú változatát (Sluc) használjuk. Az emisszió feltétele, hogy az enzim szubsztrátját, a sejtporomeábilis benzil-cöclenterazint (cöclenterazin h) adjunk a rendszerhez. Az enzimekre jellemző emissziós maximum 485 nm-es hullámhossznál van. Energiaakceptor szerepet GFP variánsok tölthetnek be, mi kísérleteinkben sárga (YFP) és Venus (mVenus) fluoreszcens fehérjéket alkalmaztunk. A fluoreszcens fehérjék emissziós maximumára 530 nm-es hullámhossz jellemző. A BRET mérés esetén az energiatranszfer mértékéről a két hullámhossz intenzitásának hányadosa, a BRET hányados utal (BRET hányados: I_{530}/I_{485}). A donorról és az akceptorral jelölt fehérje távolságának csökkenése esetén BRET hányados növekedést, ellenkező esetben csökkenést tapasztalunk (5. ábra). A BRET módszer előnye a FRET-tel szemben, hogy a biolumineszcens donort nem szükséges külső fényrel excitálni, így az alacsonyabb háttér miatt nagyobb érzékenységgel lehet a vizsgálatokat végezni.



5. ábra

A sejtpermeábilis szubsztrát hatására a biolumineszcens *Renilla* luciferáz enzim (Rluc) 485 nm-es hullámhosszúságú fényt emittál. Ha a biolumineszcens energiadonor közelségbe kerül az energiaakceptor fehérjével (az ábrán sárga fluoreszcens fehérje-YFP), energiatranszfer jön létre. Az energiatranszfer következtében a YFP emissziós spektrumának megfelelően 530 nm-es emissziót is detektálhatunk. A BRET hányados a két hullámhosszú emisszió intenzitásának hányadosa.

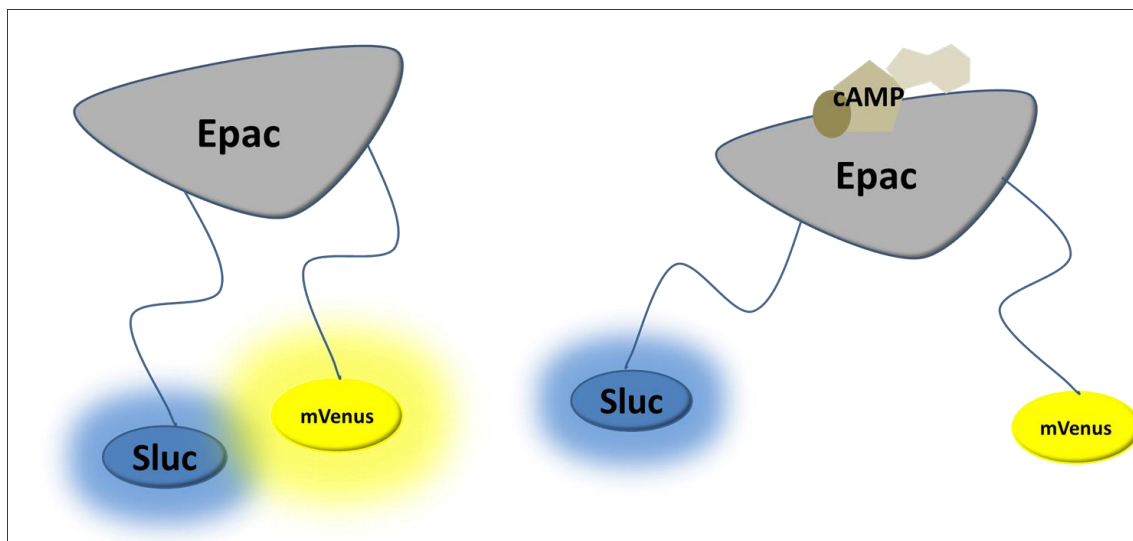
4.5.2. A BRET mérések

A méréseket 24 órával a transzfekciót követően végeztük, előtte a sejteken a médiumot Krebs-Ringer pufferre (120 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 0,7 mM MgSO₄, 10 mM glükóz, 10 mM Na-HEPES, pH 7,4) cseréltük. A BRET kísérleteket Berthold Mithras LB 940 készülékkel, 37°C-on végeztük. A mérés kezdetén a sejtekhez adtuk a cölanderazin h-t 5 µM végső koncentrációban. A kísérletek során minden kondíció

esetén triplikátumokat használtunk, a bemutatott eredmények minimum három független kísérlet átlagai.

4.5.3. BRET alapú cAMP mérés

Kísérleteinkben a cAMP szint monitorozására az Epac-BRET konstrukciót használtuk. A bioszenzor egy fehérjeláncon belül tartalmazza az Sluc biolumineszcens energiadonort és az mVenus akceptor fehérjét. Az Epac a sejtekben a Rap kis G-fehérje aktivátora (GEF), amely cAMP szenzitív. Az Epac-BRET szenzor cAMP kötés hatására konformációváltozáson megy keresztül, amelynek következtében az Sluc és az mVenus egymástól eltávolodik (6. ábra). A BRET hányados csökkenése ezekben a kísérletekben ezért a cAMP koncentrációjának emelkedésére utal (209).



6. ábra

Az Epac-BRET bioszenzor működésének sematikus rajza. Az Epac-BRET szonda egy fehérjeláncon belül tartalmazza az energiadonor és -akceptor fehérjéket. Az Epac konformációváltozáson megy keresztül cAMP kötését követően, az mVenus fluoreszcens jelölés eltávolodik az Sluc biolumineszcens enzimtől. Az energiáttranszfer csökkenése miatt az mVenus emissziójának intenzitása és így a BRET hányados csökken.

A sejtek transzfekciója során poli-L-lizinnel előkezelt, fehér színű 96-lyukú lemezzel dolgoztunk. A transzfekció során a lemezre lyukanként 10^5 HEK-293 sejtet használtunk fel. A transzfekciós oldat egy pontra számítva 0,25 μg receptor DNS-t, 0,25 μg Epac-BRET plazmidot, valamint 0,5 μl Lipofectamine 2000™ transzfekciós reagenst tartalmazott. Három konstrukció együttes transzfekciója esetén (amely során mindig valamely dinamin konstrukció volt a harmadik) 0,2 μg DNS mennyiséget juttatunk be az egyes plazmidokból.

4.5.4. BRET alapú β -arresztin kötési vizsgálat

A kísérletekben a receptorok mVenus, a β -arresztin2 Rluc jelölésekkel voltak ellátva. A BRET hányados emelkedése a β -arresztin receptorhoz történő kihelyeződésére utal. A transzfekció és mérés az előzettekben leírtak szerint történt, a receptor és a β -arresztin konstrukció mennyisége pontonként 0,25 - 0,25 μg volt.

4.5.5. Plazmamembrán-receptor interakció vizsgálata BRET-tel

Az MP-YFP konstrukció a plazmamembránt jelöli a sárga fluoreszcens fehérjével, a receptorok Sluc donort tartalmaztak. A BRET hányados a receptorok plazmamembrántól mérhető távolságától függ, internalizációkor csökken (212,217). Az interakciós partnerek mennyisége a transzfekció során pontonként 0,25 - 0,25 μg volt. Azokban a kísérletekben, amelyekben a receptor és az MP-YFP mellé valamelyik dinamin konstrukciót is kifejeztük, a DNS mennyiség mindhárom konstrukció esetén 0,2 μg volt. Az eredményeket a vehikulum-kezelt sejtek BRET hányadosára normalizáltuk.

4.6. Konfokális lézermikroszkópia

A konfokális lézermikroszkópos vizsgálatokat eltérő módon végeztük a dolgozatban bemutatott két mutáns V2R esetében. Az I30N-V2R-ral történő vizsgálatokat időben

később, optimalizációs lépéseket követően végeztük fixálás nélkül a jobb minőségű felvételek érdekében.

4.6.1. Az N321K mutáció vizsgálata konfokális mikroszkópiával

A sejteket a transzfekció előtt 24 órával poli-L-lizinnel előkezelt fedőlemezekre helyeztük (3×10^5 sejt/ 35 mm-es fedőlemez). A transzfekció során Opti-MEM® mediumban 2 µg HA-jelölt receptor konstruktot vagy üres pcDNA3.1 plazmidot, valamint Lipofectamine 2000™ reagenst adtunk a sejtekhez. 6 órával később DMEM-re cseréltük a médiumot a sejteken. A festéshez a médiumot eltávolítva a sejteket PBS (foszfát-pufferelt sóoldat) oldattal mostuk. A fixálást 4%-os paraformaldehid 10 perces hozzáadásával végeztük. Háromszor mostuk a sejteket 10%-os FBS-PBS oldattal. Az immunfestéshez anti-HA-Alexa488 antitestet használtunk, amelyet 1:250 hígításban, 1%-os szapponin jelenlétében vagy hiányában adtunk a sejtekhez 1 órán át. FBS-PBS mosást követően a mintákat beágyaztuk. A jelölt receptorokat Zeiss LSM 510 konfokális lézermikroszkóppal vizsgáltuk. A fluorofórt 488 nm-es argon lézerrel excitáltuk, a felvételeket 63x-os Plan Achromat immerziós objektívvel vizsgáltuk. A választott optikai szeletvastagság 0,7 µm volt.

4.6.2. Az I130N mutáció vizsgálata konfokális mikroszkópiával

A sejteket a transzfekció előtt 24 órával poli-L-lizinnel előkezelt fedőlemezekre helyeztük (3×10^5 sejt/ 35 mm-es fedőlemez). Immunfestéshez történő transzfekció során Opti-MEM® mediumban 0,125 µg NLS-mRFP-t, 1 µg HA-jelölt receptor konstruktot vagy üres pcDNA3.1 plazmidot, valamint 4 µl Lipofectamine 2000™ reagenst adtunk a sejtekhez. Az előzőekhez hasonlóan eljárva 24 órával később festettük a sejteket, a környezet hőmérséklete az eljáráskor 4°C volt. Háromszor mostuk a sejteket jéghideg 1%-os PBS- módosított Krebs-Ringer (lásd BRET mérések) pufferrel. Az immunfestést 1:250 hígításban hozzáadott anti-HA-Alexa488 antitestekkel végeztük 30 percig. Ezt követően a sejtek mosása és mikroszkópos vizsgálata is jéghideg módosított Krebs-Ringer oldatban történt.

A kolokalizációs vizsgálatokhoz történő transzfecciókor 1 µg receptor-mVenus konstrukciót, 0,125 µg – 0,125 µg NLS-mRFP és MP-Cerulean plazmidot használtunk pontonként. Egyéb tekintetben az eljárás az előzőekben leírtak szerint történt. Szemben az előzőekkel, a sejteket szobahőmérsékleten, Krebs-Ringer oldatban vizsgáltuk. A felvételek elkészítéséhez Zeiss LSM 710 konfokális lézermikroszkópot használtunk. Az Alexa 488 jelölt konstrukciók gerjesztése 488 nm-es, az mVenus konstrukcióké 514 nm-es, az mRFP jelölésé pedig 543 nm-es hullámhosszú lézerekkel történt. A mikroszkóp konstrukciója és a jól szabályozható detekciós hullámhossz tartományok miatt az egyes fluoreszcens jelölések átbeszélése a különböző csatornában elhanyagolható volt. A felvételeket 63x-os Plan Apochromat immerziós objektívvel vizsgáltuk. A választott optikai szeletvastagság 0,7 µm volt.

4.7. Áramlási citometria

A sejteket a transzfecció előtt 24 órával fedőlemezekre helyeztük (3×10^5 sejt/ 35 mm-es fedőlemez). A transzfecció során Opti-MEM® mediumban 2 µg HA-jelölt receptor DNS-t vagy üres pcDNA3.1 plazmidot, valamint 4 µl Lipofectamine 2000™ reagenst adtunk a sejtekhez. 6 órával később DMEM-re cseréltük a médiumot a sejteken. A sejteket 24 órával a transzfecciót követően Versane®-nel a lemeztől felszabadítottuk és centrifugáltuk. Jéghideg PBS oldattal mostuk a sejteket, majd 4°C-on centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után a sejtek festése anti-HA-Alexa488 antitesttel (1:100) történt 4°C-on 40 percig. Háromszoros jéghideg PBS mosást követően az áramlási citometria vizsgálatokat Beckman-Coulter SC készülékkel végeztük. A fluoreszcencia intenzitás méréseket WinMDI v2.9 (<http://facs.scripps.edu/software.html>) programmal értékeltük. A fluoreszcencia intenzitás görbék geometriai átlag értékének meghatározása után azokból a pcDNA3.1 értékét (háttér) levontuk, majd a vad típusú receptorra normalizáltunk.

4.8. Miográfia

Az egerek mellkasi aortáját eltávolítottuk, majd Krebs oldatba (119 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 2,5 mM CaCl₂; 1,17 mM MgSO₄; 20 mM NaHCO₃; 1,18 mM KH₂PO₄; 0,027 mM EDTA; 10,5 mM glükóz) helyeztük. A Krebs oldattal töltött, hőszabályozott kamrák (37°C) 5% CO₂-ot és 95% O₂-t tartalmazó gázkeverékkel voltak buborék segítségével keverve. Az érgyűrűk nyugalmi feszülése 10 mN értékre volt állítva, a mérést 30 perc ekvilibrálódás után kezdtük. Az aortaszegmentek integritását és funkcionalitását 124 mM K⁺ koncentrációjú Krebs oldattal teszteltük, amely maximális vazokonstriktiót okoz. Néhány mosási ciklust követően az erek ellazulási képességét 10 μM acetil-kolin hozzáadásával teszteltük. A mérés során a regisztrálást PowerLab rendszerrel és LabChart kiérkező programmal (ADInstruments) végeztük. A hormonok vazokonstriktor válaszát az 1 μM fenilefrin referencia összehúzóásra normalizáltuk. A koncentráció-függő vazokonstriktiót párhuzamos szegmentumok mérésével regisztráltuk.

4.9. A kísérletek során felhasznált programok és statisztikai elemzés

A plazmidok tervezéséhez Vector NTI (Invitrogen) szoftvert használtunk. A kísérletes eredmények ábrázolásához, dózis-hatás görbék nem-lineáris regressziójához, valamint a statisztikai analízishez GraphPad Prism 5 (Graphpad Software Inc.) programot használtunk. Az áramlási citometriás mérések során egymintás t-próbát végeztünk. Az egyes agonisták pEC₅₀ (félmaximális effektív koncentráció logaritmus) értékeit egyutas varianciaanalízissel és Tukey post hoc teszttel hasonlítottuk össze. A BRET mérések során kétutas varianciaanalízist, illetve Bonferroni post hoc tesztet végeztünk.

5. Eredmények

Eredményeink bemutatásakor először az általunk vizsgált funkcióvesztő V2R mutációt (N321K), majd a funkciónyerő mutációt (I130N) írjuk le.

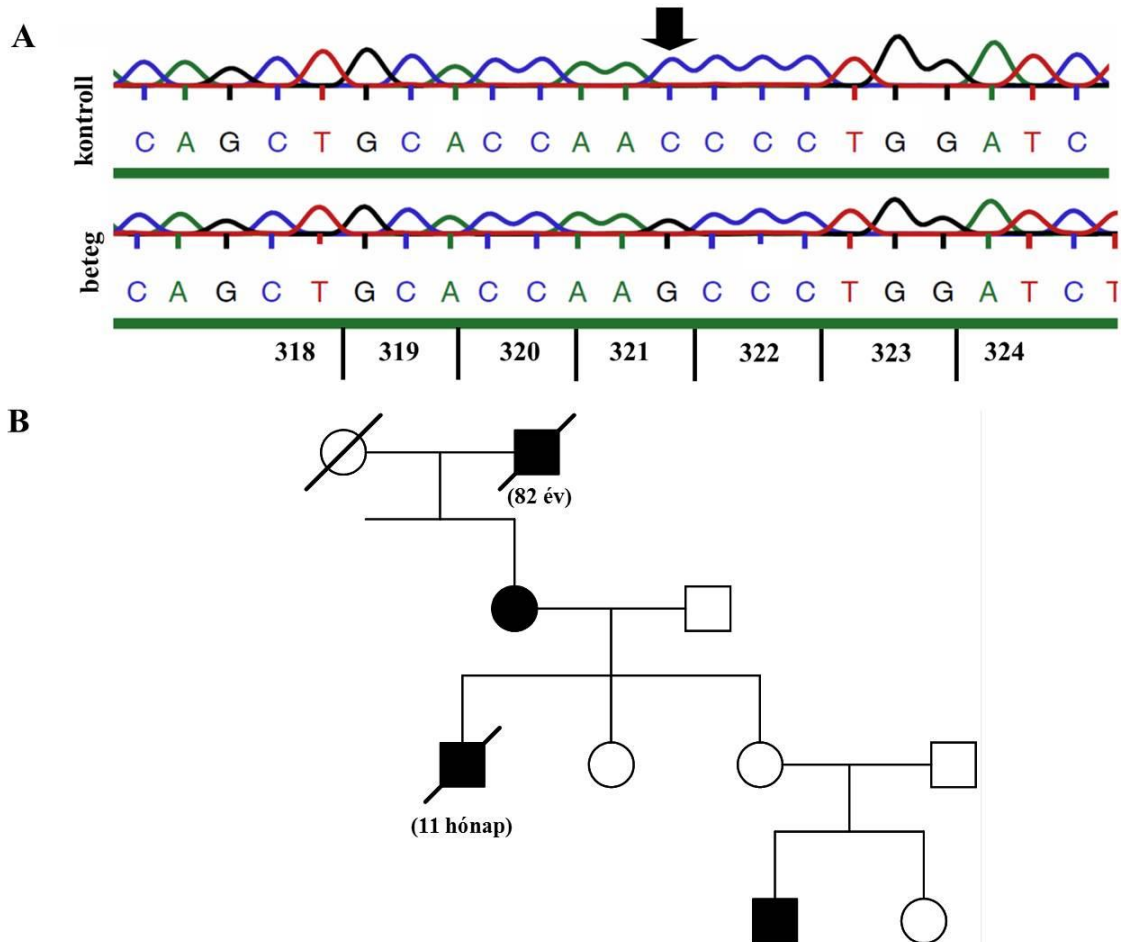
5.1. Az N321K mutáció

5.1.1. Az N321K mutáció azonosítása

A fiatal férfi beteg születésétől kezdve (1984) poliuriában és polidipsziában szenved. Szomjajzatási próba során az arginin-vazopresszin (AVP) analóg dezmpresszin (dDAVP) hatástalannak bizonyult, így 18 hónapos korában felállították a nefrogén diabétesz inszpidusz diagnózisát. A vizsgálatok időpontjában a beteg napi vízfogyasztása kb. 12 l/nap volt. Thiazid és amilorid diuretikumok adására a vízbevitel változatlan maradt. A beteg laboratóriumi eredményei a következők voltak (a referenciaértékek zárójelben szerepelnek): szérum nátrium: 145 mmol/l (136–146 mmol/l); szérum kálium: 4,3 mmol/l (3,5–5,0 mmol/l); szérum ozmolalitás: 282 mOsm/kg (gyógyszeres kezelés nélkül, a beteg szokásos vízfogyasztása mellett, 275–295 mOsm/kg). A vizelet fajsúlya 1003 g/cm³ (1002–1030 g/cm³), a vizelet ozmolalitása 72 mOsm/kg (50–1200 mOsm/kg, vízfelvételtől függően) volt.

Az *AVPR2* gén szekvenálásához perifériás vér fehérvérsejtjeinek genomiális DNS-ét izoláltuk a beteg vizsgálatokba történő írásos tájékozott beleegyezését követően. A gént PCR-rel történő sokszorosítása és tisztítása után DNS szekvenálással vizsgáltuk. A szekvenálás egy misszensz mutációt igazolt az *AVPR2* génben (7. ábra). A citozin-guanin szubsztitúció aszparagin-lizin cserét okoz (N321K) a V2R hetedik transzmembrán doménjában. Egyéb mutációt nem találtunk a génben. A beteg családi anamnézise felvetette, hogy az N321K mutáció több generáción keresztül öröklődhetett a családban, mert a diabétesz inszpidusz tünetei legalább 3 generáción keresztül jelen voltak (7. ábra). Sajnos a genetikai vizsgálatoktól elzárkóztak, a DNS szekvenálást nem tudtuk elvégezni. Az anamnesztikus adatok alapján a beteg dédapja polidipsziában

szenvedett és 82 éves koráig élt. A beteg nagyanyjának szintén polidipszia tünete volt és a napi vízfogyasztása 6-8 l között volt, valamint 11 hónapos fiú gyermeke kiszáradásban hunyt el. A beteg anyja és testvére egészségesek.



7. ábra

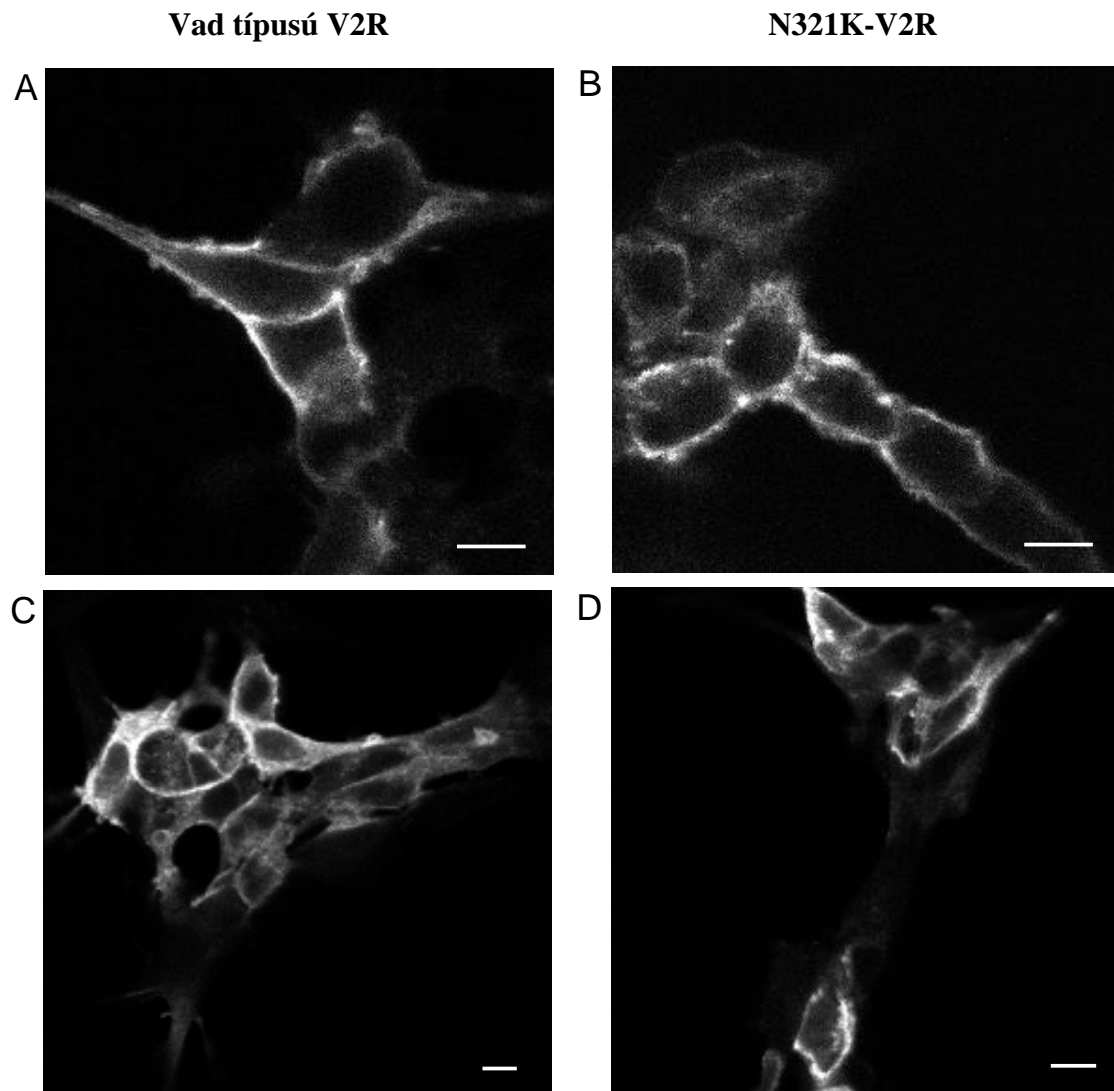
A genetikai vizsgálat eredménye és a beteg családi anamnézise. (A) A beteg genomiális DNS-ének perifériás vérből történő izolációját követően az *AVPR2* gént PCR segítségével sokszorozítottuk, majd szekvenáltattuk a mintákat. A kromatogram a beteg és egy egészséges kontroll egyén szekvenálási eredményét mutatja. (B) A beteg családi anamnézise. A telített jelölések polidipszia-poliuria szindrómát mutatnak. A férfiakat négyzetekkel, a nőket körökkel jelöltük. Az áthúzott jelölés elhunyt családtagot mutat, zárójelben az elért életkorral.

5.1.2. Az N321K-V2R sejten belüli elhelyezkedése

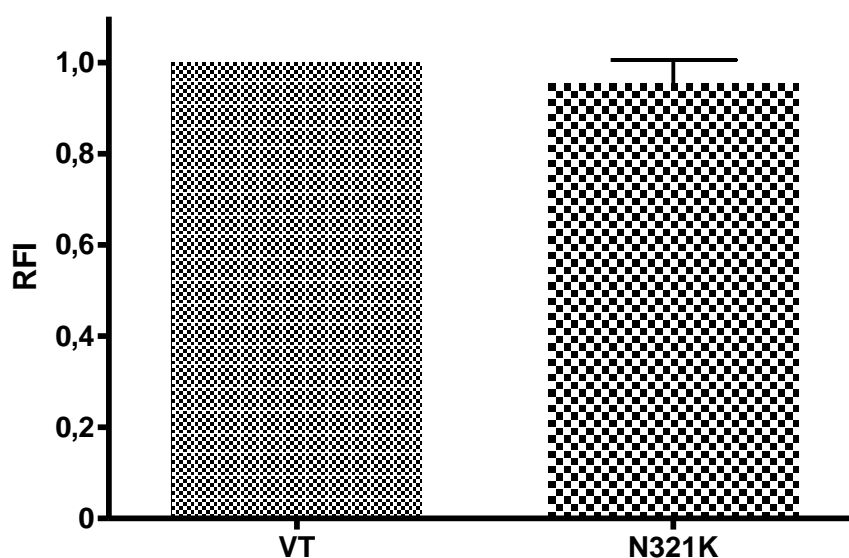
A V2R mutációk sejtélettani hatásának vizsgálatában elsődleges kérdés a mutáns receptor sejten belüli elhelyezkedésének meghatározása. HA-jelölt vad típusú vagy N321K mutáns V2R-ok plazmidjával tranziensen transzfektáltunk HEK-293 sejteket. 24 órával a transzfekciót követően Alexa488-cal jelölt anti-HA antitesttel immunfluoreszcens festést végeztünk permeabilizált és nem-permeabilizált sejteken. A sejteket konfokális mikroszkóppal vizsgálva az N321K-V2R (N321K mutációt tartalmazó V2 vazopresszin receptor) plazmamembránon való megjelenése a vad típuséhoz nagyon hasonló képet mutatott (8. ábra). A permeabilizált sejtekben markáns intracelluláris fluoreszcencia volt látható. A pcDNA3.1 vektorral transzfektált sejtekben az antitest alkalmazását követően fluoreszcens festődés nem volt látható (az adatokat nem mutatjuk).

Összefoglalva, a mutáns receptorok sejten belüli elhelyezkedése rendkívül hasonló volt a vad típuséhoz képest. Ezen adatok alapján az N321K-V2R kijut a sejtek plazmamembránjára. Elméletileg egy receptor jelölése (HA-jelölés vagy fluoreszcens fehérje fúziója) megváltoztathatja annak konformációját és így sejten belüli elhelyezkedését is. Emiatt más módon is jelöltük a mutáns receptort: tranziensen kifejezett fluoreszcens fehérjével fuzionált mutáns és vad típusú (VT-) receptorok plazmamembrán elhelyezkedését vizsgáltuk konfokális mikroszkópiával. Az N321K-V2R-mVenus és VT-V2R-mVenus sejten belüli lokalizációja hasonló volt (az adatokat nem mutatjuk).

A sejt felszíni receptorszám kvantifikálására áramlási citometria méréseket végeztünk. A HA-jelölt VT-V2R vagy N321K-V2R konstrukciókat tranziensen kifejező HEK-293 sejteket anti-HA-Alexa-488 antitestekkel festettük. Nem találtunk szignifikáns különbséget a vad típusú (RFI: 1,0) és a mutáns receptort (RFI: $0,954 \pm 0,05$; $n=3$; $p < 0,05$) kifejező sejtek relatív fluoreszcens intenzitása között (RFI, 9. ábra), amely megerősíti, hogy az N321K-V2R plazmamembrán expressziója hasonló mértékű a vad típuséhoz.

**8. ábra**

Az N321K-V2R sejten belüli elhelyezkedésének vizsgálata. A vad típusú (A és C) és N321K mutáns (B és D) HA-jelölt receptorokat kifejező HEK-293 sejteket konfokális lézer mikroszkóppal vizsgáltuk. A fixálás után a sejteket anti-HA-Alexa488 monoklonális antitesttel festettük nem-permeabilizált (A és B) és permeabilizált (C és D) körülmények között. Az N321K-V2R a vad típusú receptorhoz hasonlóan megjelenik a sejtek plazmamembránján. A reprezentatív ábrák három független kísérletből származnak. Lépték: 10 μ m.



9. ábra

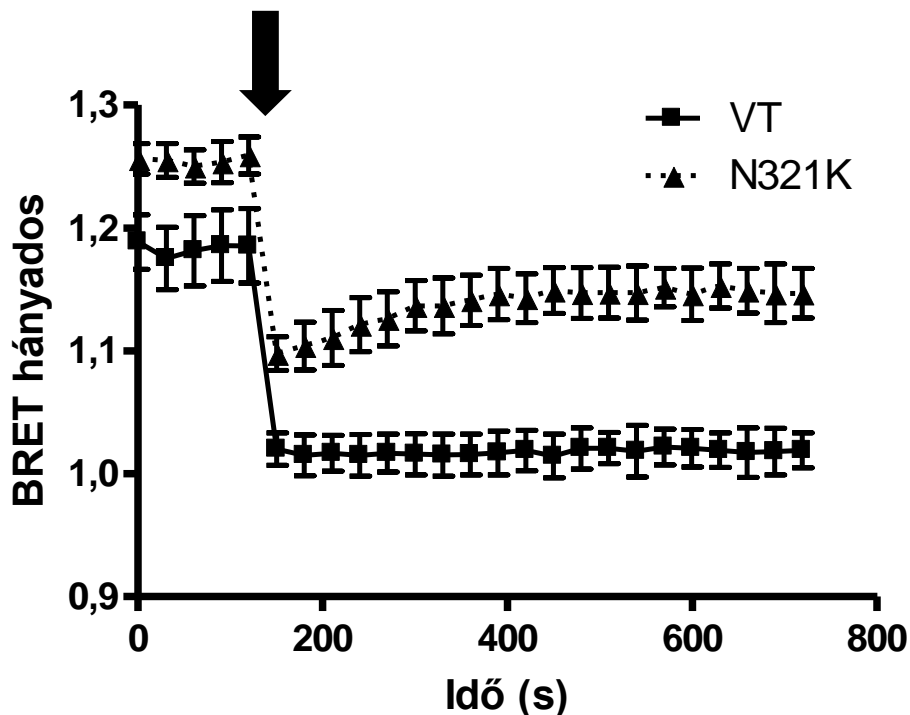
A sejtfelszíni receptorszám meghatározása áramlási citometriával. A HA-jelölt vad típusú (VT oszlop) vagy N321K mutáns V2R-t (N321K oszlop) tranziensen kifejező, illetve üres pcDNA3.1 vektorral transzfektált sejteket anti-HA-Alexa488 monoklonális antitesttel festettük. Az áramlási citometriás mérések kiértékelésekor a mért fluoreszcens intenzitások geometriai átlagából kivontuk a háttérrel (pcDNA3.1), majd a vad típusra normalizáltunk (RFI). Az N321K-V2R plazmamembrán kifejeződése nem különbözik a vad típusú receptorétól. Három független kísérlet átlag \pm SEM értékeit ábrázoltuk.

5.1.3. Az N321K-V2R funkcionális vizsgálata

5.1.3.1. Az N321K-V2R hatása a cAMP szintézisre

Az előzőekben ismertetett adatok alapján az N321K mutáns receptorok esetén a mutáció fentotípusát nem a receptorok endoplazmás retikulum retenciója okozza, ezért elvégeztük a mutáns receptor funkcionális vizsgálatát. A V2R G_s -kapcsolt receptor, ezért egy citoplazmatikus cAMP koncentráció monitorozására alkalmas BRET technikát alkalmaztunk. Az Epac-BRET szenzorral élő sejtekben lehetséges a cAMP koncentráció változásának mérése. A HEK-293 sejtekben az Epac-BRET és a VT-V2R

vagy N321K-V2R konstrukciókat tranziensen fejeztük ki, a méréseket 24 órával később végeztük. Az Epac-BRET próba konformációs változáson megy keresztül az Epac domén cAMP kötésekor. Ezen változás eltávolítja egymástól a konstrukció energiadonor és -akceptor részeit, hasonlóan a szonda alapját képező fluoreszcens rezonancia energiatranszfer próbához (209). Méréseinkben így a cAMP szint emelkedése a BRET hányados csökkenését vonja maga után. A 10. ábra a cAMP koncentráció valós idejű változásait mutatja VT-V2R-t és N321K-V2R-t kifejező sejtekben. A sejteket a jelölt időpontban 10 nM AVP-vel (vad típusú receptor, négyzettel jelölve) vagy 1 μ M AVP-vel (mutáns receptor, háromszöggel jelölve) stimuláltuk.

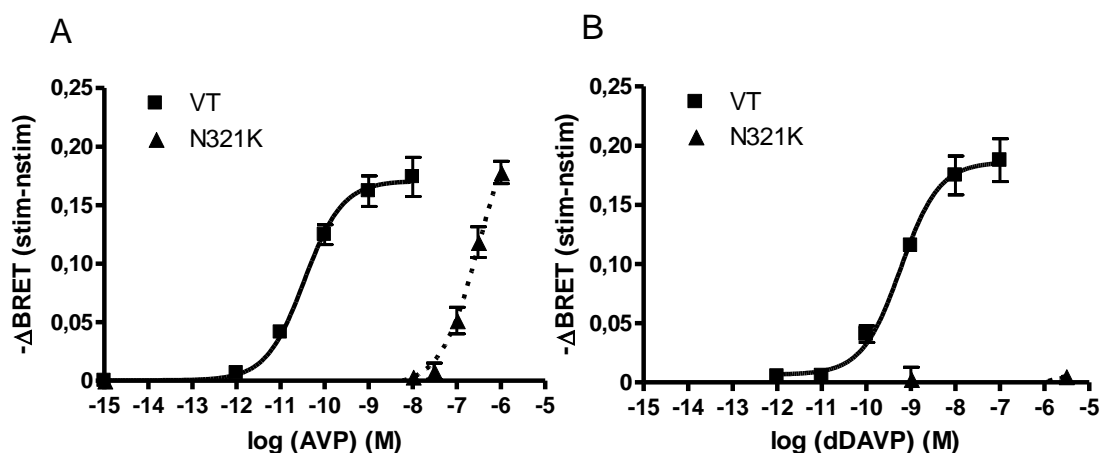


10. ábra

AVP stimulus hatásának mérése Epac-BRET bioszenzorral V2R-t kifejező sejtekben. A HEK-293 sejteket tranziensen transzfektáltuk a vad típusú vagy N321K mutáns V2R-ral és Epac-BRET szenzorral. 24 órával később végeztük a BRET mérést. A nyíllal jelölt időpontban a vad típusú receptort kifejező sejteket (négyzet, folyamatos vonal) 10 nM, az N321K-V2R esetében 1 μ M AVP-vel stimuláltuk. A BRET hányados csökkenése a cAMP koncentráció emelkedésére utal. Három független kísérlet átlag \pm SEM értékeit ábrázoltuk.

Kiemelendő, hogy a bazális (tehát stimulus előtti) BRET hányados magasabb az N321K-V2R-t kifejező sejtekben, mint a vad típusút kifejezőkben, tehát a mutáns receptor esetén alacsonyabb a mérés kezdetén a cAMP koncentráció. Ezek alapján a vad típusú receptor rendelkezik bazális aktivitással HEK-293 sejtekben, azonban az N321K mutáns receptor nem rendelkezik ilyen mértékű aktivitással az expressziós rendszerben. Bár az AVP stimulusra bekövetkező cAMP szint emelkedésének amplitúdója a két receptor esetében hasonló, az aktivációs kinetika jelentősen különbözik. A vad típusú receptorokat kifejező sejtekben a cAMP termelés fenntartott volt, azonban a mutáns receptor tranziens jellegű emelkedést hozott létre

A következőkben meghatároztuk az AVP hatás dózis-hatás görbáját vad típusú és N321K mutáns receptoron (11. ábra, A panel). A hormon hatását az egyes receptorokat kifejező HEK-293 sejtekben a vehikulum és ligand kezelt sejtek BRET hányadosának különbségéből számítottuk, a stimulus első három időpontjának átlagát felhasználva. A maximális BRET változás hasonló volt a két receptor esetében, azonban az AVP hatáserevése jelentősen csökkent volt az N321K mutáns receptoron a vad típusúhoz képest. Az AVP pEC_{50} értéke a vad típusnál $-10,46 \pm 0,04$ M volt, a mutáns esetében $-6,49 \pm 0,07$ M-nak adódott.



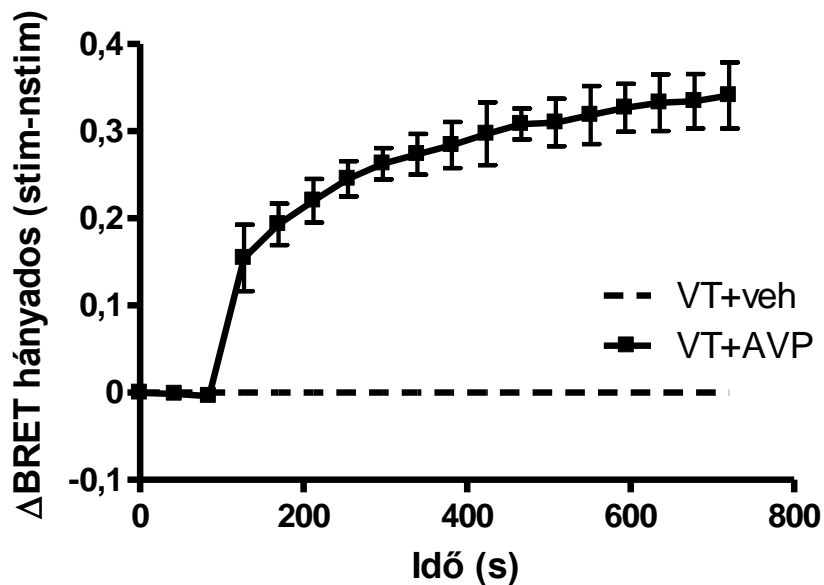
11. ábra

AVP (A panel) és dDAVP (B panel) cAMP jel dózis-hatás görbéi V2R-okat kifejező sejtekben. A HEK-293 sejteket tranziensen transzfektáltuk a vad típusú vagy N321K mutáns V2R-al és Epac-BRET szenzorral. 24 órával később végeztük a BRET mérést. Az agonisták hatását a vad típusú receptort (négyzet, folyamatos vonal) és az N321K-V2R-t (háromszög, szaggatott vonal) kifejező sejtekben az agonistával (stim) és vehikulummal stimulált (nstim) sejtek kezelést követő első időpontban mért BRET hányados különbségeként ábrázoltuk. A görbéket nem-lineáris regressziót követően, GraphPad szoftver segítségével ábrázoltuk. AVP esetében a mutáció a dózis-hatás görbét jelentősen jobbra tolja. A dDAVP nem hozott létre cAMP emelkedést a mutáns receptort kifejező sejtekben. Mindkét panelen három független kísérlet átlag \pm SEM értékeit ábrázoltuk.

Az AVP analóg dDAVP hatásának vizsgálata mind a diabétesz inszpidusizáció diagnózisának felállításában, mind a terápia meghatározásában esszenciális. Emiatt a dDAVP cAMP termelésre kifejtett hatását vizsgáltuk VT-V2R és N321K-V2R konstrukciókat kifejező HEK-293 sejtekben (11. ábra, B panel). A hatás mérésekor a ligand és vehikulum kezelt, Epac-BRET szondát kifejező sejtek BRET hányadosának különbségét vizsgáltuk. A dDAVP pEC_{50} értéke a vad típusú receptoron $-9,23 \pm 0,07$ M volt. Dezmopresszin stimulust követően nem volt mérhető cAMP termelődés a mutáns receptort kifejező sejtekben. Ez az eredmény konzisztens a beteg korábban leírt klinikai képével.

5.1.3.2. Az N321K-V2R internalizációs tulajdonságai

A V2R mutációk esetén fontos kérdés, hogy a mutáció befolyásolja-e a receptor internalizációs tulajdonságait. Első lépésben a receptorok β -arresztin 2 kötését vizsgáltuk élő sejtekben BRET technikát alkalmazva. A vad típusú receptor β -arresztin 2-vel történő interakcióját AVP stimulus hatására az mVenus jelölt receptor és β -arresztin2-Rluc interakciójakor létrejövő BRET hányados emelkedése jelzi (12. ábra).

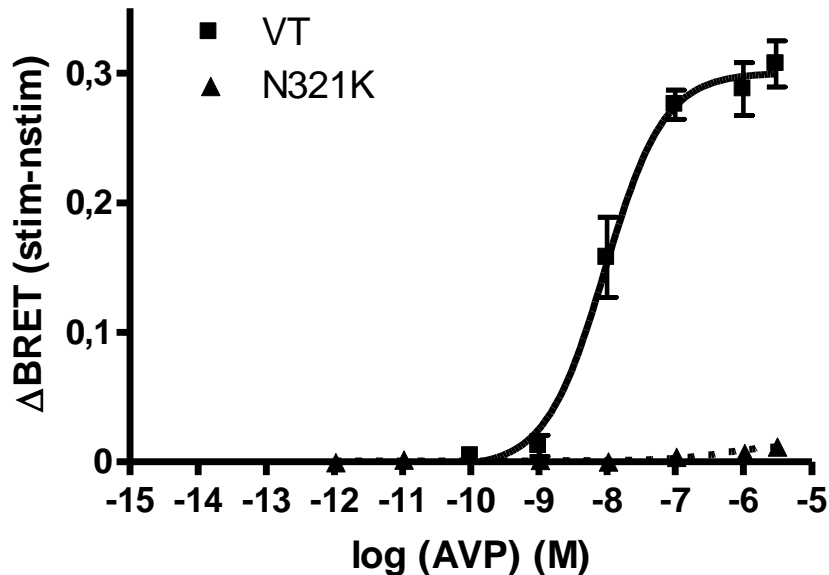


12. ábra

A vad típusú V2R β -arresztin2 kötésének vizsgálata BRET módszerrel. A HEK-293 sejteket VT-V2R-mVenus és β -arresztin2-Rluc konstrukciókkal tranziensen transzfektáltuk a BRET mérés előtt 24 órával. A sejteket 1 μ M AVP-vel (négyzet, folyamatos vonal) vagy vehikulummal (szaggatott vonal) kezeltük a harmadik mérési pont után. Ábrázolásakor a kontroll sejtekre normalizáltuk az eredményeket. AVP hatására fokozódik V2R β -arresztin kötése. Három független kísérlet átlag \pm SEM értékeit ábrázoltuk.

A 13. ábra a receptorok β -arresztin 2 kötésének dózis-hatás görbét mutatja 380 másodperccel az AVP stimulálást követően. Az ábrán jelölt BRET változás a ligand és a vehikulum kezelt sejtek BRET hányadosának különbsége. A β -arresztin2 kötés pEC_{50} értéke a vad típusú receptorok vizsgálatakor $-8,03 \pm 0,005$ M volt. Igen magas,

szuprafiziológiás AVP koncentrációk esetében sem tudtunk β -arresztin 2 kötést mérni az N321K-V2R-mVenus konstrukciót kifejező sejtekben.

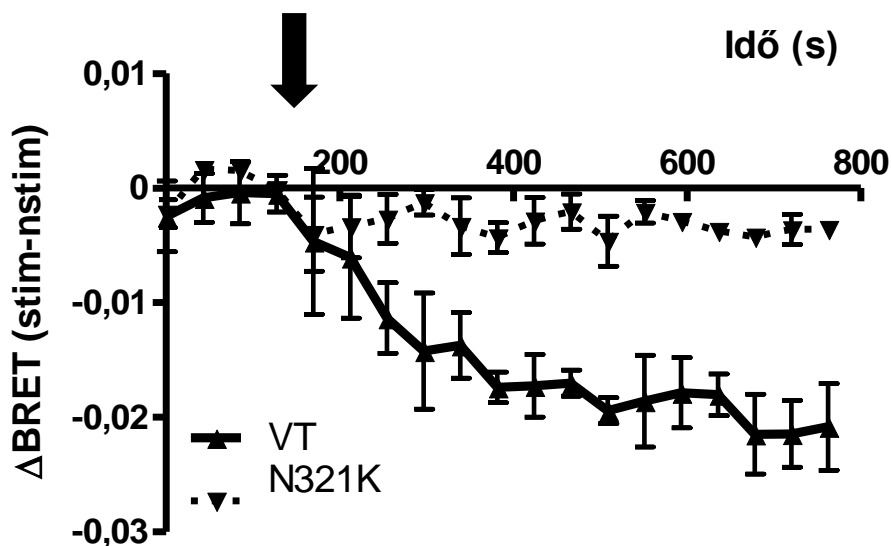


13. ábra

A vad típusú és mutáns V2R-ok β -arresztin2 kötésének dózis-hatás görbéje AVP kezelésre. HEK-293 sejteket VT-V2R-mVenus (négyzet, folyamatos vonal) vagy N321K-mVenus (háromszög, szaggatott vonal) és β -arresztin2-Rluc konstrukciókkal transzfektáltunk a BRET mérés előtt 24 órával. A sejteket AVP-vel (stim) vagy vehikulummal (nstim) kezeltük, a jelölt hatás a stimulált és nem-stimulált sejtek BRET hányadosának különbsége (stim-nstim). A görbéket nem-lináris regressziót követően, GraphPad szoftver segítségével ábrázoltuk. Az N321K-V2R mutáns receptor esetében nem tudtunk β -arresztin kötést detektálni. Három független kísérlet átlag \pm SEM értékeit ábrázoltuk.

Következő lépésben a receptorok internalizációs kinetikáját vizsgáltuk BRET technikával. Ebben a kísérleti felállásban a receptorokat a módosított biolumineszcens donor *Renilla* luciferáz enzimmel jelöltük (V2R-Sluc). Az energia akceptor szerepét betöltő sárga fluoreszcens fehérjét (YFP) egy olyan konszenzus szekvenciához kapcsoltuk, amely mirisztoilálódást és palmitoilálódást követően a plazmamembránhoz rögzül (MP-YFP) (212,217). A BRET hányados ebben az esetben a nem-specifikus rezonancia energiát mérte, amely az energia donor és akceptor, tehát a receptor

és a plazmamembrán távolságától függ (14. ábra). A BRET mérés során az Sluc intenzitása (485 nm-en mérve) a sejtporosztrát cölerterazin jelenlétében az Sluc enzim kifejeződésétől függ. Így az Sluc intenzitások összehasonlítása az enzimmel jelölt receptorok mennyiségéről ad információt. A mérésekben nem volt különbség a vad típusú és mutáns receptorok kifejeződése között (az adatokat nem mutatjuk). A vad típusú V2R-t kifejező sejtek 1 μM AVP-vel történő stimulációja a BRET hányados csökkenést okozott az energia donor és akceptor megváltozott lokalizációja miatt. Ez a sejtfelszíni receptorok internalizációját és endoszómális kompartmentekbe helyeződését jelzi. Az N321K-V2R-Sluc és az MP-YFP közötti BRET hányados csökkenés jelentősen kisebb mértékű volt, mint a vad típus esetében mért. Ezen adat arra utal, hogy a mutáns receptor internalizációja csökkent mértékű.

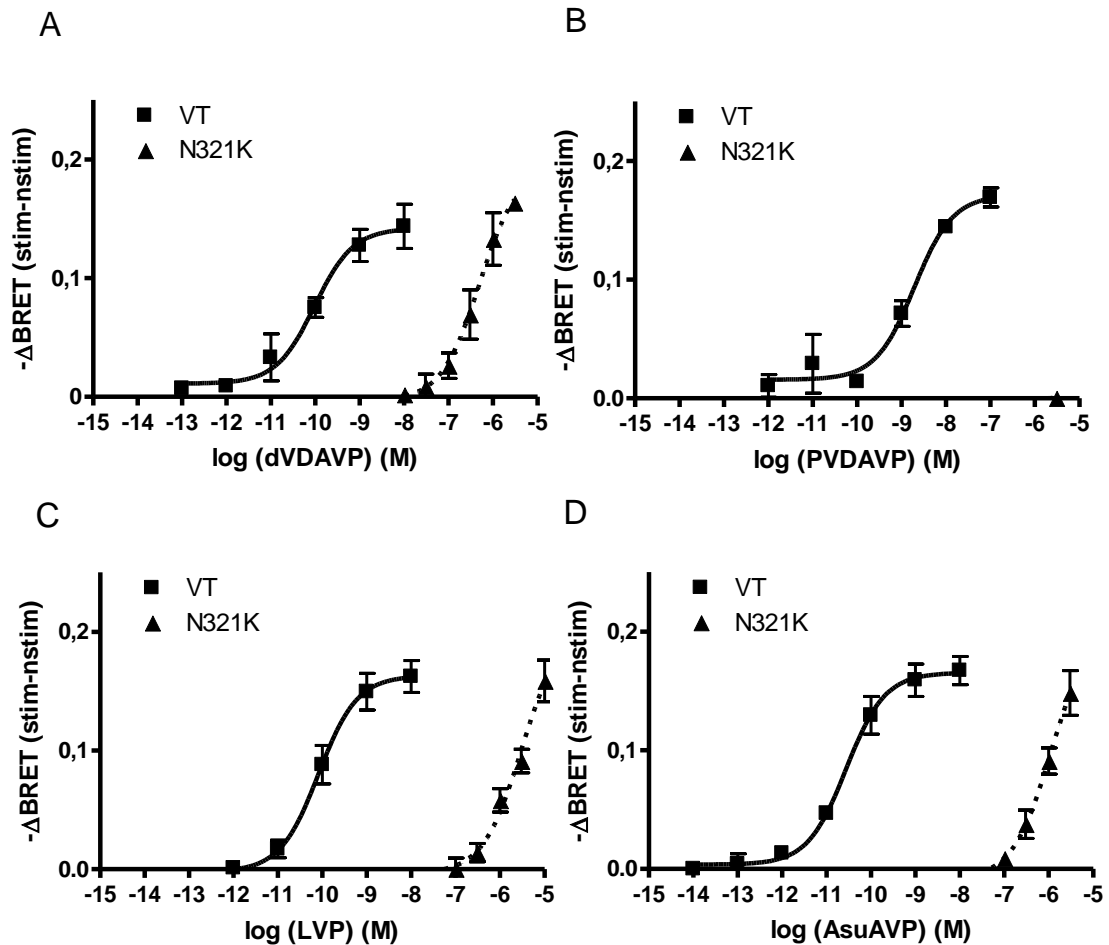


14. ábra

A vad típusú és mutáns V2R-ok internalizációs kinetikájának vizsgálata. A HEK-293 sejteket tranziensen transzfektáltuk VT-V2R-Sluc (folyamatos vonal) vagy N321K-V2R-Sluc (szaggatott vonal) konstrukciókkal, valamint a plazmamembránt jelölő MP-YFP plazmidjával. A BRET mérést 24 órával később végeztük. A jelölt időpontban a sejteket 1 μM AVP-vel (stim) vagy vehikulummal (nstim) kezeltük. A BRET hányados változását a stimulált és nem-stimulált sejtek különbségéből számoltuk (stim-nstim). A jelcsökkenés a receptorok plazmamembrántól történő eltávolodását és internalizációját jelzi. Az N321K mutáns receptor csökkent internalizációs kinetikát mutat. Három független kísérlet átlag \pm SEM értékeit ábrázoltuk.

5.1.3.3. Az N321K-V2R agonista érzékenysége vizsgálat

Elméletileg a mutáns receptor funkcionális elégtelensége megmenthető egy olyan agonista segítségével, amely képes aktiválni az N321K-V2R-t és megfelelő hatáserősséggel rendelkezik a cAMP termelésre. Néhány kereskedelmi forgalomban hozzáférhető, ismert V2R ligand peptidet vizsgáltunk kísérleteinkben. Célunk volt egy olyan vegyületet találni, amely képes aktiválni a mutáns receptor függő cAMP termelést, de emellett nagy a V2R szelektivitása, hogy minimalizálhatóak legyenek az V1R-függő mellékhatások *in vivo* rendszerekben. A kísérletekben a Val⁴-dezmopresszint (dVDAVP) (149); a V2R agonista, de V1R antagonist deamino-Pen¹,Val⁴-dezmopresszint (PVDAMP) (218); Lys⁸-vazopresszint (LVP); valamint Asu^{1,6}-arginin-vazopresszint (AsuAVP) (219) teszteltünk. A dózis-hatás görbéket a receptorokat (vad típus vagy N321K) és a cAMP mérésére alkalmas Epac-BRET próbát tranziensen kifejező HEK-293 sejtekben vettük fel (15. ábra). A 2. táblázat mutatja a peptidek pEC₅₀ értékeit az egyes receptorokon. A VT-V2R-t kifejező sejtekben a dVDAVP, LVP és AsuAVP vegyületek hatékonysága az AVP-hez hasonló volt (15. ábra A, C, D, négyzetekkel jelölve). Az N321K-V2R konstrukciókkal transzfektált sejtekben ezen peptidek hatáserőssége azonban jelentősen csökkentnek bizonyult (15. ábra A, C, D, háromszöggel jelölve). A PVDAMP hatáserőssége elmaradt a dVDAVP, LVP és AsuAVP peptidekétől VT-V2R-t kifejező sejtekben (15. ábra B, négyzettel jelölve). A PVDAMP nem volt képes mérhető cAMP koncentráció emelkedést létrehozni a mutáns receptoron keresztül (15. ábra B, háromszöggel jelölve). A vizsgált peptidek közül a dVDAVP hatáserőssége (pEC₅₀ = -6,3 ± 0,07 M) volt a legnagyobb a mutáns receptoron a cAMP jel létrehozásában. Ez a hatáserősség hasonló nagyságrendű, mint az AVP hatáserőssége az N321K receptoron (pEC₅₀ = -6,49 ± 0,07 M).



15. ábra

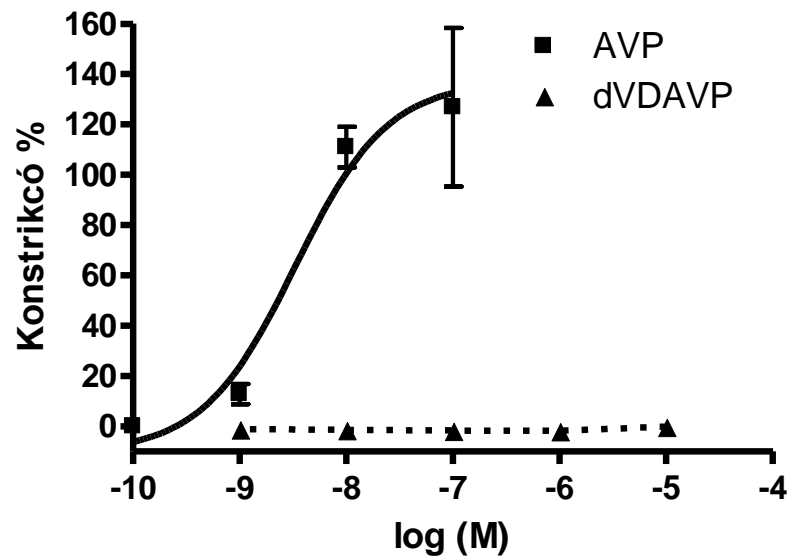
Peptid agonisták cAMP jel dózis-hatás görbéi V2R-okat kifejező sejtekben. A HEK-293 sejteket tranziensen transzfektáltuk a vad típusú vagy N321K mutáns V2R-ral és Epac-BRET szenzorral. 24 órával később végeztük a BRET mérést. Az agonisták hatását a vad típusú receptort (négyzet, folyamatos vonal) és az N321K-V2R-t (háromszög, szaggatott vonal) kifejező sejtekben az agonistával (stim) és vehikulummal stimulált (nstim) sejtek kezelést követő első időpontban mért BRET hányados különbségeként ábrázoltuk (stim-nstim). A görbéket nem-lináris regressziót követően, GraphPad szoftver segítségével ábrázoltuk. Az agonisták különböző mértékben jobbra tolódott dózis-hatásgörbével rendelkeznek az N321K-V2R-on. PVDAVP adásakor nem detektáltunk BRET hányados csökkenést az N321K mutánst kifejező sejtekben. Minden panelen három független kísérlet átlag \pm SEM értékeit ábrázoltuk.

pEC50 (M)	VT	N321K
AVP	-10,46 ± 0,04	-6,492 ± 0,07
dDAVP	-9,229 ± 0,07	
dVDAVP	-10,02 ± 0,11	-6,30 ± 0,05
AsuAVP	-10,56 ± 0,04	-5,94 ± 0,02
LVP	-10,08 ± 0,02	-5,52 ± 0,13
PVDAVP	-8,75 ± 0,01	

2. táblázat

Az egyes agonista peptidek pEC50 értékei a vad típusú (VT) és mutáns (N321K) V2R-on a 15. ábra méréseiből számolva. Két vegyület (dDAVP és PVDAVP) alkalmazásakor nem mértünk hatása N321K-V2R-t kifejező sejtekben. Az AVP analóg peptidek közül a dVDAVP esetében mértük a legkisebb különbséget a vad típusú és a mutáns receptor pEC50 értéke között.

Ezen eredmények alapján felmerült a lehetőség, hogy a dVDAVP képes lehet az N321K-V2R funkciójának megmentésére. Minden NDI kezelésében használatos AVP analóg esetében fontos kérdés a vegyület érosszehúzó mellékhatása. Emiatt a dVDAVP V1R-függő vazokonstriktor hatását miográfiával vizsgáltuk izolált egér artériákon. Az 16. ábrán látható, hogy az AVP koncentráció emelése a vaszkuláris simaizomsejteken keresztül növeli a konstriktiót. A vazokonstriktor választ az 1 µM fenilefrin okozta prekontrakció százalékos értékében adtuk meg. A dVDAVP azonban még 10⁻⁵ M koncentrációban sem hozta létre ezt a hatást.



16. ábra

AVP és dVDAVP érösszehúzó hatásának vizsgálata egér artériákon miográffal. Az izolált egér artériák kontroll relaxációjának és kontrakciójának (acetyl-kolin és magas $[K^+]$ használatával) ellenőrzése után az erek referencia összehúzódását $1\mu\text{M}$ fenilefrin hozzáadását követően mértük. Az erek növekvő koncentrációjú AVP (négyzet) vagy dVDAVP (háromszög) kezelést kaptak. A vazokonstriktor válasz a referencia fenilefrin összehúzódás százalékában került jelölésre. A dVDAVP nagy koncentrációban sem hozott létre vazokonstriktót. Három független kísérlet átlag \pm SEM értékeit ábrázoltuk.

5.2. Az I130N mutáció

5.2.1. Az I130N mutáció azonosítása

A betegség felismerése és a mutáció azonosítása (mind a beteg, mind a család genetikai analízise) német szerzőtársaink munkája volt. A receptor mutáció sejtélettani hatásainak megismeréséhez, illetve a következtetések levonásához szükséges lehet azonban a klinikai kép és a mutáció azonosításának ismerete, ezért röviden bemutatjuk azokat.

A vizsgált 34 éves férfi beteg krónikus hiponatrémiájára először egy rutin vizsgálat során derült fény 2008-ban. Korábbi érdemi gyermekkori betegsége nem volt, jelenkori panasa alkalmi palpitáció érzés. Fizikális eltérése a betegnek nem volt. Átlagos napi folyadékfogyasztása 2-3 literre becsülhető. A laboratóriumi eredményeket a 3. táblázat foglalja össze. Kiemelendő az euvolémiás állapotban mért alacsony szérum AVP koncentráció, valamint az emelkedett 24 órás nátrium kiválasztás és hiponatrémia. Ezek a változások megfelelnek a még mindig kidolgozás alatt álló NSIAD diagnózis kritériumainak (202).

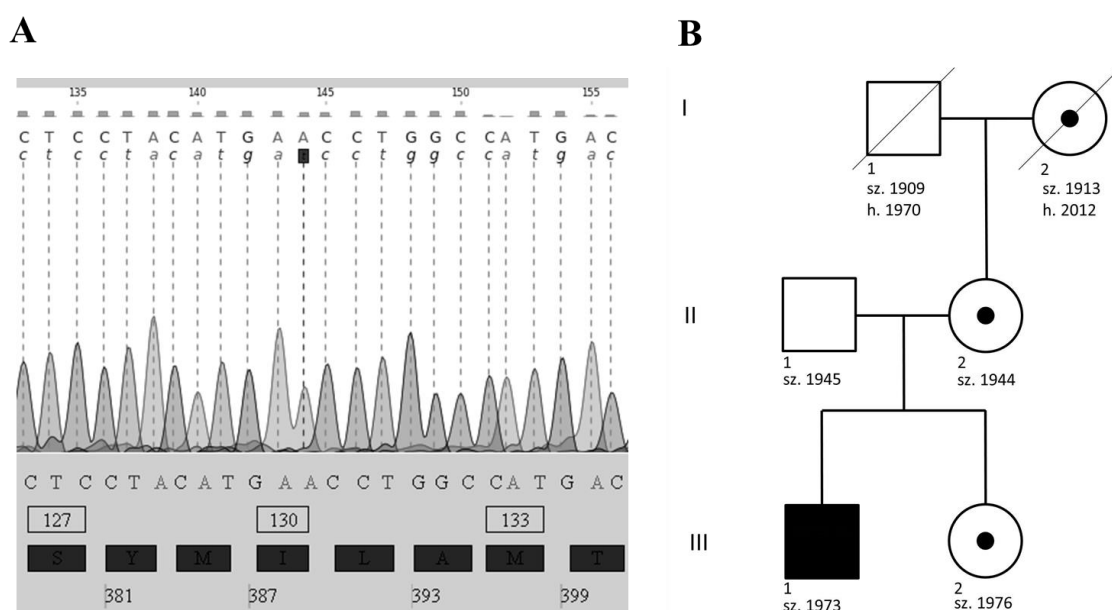
	Beteg értéke	Normál tartomány
Életkor (év)	28	-
Klinikai panasz	palpitáció	-
Vérnyomás (Hgmm)		
szisztolés	120	< 140
diasztolés	80	< 90
Szérum és plazma vizsgálatok		
Nátrium (mmol/liter)	121	136-145
Kálium (mmol/liter)	4,4	3,5-4,8
Kreatinin (mg/dl)	0,7	0,7-1,2
Glomeruláris filtrációs ráta (ml / min)	136	60 - 160
Urea nitrogén (mg/dl)	16,9	16,6 – 48,5
ACTH (ng/l)	10,8	4,7-48,8
Kortizol (ng/ml)	59,5	23-194
Aldoszteron (ng/l)	56	40 - 310
Renin (ng/ml/h)	1,3	0,2 – 2,8
AVP (ng /l)	< 0,6	0 – 7,8
Vizelet vizsgálatok		
Vizelet fajsúly (g/l)	1020	1000 - 1030
Nátrium kiválasztás (mmol/24 h)	300,6	40 - 220
Vizelet ozmolalitás (mOsm/kg)	652	50 - 1200

3. táblázat

A vizsgált beteg vizsgálati eredményei és azok referencia tartománya. Kiemelendő a beteg hiponatrémiája, alacsony szérum AVP koncentrációja, valamint emelkedett nátrium kiválasztása euvolemiás állapotban (renin koncentráció normális tartományban).

Az *AVPR2* gén molekuláris analízise új, eddig nem ismert misszensz mutációt igazolt a betegnél. Az *AVPR2* c.389T>A mutációja a V2R 130. pozíciójában izoleucin-aszparagin cserét okoz (17. ábra A panel). A család genetikai analízise X-hez kötött

öröklődő genetikai betegségekre jellemző mintázatot mutatott (17. ábra B panel): míg a beteg apja vad típusú alléllal rendelkezett, addig nőnemű testvére, anyja és nagyanyja hordozóknak bizonyultak. A klinikai kép okaként feltételezett mutáció szerepét valószínűsítette, hogy a mutációk vizsgálatára alkalmas „Mutation Taster” szoftver 0,999-es valószínűségi ponttal a mutációt „betegséget okozóknak” jelezte (www.mutationtaster.org).



17. ábra

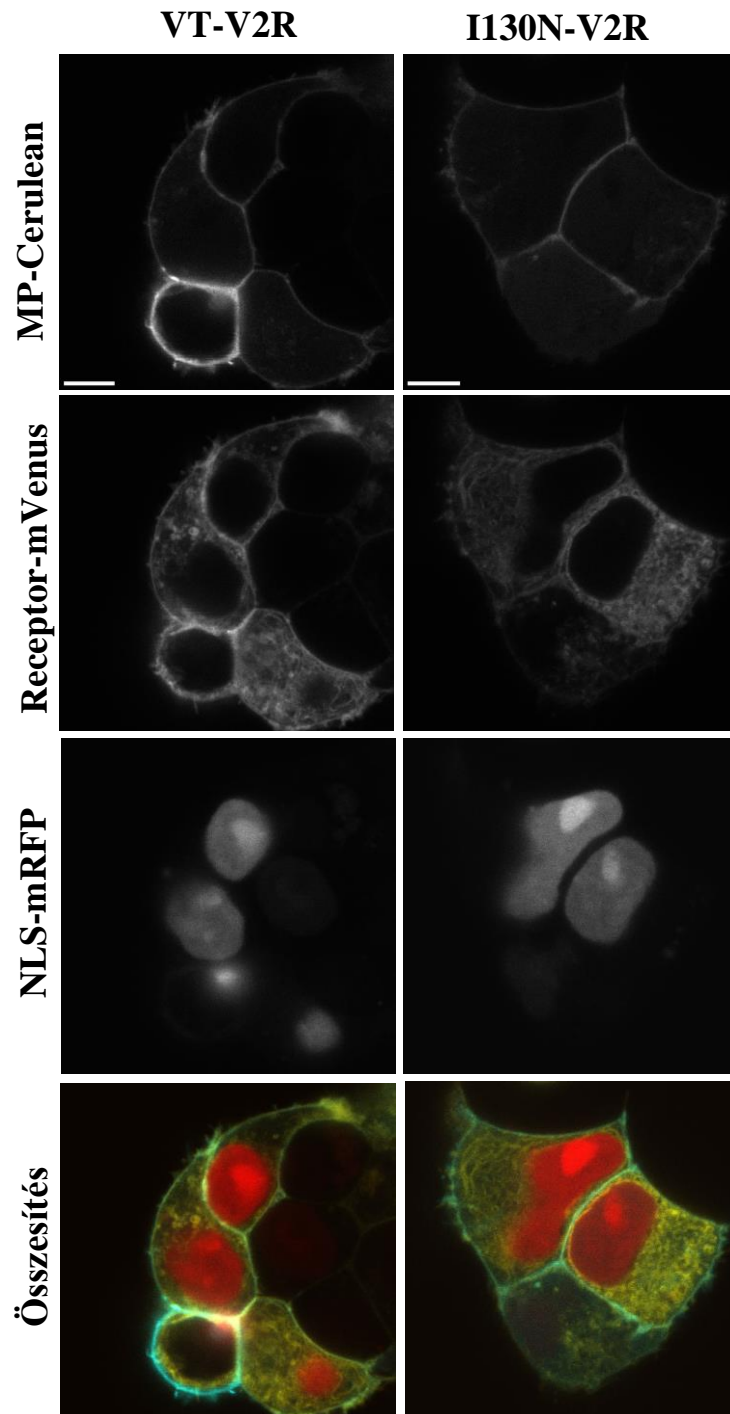
A vizsgált beteg (III.1) genetikai analízise (A panel) és családjának genetikai vizsgálata (B panel).

(A). A beteg genomiális DNS-ének izolálását követően az *AVPR2* gén PCR sokszorozását végezték. A gén szekvenálása egy új, eddig nem ismert mutációt (c.389T>A) tárt fel, amely izoleucin – aszparagin cseréhez vezet a V2R 130. pozíciójában.

(B). A család genetikai vizsgálatának eredménye. A hemizigóta férfi beteget telt jelölésű négyzet mutatja. A férfiakat négyzet, a nőket kör jelöli. A heterozigóta nőket telített középpontú körök mutatják. A születés (sz.) és halálozás (h.) éve is jelölésre került. A római számok generációkat, az arab számok az adott generáción belüli egyént jelölik. A vizsgált beteg testvére (III.2), anyja (II.2) és nagyanyja (I.2) is hordozóknak bizonyult.

5.2.2. Az I130N-V2R sejten belüli elhelyezkedése

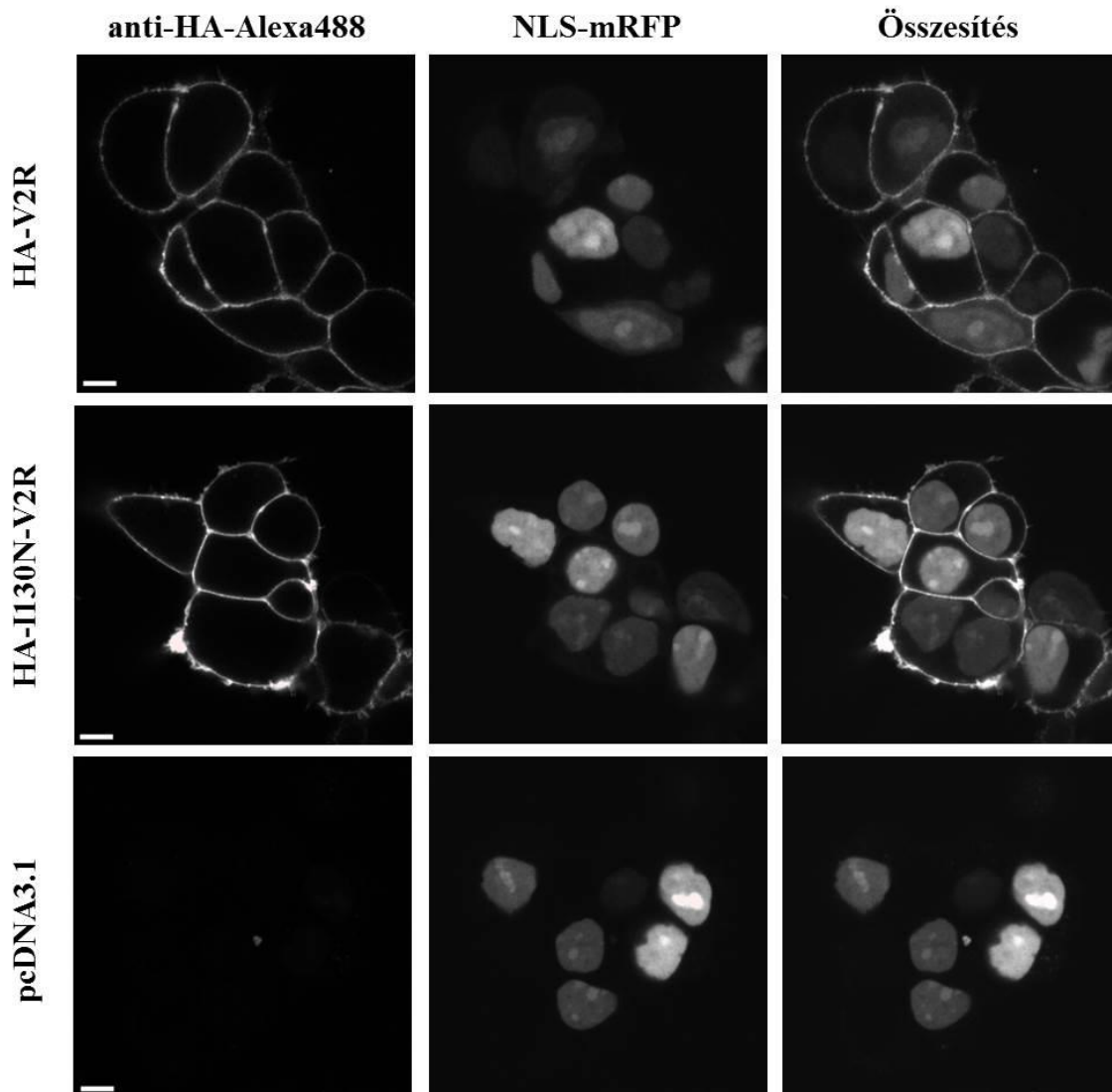
Egy korábban ismeretlen, nem karakterizált mutáns receptor vizsgálatának alapvető feladata a receptor sejten belüli eloszlásának meghatározása. Konfokális mikroszkópia segítségével, két megközelítést alkalmazva vizsgáltuk az I130N-V2R-t (I130N mutációt tartalmazó V2 vazopresszin receptor). Ennek oka, hogy tapasztalataink szerint a fixálás rontja a minták minőségét, ezért az Anyagok és módszerek fejezetben leírt módon, fixálás nélkül végeztük az immunfestést a plazmamembrán elhelyezkedés megítéléséhez. Így azonban nem lehetséges a sejtek permeabilizációja, ezért a sejten belüli elhelyezkedést fluoreszcensen jelölt fehérjék plazmidjainak transzfektálásával vizsgáltuk. HEK-293 sejtekben tranziensen fejeztük ki a következő konstrukciókat: mirisztoilálódó és palmitoilálódó, plazmamembránt jelölő konszenzus szekvenciát, amelyet Cerulean fluoreszcens fehérjével jelöltünk (MP-Cerulean); magba lokalizálódó szignált, amelyet mRFP-vel jelöltünk (nuclear localization signal, NLS-mRFP) és vagy a vad típusú (VT-V2R-mVenus), vagy a mutáns receptort (I130N-V2R-mVenus), amelyeket mVenus fluoreszcens fehérjéhez kapcsolunk. A konfokális mikroszkópos felvételen látható (18. ábra), hogy a mutáns receptort kifejező sejtek intracelluláris fluoreszcenciája a vad típust kifejező sejtekéhez hasonló. Azonban az I130N-V2R plazmamembrán elhelyezkedése kevésbé hangsúlyos a vad típushoz viszonyítva.



18. ábra

Vad típusú és I130N mutáns receptorok sejten belüli elhelyezkedésének vizsgálata konfokális lézermikroszkóppal. A HEK-293 sejteket a vizsgálat előtt 24 órával a plazmembránt jelölő MP-Cerulean, NLS-mRFP és mVenus-jelölt vad típusú, vagy I130N mutáns receptor plazmidjával tranziensen transzfektáltuk. Az egyes fluoreszcens jelölések külön csatornáiknak megfelelően és összesítve láthatók. A reprezentatív ábrák három független kísérletből származnak. Lépték: 5 μm .

A plazmamembrán expresszió megerősítésére immunfestést alkalmaztunk. A HEK-293 sejtekben HA-jelölt vad típusú vagy I130N mutáns receptorokat alkalmaztunk, illetve minden esetben NLS-mRFP-t fejeztünk ki a sejtekben. A festés során 4°C-os környezetben, fixálás nélkül kezeltük a sejteket anti-HA-Alexa488 antitesttel. A konfokális mikroszkópia az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint szintén hűtött környezetben történt. A nem-permeabilizált, HA-I130N-V2R-t kifejező sejtek egyértelmű plazmamembrán festődést mutattak, jelezve, hogy a mutáns receptor kijut a sejtfelületre (19. ábra). Kontrollként csak NLS-mRFP-t kifejező sejteket használtunk, amelyeket az antitest nem festett meg.



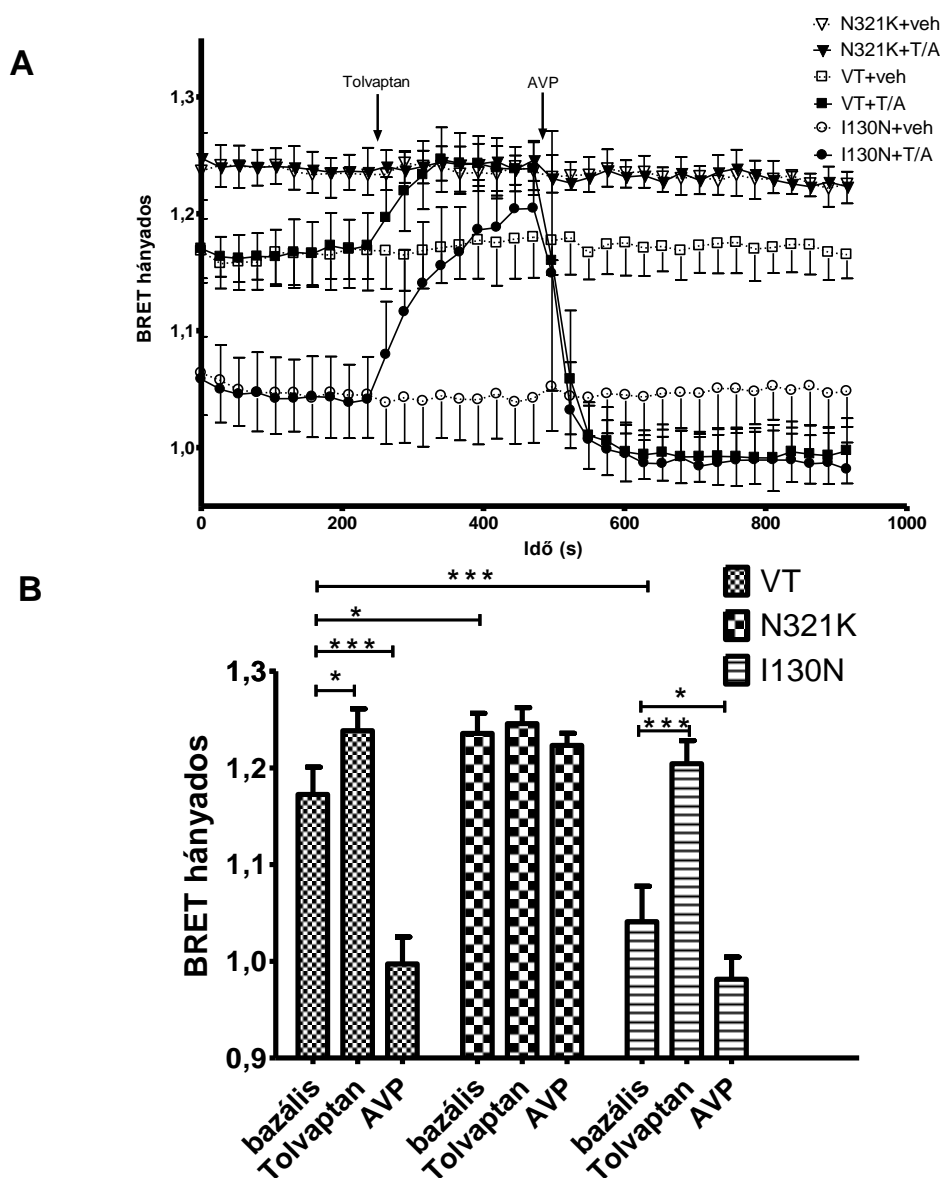
19. ábra

Az I130N-V2R plazmamembrán megjelenésének vizsgálata konfokális lézer mikroszkóppal. A HEK-293 sejtek transziens transzfekciója során a sejtekbe NLS-mRFP-t valamint a következő konstrukciók egyikét jutattuk: HA-V2R, HA-I130N-V2R vagy üres pcDNA3.1 vektor. 24 órával később az élő sejteket fixálás nélkül, hűtött (4°C) körülmények között monoklonális anti-HA-Alexa488 antitesttel festettük, majd konfokális lézer mikroszkóppal vizsgáltuk. Az I130N mutáns V2R megjelent a sejtek plazmamembránján a vad típusú receptorhoz hasonlóan. Kontroll körülmények között (pcDNA3.1) nem volt plazmamembrán festődés. A reprezentatív ábrák három független kísérletből származnak. Lépték: 5 μ m.

5.2.3. Az I130N-V2R funkcionális vizsgálata

5.2.3.1. Az I130N-V2R hatása a cAMP szintézisre

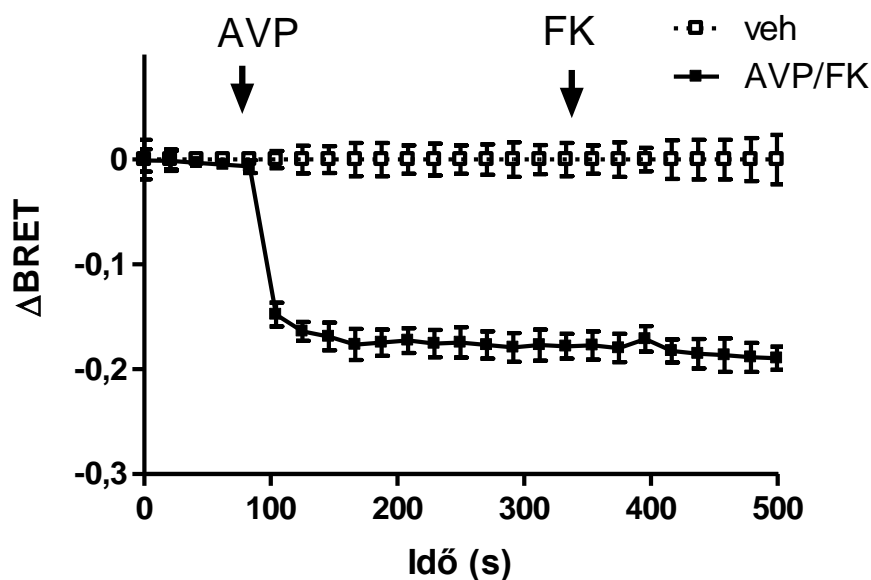
A funkcionális vizsgálatok során arra kerestük a választ, hogy az I130N mutáns receptor milyen sejtleletani hatásokon keresztül hozza létre a betegnél tapasztalt fenotípust. Ezen vizsgálatok alapja az előzőekben ismertetett BRET alapú cAMP koncentráció mérésre alkalmas technika volt. A HEK293 sejtekben tranziensen kifejeződő Epac-BRET szondát a cAMP koncentráció valós idejű követésére alkalmaztuk. A próba plazmidja mellett a sejtekbe a következő V2R variánsok egyikét juttatuk be: vad típusú receptor (négyzet), N321K-V2R (háromszög) és I130N-V2R (kör). A sejteket a jelölt időpontokban először 100 nM tolvaptannal, majd 1 μ M AVP-vel kezeltük (teli jelölések). Kontrollként a vehikulum-kezelt sejteket használtuk (üres jelölések). A bazális (kezelés előtti) BRET hányadosok különbözőek voltak az egyes receptorokat kifejező sejtekben, amely az eltérő bazális cAMP koncentrációt tükrözi (20. ábra A és B panelje).



20. ábra

BRET alapú cAMP monitorozás V2R-okat kifejező sejtekben tolvaptan és AVP kezelést követően. (A) A HEK-293 sejteket tranziensen transzfektáltuk a vad típusú (négyzet), I130N (kör) vagy N321K mutáns V2R-ral (háromszög) és minden esetben Epac-BRET szenzorral. 24 órával később végeztük a BRET mérést. A nyíllal jelölt időpontokban 100 nM tolvaptan, illetve 1 μ M AVP kezelést alkalmaztunk (teli jelölések). A kontroll sejtekhez vehikulumot adtunk (üres jelölések). A BRET hányados különbözősége a kezelések előtt az egyes receptorok eltérő bazális aktivitására utal. Tolvaptan kezelés hatására létrejövő BRET jel növekedés cAMP szint csökkenést jelöl. Három független kísérlet átlag \pm SD értékeit ábrázoltuk. (B) A jelölt BRET hányadosok a 20. ábra A paneljének méréseinek következő kezelés előtti utolsó pontjait mutatják. Kétutas varianciánálízis, Bonferroni post hoc teszt eredménye * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

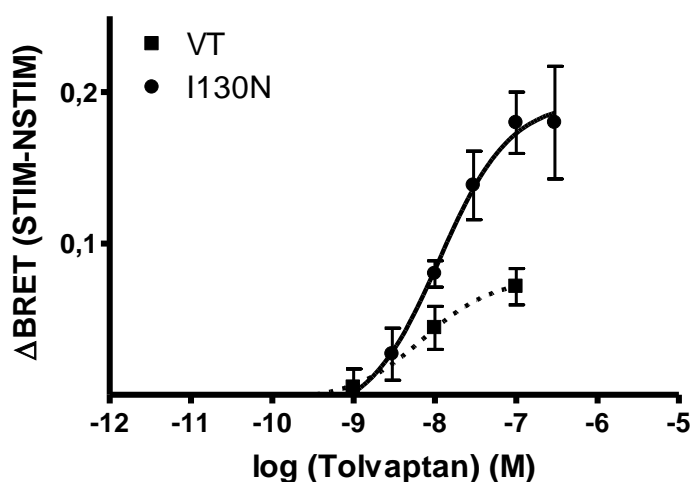
Ebben a rendszerben a vad típus a korábban leírt (lásd 10. ábra) bazális aktivitást mutatta, valamint a kísérletekben negatív kontrollként szereplő N231K-V2R nem rendelkezett alap aktivitással. Az I130N-V2R jelentősen csökkent kezdeti BRET hányadosa a mutáns konstitutív aktivitására utal. Az inverz agonista tolvaptan hozzáadása mind a vad típus, mind az I130N mutáns esetében csökkentette a cAMP koncentrációt. Ugyanezen receptorok az AVP stimulációra nagymértékű cAMP szint emelkedéssel válaszolnak, amelynek mértéke a forskolin (FK, adenilát-cikláz aktivátor) kezeléshez hasonló (21. ábra). Az emelkedés kinetikája a mutáns és a vad típus esetén hasonló volt.



21. ábra

AVP stimulus hatásának mérése Epac-BRET bioszenzorral vad típusú V2R-t kifejező sejtekben. A HEK-293 sejteket tranziensen transzfektáltuk a vad típusú V2R-ral és Epac-BRET szenzorral. 24 órával később végeztük a BRET mérést. A nyíllal jelölt időpontokban 1 μM AVP-vel, majd 10 μM forskolin (FK) stimuláltunk (teli jelölések). A kontroll sejtek vehikulum kezelést (üres jelölések) kaptak. A BRET hányados csökkenése a cAMP koncentráció emelkedésére utal, az AVP a forskolinhoz hasonló mértékben hozott létre cAMP emelkedést. Három független kísérlet átlag \pm SEM értékeit ábrázoltuk.

Ezt követően meghatároztuk a tolvaptan dózis-hatás görbáját. A kísérletek során a vegyülettel és a vehikulummal kezelt sejtek BRET hányadosának különbségéből került a hatás kiszámításra. Az inverz agonista tolvaptán az I130N-V2R mutáns receptoron nagyobb hatáserősséggel rendelkezett, mint a vad típusú receptoron (22. ábra). A vegyület hatáserőssége is meghatározásra került a receptorokon. Az I130N-V2R pEC_{50} értéke $-7,94 \pm 0,07$ M, az VT-V2R esetén ez az érték $-8,15 \pm 0,03$ M volt.

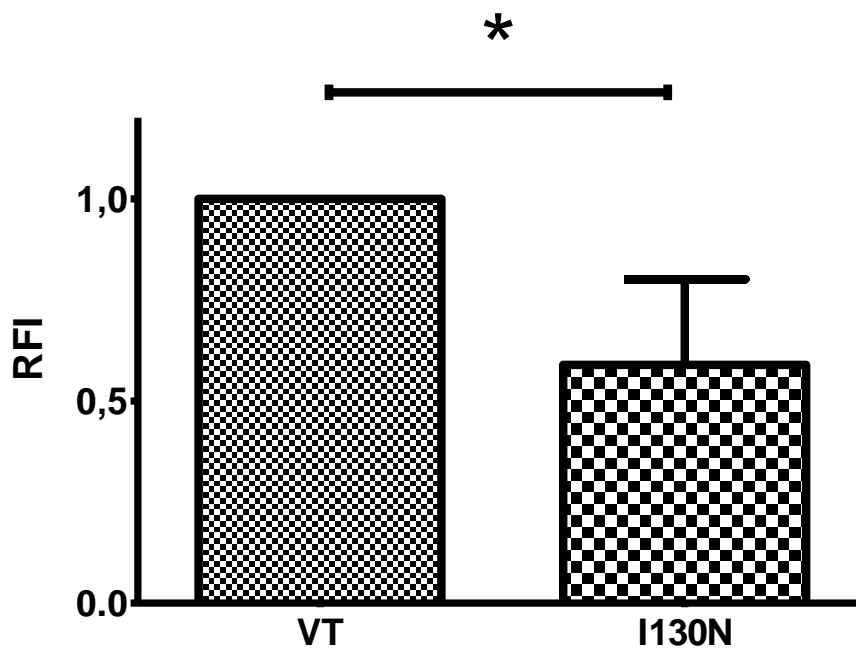


22. ábra

Tolvaptan V2R-ok bazális aktivitására kifejtett hatásának dózis-hatás görbéi cAMP mérés esetén. A HEK-293 sejteket tranziensen transzfektáltuk a vad típusú vagy I130N mutáns V2R-ral és Epac-BRET szenzorral. 24 órával később végeztük a BRET mérést. Az inverz agonista hatását a vad típusú receptort (négyzet, folyamatos vonal) és az I130N-V2R-t (kör, szaggatott vonal) kifejező sejtekben a tolvaptannal (stim) és vehikulummal kezelt (nstim) sejtek hozzáadását követő első időpontban mért BRET hányados különbségeként ábrázoltuk. A görbéket nem-lináris regressziót követően, GraphPad szoftver segítségével ábrázoltuk. A vegyület hatáserőssége nagyobb volt a mutáns, mint a vad típusú receptorokon. Három független kísérlet átlag \pm SEM értékeit ábrázoltuk.

5.2.3.2. Az I130N-V2R plazmamembrán elhelyezkedésének vizsgálata

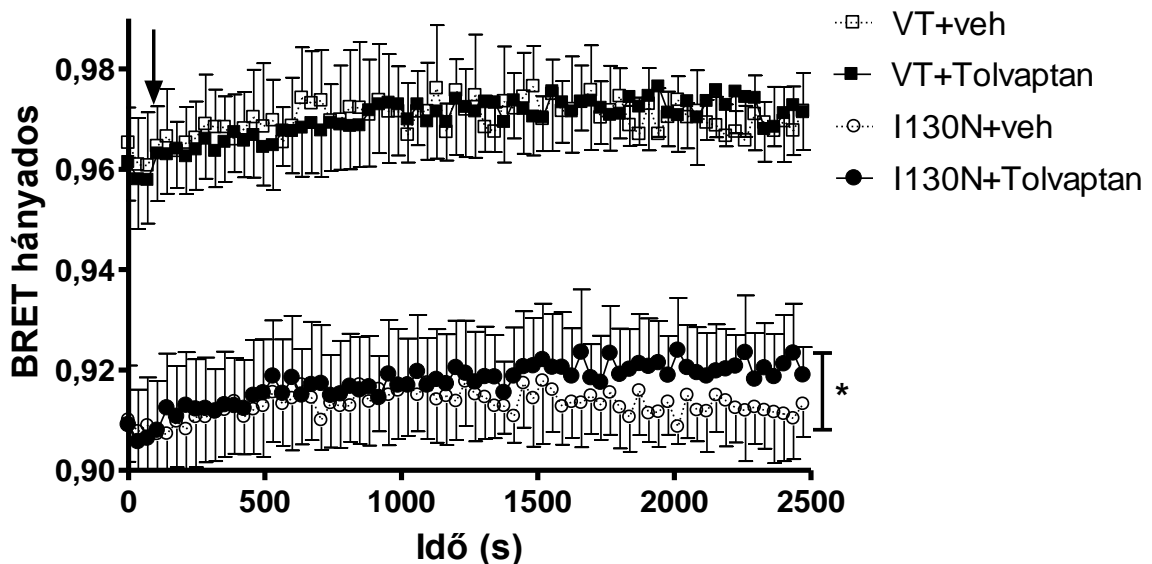
Az I130N mutáns receptor konstitutív aktivitása befolyásolhatja a receptor plazmamembrán jelenlétét az aktiváció-függő internalizációs folyamatok miatt. A plazmamembrán jelenlét kvantitatív méréséhez áramlási citometriás méréseket végeztünk. A HEK-293 sejtekben kifejezett HA-jelölt receptorokat (vad típus vagy I130N-V2R) anti-HA-Alexa488 antitestekkel festettük (23. ábra). A mérés során az I130N-V2R relatív fluoreszcens intenzitása (RFI) szignifikánsabban kisebb volt (RFI: $0,59 \pm 0,1$), mint a vad típusé (RFI: 1,0). Ez az eredmény a mutáns receptorok csökkent plazmamembrán jelenlétére utal.



23. ábra

A sejtfelszíni receptorszám meghatározása áramlási citometriával. A HA-jelölt vad típusú (VT oszlop) vagy I130N mutáns V2R-t (I130N oszlop) tranziensen kifejező, illetve üres pcDNA3.1 vektorral transzfektált sejteket anti-HA-Alexa488 monoklonális antitesttel festettük. Az áramlási citometriás mérések kiértékelésekor a mért fluoreszcens intenzitások geometriai átlagából kivontuk a háttérét (pcDNA3.1), majd a vad típusra normalizáltunk (RFI). Az I130N-V2R plazmamembrán kifejeződése szignifikánsan alacsonyabb, mint a vad típusú receptoré. Négy független kísérlet átlag \pm SEM értékeit ábrázoltuk, * $p < 0,05$.

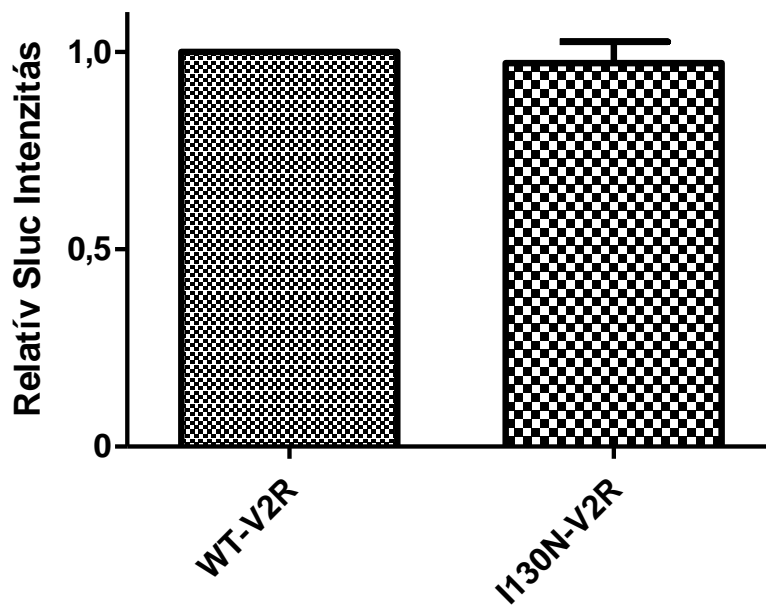
A plazmamembrán jelenlét változásainak monitorizáláshoz a BRET technikát alkalmaztuk. Az előzőekben leírt módon nem-specifikus rezonancia energiáttranszfert mértünk a jelölt receptor (V2R-Sluc) és a plazmamembránba juttatott energiaakceptor között (MP-YFP), amely tehát távolságfüggő. A BRET hányados csökkenése stimulus hatására ebben az esetben tehát a receptor plazmamembrántól történő eltávolodását és internalizációját jelzi. Az áramlási citometriás adatoknak megfelelően a bazális BRET hányados alacsonyabb az I130N-V2R-Sluc konstrukciót kifejező sejtekben (24. ábra). 100 nM tolvaptan hozzáadása szignifikánsan emeli a BRET hányadost ezekben a sejteketben.



24. ábra

V2R-ok plazmamembrán jelenlétének BRET vizsgálata. A HEK-293 sejteket transzfektáltuk VT-V2R-Sluc (négyzet) vagy I130N-V2R-Sluc (kör) konstrukciókkal, valamint a plazmamembránt jelölő MP-YFP plazmidjával. A BRET mérést 24 órával később végeztük. A jelölt időpontban a sejteket 100 nM tolvaptannal (teli jelölés) vagy vehikulummal (üres jelölés) kezeltük. A látható BRET hányados eltérés a két receptor között eltérő plazmamembrán megjelenésre utal. Tolvaptan adását követően az I130N-V2R növekvő plazmamembrán megjelenést mutat. Három független kísérlet átlag \pm SD értékeit ábrázoltuk, * $p < 0,05$.

A kísérlethez szükség volt olyan kontrollra, amely kizárja, hogy a mutáns receptor plazmamembrán jelenlétének csökkent volta kifejeződési különbségből adódott. A BRET mérés során az Sluc intenzitása (485 nm-en mérve) a sejtpermeábilis szubsztrát cöclenterazin jelenlétében az Sluc enzim kifejeződésétől függ. Így az Sluc intenzitások összehasonlítása az enzimmel jelölt receptorok mennyiségéről ad információt. A normalizált Sluc intenzitásokban (a 24. ábrán bemutatott kísérletek során vizsgálva) nem volt szignifikáns különbség a vad típusú és az I130N-V2R receptorok között, amely az összehasonlítható mértékű expressziót mutatja (25. ábra).

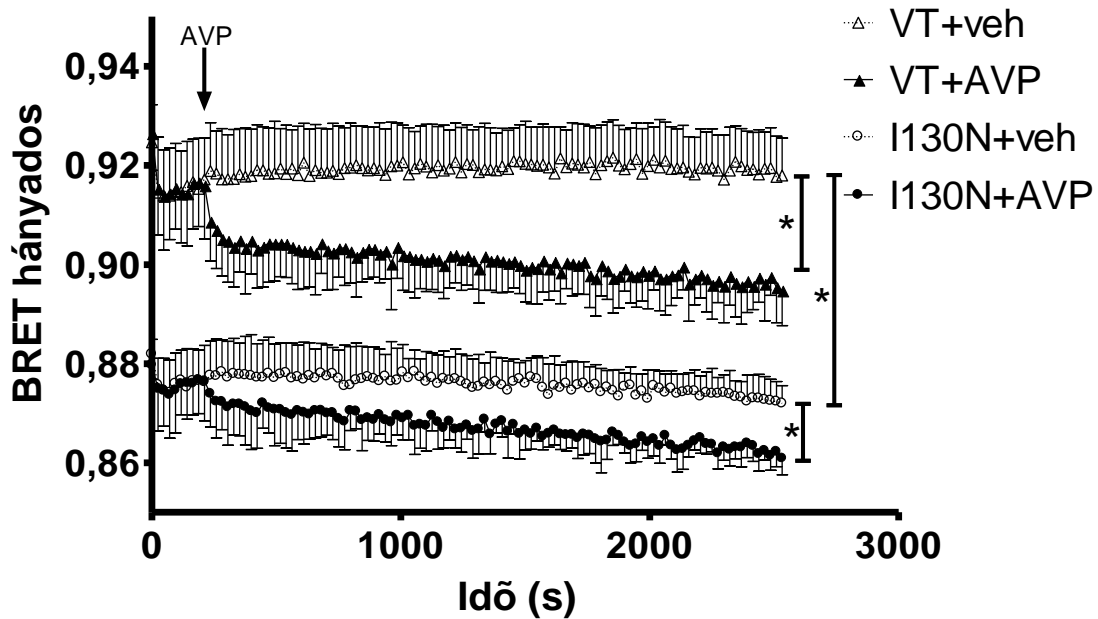


25. ábra

24. ábrán bemutatott kísérletek során detektált relatív Sluc intenzitás értékek. A sejtpermeábilis cöclenterazin hozzáadása után mért intenzitás ($I_{485\text{ nm}}$) az energiadonor (és így az általa jelölt receptor) mennyiségétől függ. A 24. ábrán látható kísérletek során a kezelések előtti két mérési pont intenzitás értékének átlagát normalizáltuk az egyes független kísérletekben a vad típusú receptor értékére. Három független kísérlet átlag \pm SEM értékeit ábrázoltuk.

A funkcionyerő V2R mutációk vizsgálatakor érdekes kérdés, hogy a konstitutív aktivitással rendelkező receptor milyen internalizációs választ ad agonista stimulus hatására. Az előzőekben ismertetett kísérleti felállásban (a receptor és a

plazmamembrán közötti BRET mérés) 1 μM AVP stimulust követően a kezdeti alacsonyabb BRET hányados további csökkenését mértük az I130N-V2R-Sluc konstrukciót kifejező sejtekben (26. ábra). A látható BRET hányados eltérés a két receptor között eltérő plazmamembrán megjelenésre utal (lásd 24. ábra). AVP adását követően az I130N-V2R csökkenő plazmamembrán megjelenést mutat.



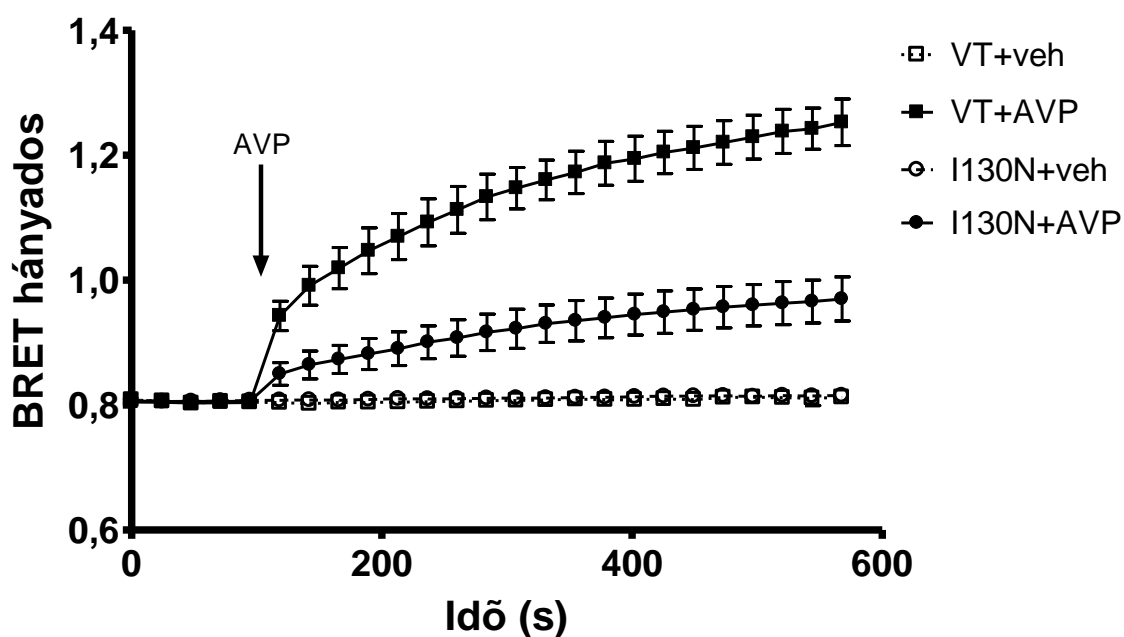
26. ábra

V2R-ok internalizációs kinetikájának és plazmamembrán jelenlétének vizsgálata. A HEK-293 sejteket transziensen transzfektáltuk VT-V2R-Sluc (háromszög) vagy I130N-V2R-Sluc (kör) konstrukciókkal, valamint a plazmamembránt jelölő MP-YFP plazmidjával. A BRET mérést 24 órával később végeztük. A jelölt időpontban a sejteket 1 μM AVP-vel (teli jelölés) vagy vehikulummal (üres jelölés) kezeltük. Három független kísérlet átlag \pm SD értékeit ábrázoltuk, $*p < 0,05$.

5.2.3.3. Az I130N-V2R internalizációs tulajdonságai

Az előzőekben bemutatott kísérletek alapján az I130N-V2R rendelkezik konstitutív internalizációval, amely internalizáció inverz agonistával gátolható, agonistával pedig tovább fokozható. A továbbiakban a mutáns receptor internalizációs tulajdonságait

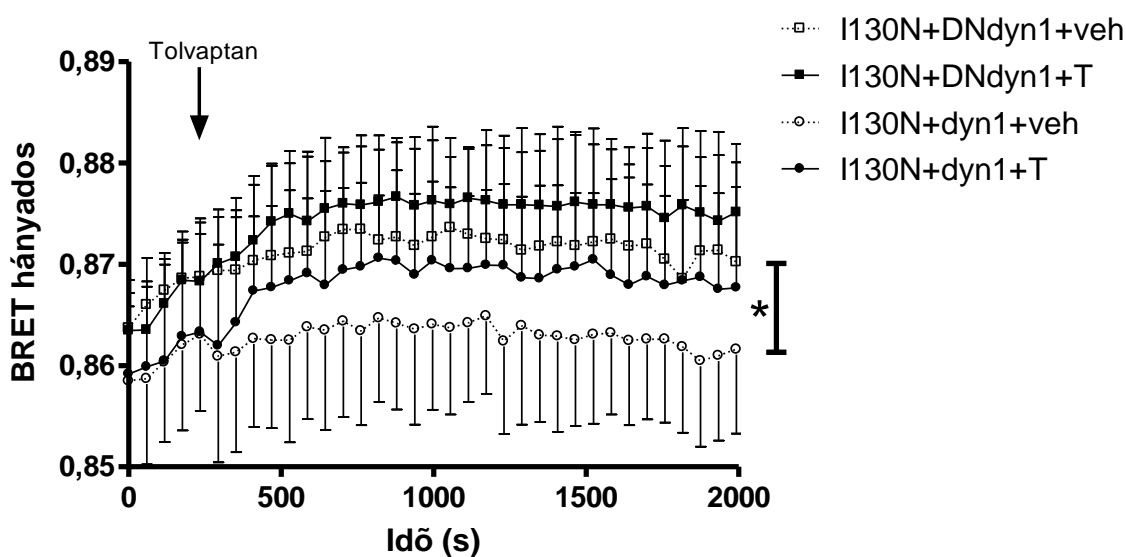
karakterizáltuk. Az I130N-V2R bazális és agonista-indukált β -arresztin2 kötését BRET módszerrel vizsgáltuk. A receptor mVenus fluoreszcens fehérjéhez kapcsolt plazmidját és a β -arresztin2-Rluc konstrukciót fejeztük ki a HEK-293 sejtekben. A vad típusú és a mutáns receptort tartalmazó sejtek bazális BRET hányadosa között nem volt különbség, amely azt jelöli, hogy a mutáns receptor agonista hiányában nem köt β -arresztin2-t (27. ábra). AVP kezelés hatására megnövekedett a BRET hányados, amely β -arresztin2 kötés azonban elmarad a vad típusétól.



27. ábra

A V2R-ok β -arresztin2 kötésének vizsgálata BRET módszerrel. A HEK-293 sejteket VT-V2R-mVenus (négyzet) vagy I130N-mVenus (kör) és β -arresztin2-Rluc konstrukciókkal transziensen transzfektáltuk a BRET mérés előtt 24 órával. A sejteket 1 μ M AVP-vel (teli jelölések) vagy vehikulummal (üres jelölések) kezeltük a jelölt időpontban. A bazális BRET hányados nem tér el a két receptor esetében. Az I130N-V2R agonista stimulust követően fokozódó β -arresztin2 kötést mutat. Három független kísérlet átlag \pm SD értékeit ábrázoltuk.

A sejtekben az internalizáció többféle útvonalon keresztül történhet, alábbi kísérleteinkben a dinamin fehérjék szerepét vizsgáltuk. Ehhez domináns negatív dynamin konstrukciót fejeztünk ki a sejtekben, együtt a vizsgált mutáns receptorral. Kontrollként vad típusú dynamint használtunk, amely az üres pcDNA3.1-hez hasonló BRET hányadost hozott létre V2R-Sluc és MP-YFP közötti energiáttranszfert mérve (az adatot nem mutatjuk), ugyanakkor használata előnyösebb, mert a plazmidról történik fehérjeszintézis a transzfekciót követően. Azon sejtek, amelyek az I130N-V2R-Sluc és az MP-YFP mellett a domináns negatív dinamin 1 (DNdyn1) fehérjét is tartalmazták, magasabb bazális BRET hányadost mutattak, mint a vad típusú dynamint (dyn1) kifejezők (28. ábra). Ez az eredmény azt jelzi, hogy DNdyn1-et tartalmazó sejtekben alacsonyabb mértékű a konstitutív internalizáció. Tolvaptan kezelés hatására ezekben a sejtekben a receptor plazmamembrán jelenléte tovább fokozható volt, azonban ez elmarad a dyn1 konstrukciót kifejező sejtekben létrejövő hatástól.

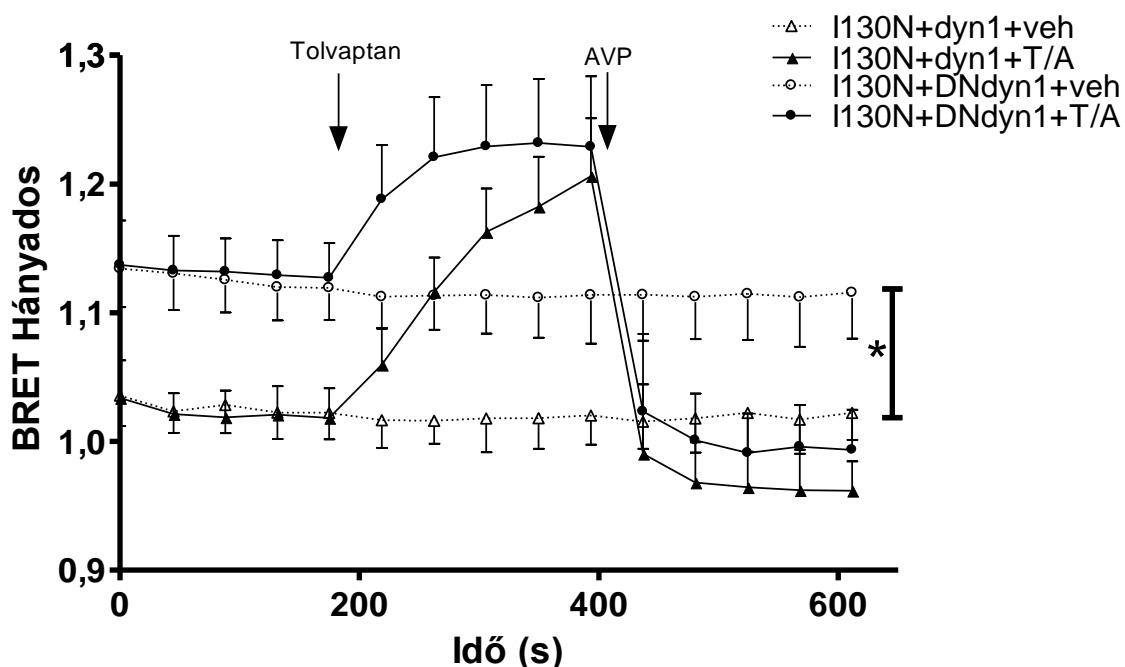


28. ábra

Domináns negatív dinamin hatása az I130N-V2R internalizációjára. A HEK-293 sejteket tranziensen transzfektáltuk I130N-V2R-Slucsal, a plazmamembránt jelölő MP-YFP plazmidjával és a domináns negatív dinamin1 (négyzet, DNdyn1) vagy vad típusú dinamin1 (kör, dyn1) konstrukciókkal. A BRET mérést 24 órával később végeztük. A jelölt időpontban a sejteket 100 nM tolvaptannal (teli jelölés) vagy vehikulummal (üres jelölés) kezeltük. A látható bazális BRET hányados eltérés a domináns negatív dinamin konstitutív internalizációt gátló hatását mutatja. Tolvaptan adását követően az I130N-V2R növekvő plazmamembrán

megjelenést mutat, amely kevésbé jelenik meg a DNdyn1-et kifejező sejtekben. Három független kísérlet átlag \pm SEM értékeit ábrázoltuk, * $p < 0,05$.

A domináns negatív dynamin mutáns receptorok bazális cAMP termelésére kifejtett hatását is vizsgáltuk. Az Epac-BRET, I130N-V2R és DNdyn1 konstrukciókat kifejező sejtekben alacsonyabb cAMP koncentráció volt mérhető, mint a kontroll sejtekben (Epac-BRET, VT-V2R és dyn1) (29. ábra). A sejteket egymást követően 100 nM tolvaptannal, majd 1 μ M AVP-vel kezelve azonban a dinamin konstrukciók nélküli sejtekben mért válaszhoz hasonló eredményeket kapunk (20. ábra).



29. ábra

Domináns negatív dinamin hatása az I130N-V2R cAMP termelésére. A HEK-293 sejteket tranziensen transzfektáltuk a vad típusú dinaminnal (háromszög, dyn1) vagy domináns negatív dinaminnal (kör, DNdyn1) és Epac-BRET szenzorral valamint az I130N-V2R plazmidjával. 24 órával később végeztük a BRET mérést. A nyíllal jelölt időpontokban 100 nM tolvaptan, illetve 1 μ M AVP kezelést alkalmaztunk (teli jelölések). A kontroll sejtekhez vehikulumot adtunk (üres jelölések). Domináns negatív dinamin jelenléte csökkenti az I130N-V2R függő cAMP produkciót. Három független kísérlet átlag \pm SEM értékeit ábrázoltuk, * $p < 0,05$.

6. Megbeszélés

A dolgozat első részében a II. Belgyógyászati Klinika férfi betegében azonosított *AVPR2* misszenz mutációt karakterizáltuk. Az N321K mutációt már azonosították, mint XNDI-hez vezető receptor mutációt, azonban ebben a publikációban nem vizsgálták a szerzők a mutáció sejtélettani következményeit (164). A beteg gyermekkorában elvégzett vízmegvonás teszt egyértelművé tette a DI diagnózis felállítását. A teszt során továbbá hatástalannak bizonyult a dDAVP, a vegyület beadását nem követte vizelet koncentráció emelkedés. Amellett, hogy teszt NDI-t valószínűsített, a családi anamnézis öröklődő betegség képét mutatta, hiszen a betegségre jellemző tünetek legalább 4 generációra visszamenőleg feltárhatóak voltak, az öröklődésmintázat pedig XNDI-re jellemző volt. Az általunk végzett genetikai vizsgálat C→G szubsztitúciót igazolt az *AVPR2* génben, amely pontmutáció aszparagin-lizin cseréhez vezet a V2R 321. aminosav pozíciójában. Az érintett aszparagin a már korábban említett NPXXY motívum első tagja. Az NPXXY konzervált szekvenciája a GFKR-ok funkciójában igen fontos szerepet játszik. A β -adrenerg receptor ligand-kötésében, G-fehérjéhez kapcsolódásában és internalizációjában is szerepet játszhat (8). Az AT1R-ban az aszparagin elmutálása jelentősen csökkenti a receptor G-fehérje kötését és így a másodlagos hírvivők mennyisége is elmarad agonista stimulust követően, azonban nem érintette a receptor internalizációját (9). V2R esetében az eddig rendelkezésre álló adatok szerint a 322. pozícióban levő prolin mutációja a receptor G_s -kapcsolódását érintette hátrányosan (165).

A bemutatottak alapján tranziens kifejeződés esetén az N321K-V2R plazmamembrán expressziója a vad típuséhoz hasonlóan bizonyult (9. ábra). Eredményeink szerint tehát a mutáns receptor kijut a sejtek felszínére és bár elképzelhető bizonyos mértékű ER retenció, nem ez a mechanizmus felelős a kialakított fenotípusért. Az N321K-V2R fiziológiás hormonnal, AVP-vel történő stimulációja a vad típushoz képest jelentősen csökkent hatáserősséget, viszont változatlan hatékonyságot mutatott ki a receptor cAMP termelésében (11. ábra A panel). A kísérletek egyik érdekes eredménye a mutáns receptor bazális cAMP szintre gyakorolt hatása volt. Az N321K-V2R a vad típusal szemben csökkent konstitutív cAMP produkciót mutatott (10. ábra). Az I130N-V2R mutánsal együtt végzett kísérleteinkben

is látható (20. ábra), hogy a N321K-V2R bazális körülmények között mérhető BRET hányadosa (stimulus előtt) – amely a sejtek cAMP szintjét reflektálja - hasonló mértékű volt ahhoz a vad típusú receptor BRET hányadosához, amelyet nagy koncentrációjú antagonistá hozzáadásával maximális gátlásnak vetettünk alá. Összefoglalva tehát, a mutáns N321K-V2R mind az agonista jelenlétében, mind annak hiányában csökkent másodlagos hírvivő koncentrációt hoz létre a sejtekben, amely jelenség a receptor károsodott G-fehérje kötésére utal (IIIa. osztályú mutáció). Fontos azonban megjegyezni, hogy mint azt korábban is írtuk, egy NDI-hez vezető mutáns receptor nem csak egy osztályba tartozhat a patomechanizmus szempontjából. Az R137H mutációt eredetileg, mint IV. osztályba tartozó mutációt írták le (169). Később mutatták ki, hogy ugyanezen mutáció a β -arresztin konstitutív kötése mellett, mind csökkent G-fehérje kötéssel, mind ER retencióval jellemezhető (74,220). Eredményeink alapján nem zárható ki, hogy a mutáns receptor csökkent ligand-affinitás tulajdonsággal is rendelkezik.

Egy szövet hormonérzékenysége alapvetően függ a receptorok deszenzitizációs és internalizációs folyamataitól, amelyek a sejt felszíni receptorszámot befolyásolják. Kísérleteinkben az N321K-V2R internalizációs tulajdonságainak meghatározása többek között BRET technikával történő β -arresztin2 kötési vizsgálattal történt agonista stimulust követően és a vad típusúhoz hasonlítottuk az eredményeket. A vad típusú receptor β -arresztin2 kötésének dózis-hatás görbéje (13. ábra) a cAMP termelés dózis-hatás görbéjéhez képest (11. A ábra) jobbra tolt AVP stimulust követően. Ez a jelenség a „tartalék” receptorok jelenségére és a másodlagos hírvivők termelésének erősítésére utal. Az elképzelés szerint egy receptor (pl. ebben az esetben a V2R) több G-fehérjét is képes aktiválni, valamint egy G-fehérje több adenilát-ciklázot aktivál, amely enzimek több másodlagos hírvivő létrehozásában játszanak szerepet inaktiválódásukig. Ilyen erősítés nincs jelen a receptor β -arresztin kötésekor (11,221).

A vad típusú receptorral szemben, az N321K-V2R esetén nem volt mérhető β -arresztin2 kötés (13. ábra). Elképzelhető, hogy a használt módszer és/vagy az AVP koncentrációk miatt nem detektáltunk β -arresztin2 kötést. A kísérletben használnál nagyobb hormon koncentrációk még *in vitro* kísérletekben is extrém magasnak számítottak volna, így relevánsabb vizsgálatként az N321K-V2R internalizációs kinetikáját határoztuk meg (14. ábra). A BRET-alapú mérésben a plazmamembránra

irányított YFP szolgált a plazmamembrán indikátoraként és a luciferáz-jelölt receptorok internalizációját a jelölt sejtfelszíntől történő távolság változásként mértük stimulust követően (212). Bár a technika bizonyos körülmények között alkalmas a receptorok intramembrán elmozdulásának monitorizálására is, a vad típusú és az N321K-V2R kinetikájának összehasonlítása elsősorban az internalizációt tükrözi (217). Ebben a kísérleti felállásban, a mutáns receptorok vad típuséhoz képest jelentősen csökkent mértékű internalizációját regisztráltuk. Az N321K-V2R kismértékben megtartott BRET hányados csökkenése utalhat a kismértékű β -arresztin-függő és az attól független internalizációra is. A vizsgálatokból levonható következtetés, hogy szemben az AT1R-rel, a V2R NPXXY motívumában bekövetkező mutáció érinti a receptor internalizációs folyamatokat (8). Fontos ugyanakkor megjegyezni, hogy a csökkent internalizáció nem jár feltétlenül a receptor folyamatos szignalizációs tevékenységével a plazmamembránban. Látható, hogy szemben a vad típusával, az N321K-V2R cAMP jele tranziens jellegű (10. ábra). A jelenségre magyarázat lehet, hogy a mutáció nem befolyásolja jelentősen a receptor deszenzitizációját (10. ábra). A korábbiakban írtak szerint, a receptor β -arresztin-függő szétkapcsolása a G-fehérjétől nem az egyetlen lehetséges deszenzitizációs mechanizmus. Másodlagos hírvivők által aktivált kinázok receptorfoszforilációja az aktiváció termináláshoz vezethet (25).

A DI-os betegek diagnosztikájában és terápiájában is kiemelt szerepe van az AVP analóg dDAVP-nek. Kísérleteinkben ezért vizsgáltuk a dDAVP hatását az N321K-V2R-ra. A kísérletben nem detektáltunk cAMP koncentráció emelkedést a mutáns receptort kifejező sejtekben (11. ábra B panel). Ez az eredmény konzisztens a beteg klinikai vizsgálati eredményeivel, a gyermekkori dDAVP próba nem volt hatással a teszt során vizsgált paraméterekre. Dózis-hatás vizsgálatunkban a dDAVP AVP-hez képest csökkent hatáserősségét regisztráltuk a vad típusú receptorokat kifejező sejtekben cAMP szint mérésekor. A jelenség ismert az irodalomban: bár a dDAVP specifikus V2R agonista, affinitása a receptorhoz elmarad a fiziológias hormonétól (150). Összegezve a kapott eredményeket elmondhatjuk, hogy az N321K mutáció a V2R olyan konformációt alakít ki, amely csökkent ligand affinitáshoz és/vagy G-fehérje kötéshez vezet. Ilyen körülmények között a dDAVP hatástalan a mutáns receptor cAMP termelésére azokban az ésszerű koncentrációkban, amiket a kísérletek során használtunk.

A munkahipotézisünk szerint, egy receptor megváltozott konformációja csökkentheti egy adott agonista hatáserősségét a receptoron, de a jelenség eltérően érintheti a receptor más agonistáit. Egy olyan agonista azonosítása, amely a konformáció változás ellenére képes aktiválni a receptorokat, az N321K-hoz hasonló mutációk esetén a terápiás stratégia alapját képezheti. Fontos ugyanakkor megjegyezni, hogy az eltérő konformációk esetében más és más agonisták bizonyulhatnak a legoptimálisabbnak. A munkahipotézis bizonyításához és a megfelelő agonista azonosításához néhány kereskedelmi forgalomban kapható AVP analóg agonistát teszteltünk, közös tulajdonságuk a magas V2R affinitásuk volt (15. ábra és 2. táblázat). Az LVP, dVDAVP és az AsuAVP vegyületek hasonló hatáserősséggel bírtak a vad típusú receptoron. Ezekről elmaradt a PVDAVP hatáserőssége, valamint ezzel a vegyülettel stimulálva az N321K-V2R-t kifejező sejtekben nem mértünk cAMP koncentráció emelkedést. A vegyület speciális tulajdonságát, miszerint bár V2R-on agonista, V1aR-on antagonistá, a jó mellékhatásprofil miatt szerettük volna kihasználni (218). A legnagyobb hatáserősséggel a mutáns receptoron a dVDAVP rendelkezett. A munkahipotézisünket igazolták az eredmények, amelyek arra utalnak, hogy az N321K mutáció csökkent hatással volt az agonistára. Az N321K-V2R-on és a vad típusú receptoron mért agonista hatáserősség különbsége a dVDAVP esetén egy nagyságrenddel kisebb, mint más vegyületeknél (a ΔpEC_{50} érték a dVDAVP-re 3,71 M, az LVP és AsuAVP esetén 4,56 M és 4,62 M volt). Statisztikai analízissel a különbségek szignifikánsnak bizonyultak. Az N321K mutáció tehát eltérő agonista érzékenységgel járó receptor konformációt okoz, amely sokkal előnyösebb a dVDAVP általi, mint egyéb vegyülettel történő aktivációra. Szerencsére a vizsgált vegyületek közül leghatásosabbnak bizonyuló dVDAVP V2R szelektív agonista (149). Egy nagy dózisú agonista kezelés NDI betegekben veszélyes lehet azok vaszkuláris V1aR keresztreakciója miatt (222). Fiziológiásan az AVP plazmakoncentrációja nem éri el a vazokonstriktóhoz szükséges szintet, de a DI-ban alkalmazott magas agonista koncentráció elérheti ezt a szintet és vérnyomás emelkedéshez vezethet. Szeptikus sokk vizsgálatok szerint az agonista hatás a V1aR-on akár a szív, a vese és belek csökkent perfúziójához is vezethet (223). A várható mellékhatások miatt a dVDAVP N321K-V2R-on hatásos, cAMP termelést fokozó koncentrációjának perifériás arteriolákra gyakorolt vazokonstriktor hatását vizsgáltuk (16. ábra). Mint látható, az igen magas 10

μM végső dVDAVP koncentráció esetén sem detektáltunk vazokonstriktiót az egér arteriolákon. Eredményeink szerint a megfelelő (meglehetősen magas) dózisu kezelés a vegyülettel jótékony hatással lehet a beteg poliuriájára és polidiszziájára, veszélyes vazokonstriktió-függő mellékhatások nélkül.

Bár a dDAVP dominanciája egyértelmű DI-os betegek terápiájában, korai közlemények utalnak a dVDAVP klinikai használatára. Czako és munkatársai klinikai vizsgálatban mutatták, hogy a dVDAVP nemcsak CDI-s beteg terápiájában bizonyult hatékonyabbnak a dDAVP-nél, de igen érdekes módon leírták a vegyület rövid hatástartamú, közepes mértékű antidiuretikus hatását „ADH-rezisztens” diabétesz inszpidusos betegekben (224). Intravénás használat esetén a dVDAVP továbbá háromszor hosszabb hatással rendelkezett CDI-s betegekben, mint a dDAVP, valamint intranazálisan is adagolható volt.

A kísérletek másik részében egy a kollaborációs partner által azonosított funkcionyerő V2R-t vizsgáltunk. Az eddig nem ismert mutáció NSIAD betegséghez vezetett egy német betegben, amely betegség hiponatrémia és alacsony AVP plazmaszint miatt került felismerésre. Az *AVPR2* gén szekvenálása igazolta a misszenz mutációt, amely izoleucin-aszparagin cseréhez vezet a receptor fehérje 130. pozíciójában. A receptor karakterizálása során derült fény az I130N-V2R-t kifejező sejtek magas bazális cAMP szintjére (20. ábra). A receptor konstitutív aktivitása tolvaptan inverz agonistával gátolható volt. Bár az irodalomban eléggé elterjedt a vegyület antagonistá megnevezése is, a fenti kísérlet mutatja a tolvaptan inverz agonista tulajdonságát: képes a vad típusú receptor bazális aktivitását is csökkenteni. Az I130N-V2R ezen tulajdonsága hasonló volt az F229V NSAID-ot okozó V2R mutációhoz és ellentétes a tolvaptan-rezisztens R137C/L mutációkkal (204,205). A kísérlet legfontosabb klinikai vonatkozása az lehet, hogy a tolvaptan azonnal csökkentette mutáns receptor cAMP termelését a sejtekben, így az I130N és ehhez hasonló mutációkat hordozó NSIAD-os betegek esetében a vegyület terápiás lehetőséggel kecsegtet. A 20. ábrán látható, hogy az I130N-V2R cAMP produkciója AVP hormon stimulációval tovább fokozható volt, szemben az R137C/L mutánsokkal (204).

Kísérleteinkkel azt is bizonyítottuk, hogy az I130N-V2R képes agonista-indukált β -arresztin kötésre (27. ábra). Ugyanakkor az is látható, hogy a robusztus

cAMP termelés ellenére, a konstitutív aktív konformációjú receptor nem mutatott bazális β -arresztin kötést. Az eredményeket összefoglalva, az AVP hiányában létrejövő konstitutív aktív I130N-V2R konformációja különbözik az agonista kötésekor létrejövő aktív receptor konformációtól és egyértelműen különbözik az AVP által aktivált vad típusétól. Ilyen tekintetben az I130N-V2R hasonlít az irodalomban leírt F229V-V2R-ra, mivel mindkettő esetében hiányzik a bazális β -arresztin kötés, szemben a betegség felfedezésekor leírt R137C/L mutációkkal (204,205,220). Az eredmények arra utalnak továbbá, hogy az I130N misszenz mutáció jelátvitel szelektív mutáns V2R-nak tekinthető, hiszen a G-fehérje függő jelátviteli út szelektíven aktiválódik. A megállapítás jól illeszkedik abba a koncepcióba, hogy a GFKR-oknak többféle aktív konformációja létezik, amelyek eltérő karakterisztikával bírnak (51).

Konfokális mikroszkópiával kimutattuk, hogy az I130N-V2R megjelenik a sejtek plazmamembránján, de a sejtek belsejében nem jelent meg intracelluláris vezikulákban (19. ábra). Ez a megfigyelés hasonló az F229V-V2R sejten belüli megoszlásához és megmagyarázható az I130N-V2R mutáns receptor hiányzó bazális β -arresztin kötésével (205). A plazmamembrán mutáns receptor mennyiségét mérő áramlási citometriás vizsgálatok azonban a vad típushoz képest csökkent I130N-V2R sejt felszíni kifejeződést mutattak (23. ábra).

A kérdés tisztázására megvizsgáltuk a mutáns receptor internalizációs tulajdonságait (24. és 26. ábra). Agonista stimulust követően igen gyors internalizációra utaló BRET hányados csökkenést mértünk az I130N-V2R-t kifejező sejtekben. A kísérleti eredmény azonban egyúttal az áramlási citometriás vizsgálatokkal konzisztens bazális BRET hányadost egyértelműen jelzi, amely a mutáns receptor vad típushoz képest csökkent plazmamembrán elhelyezkedését mutatja. Ez az alacsonyabb bazális plazmamembrán receptor mennyiség csökken tovább AVP stimulus hatására. Tolvaptan adását követően az I130N-V2R-Sluc és MP-YFP (plazmamembrán) közötti távolságot reflektáló BRET hányados lassú emelkedését tapasztaltuk, ez a jelenség azonban a vad típusú receptor esetében elmaradt. Az eredmények alapján megállapítható, hogy az I130N-V2R konstitutív aktivitása nemcsak a cAMP termelést érinti, de a receptor inverz agonista tolvaptannal gátolható internalizációjához is vezet. Az I130N-V2R szemben az R137C/L mutációkkal, agonista hiányában nem kötődik β -arresztinhez, ugyanakkor mégis tolvaptan szenzitív módon konstitutívan internalizálódik. Ez a megfigyelés

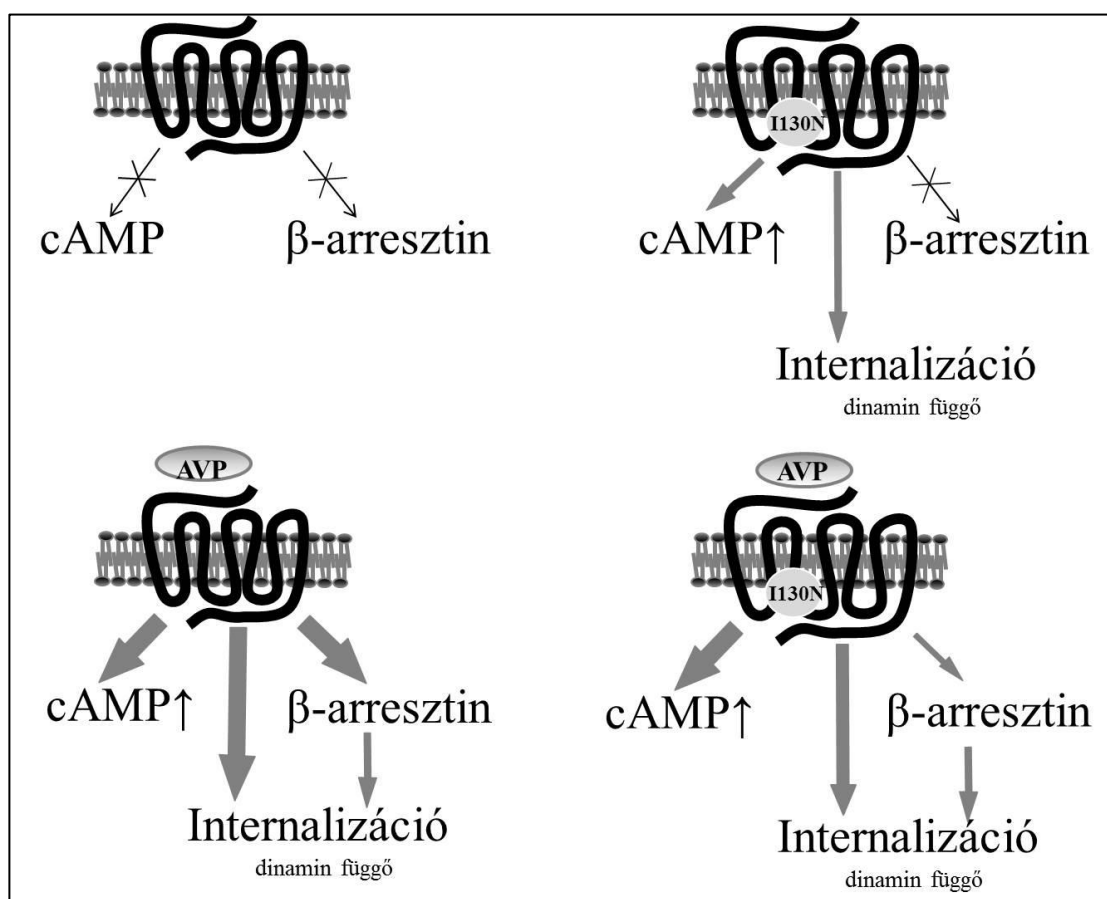
egyúttal felveti, hogy az I130N-V2R az F229V-V2R-tól eltérő konformációval rendelkezik. Carpentier és munkatársainak konklúziója szerint az F229V mutáció nem okoz konstitutív internalizációt (205). A közlemény hátránya ugyanakkor, hogy a kísérletekben csak receptor/ β -arresztin és β -arresztin/AP2 (adapter protein) interakciót mértek domináns negatív dinamin és agonista jelenlétében. Nem vizsgálták azonban, hogy inverz agonisták milyen hatással lennének a mutáns receptor sejtfelszíni kifejeződésére. A kísérleteinkben látott eltérés az I130N-V2R konstitutív és agonista indukált internalizációjának mechanizmusa között nem egyedi a GFKR-ok között, korábban leírták a β -arresztin függő agonista indukált és a β -arresztin független konstitutív internalizáció lehetőségét (225-227). Azt is fontos kiemelni, hogy más GFKR-ok esetén sem következik a konstitutív aktivitásból a receptor bazális internalizációja (228).

A internalizációs mechanizmus pontos megértésének érdekében kísérleteinkben megvizsgáltuk a domináns negatív dinamin hatását is (28. ábra). A domináns negatív tulajdonsággal bíró fehérje kifejezése a sejtekben az I130N-V2R plazmamembrán megjelenését fokozta. A tolvaptan hozzáadása kevésbé kifejezett hatást hozott létre a vad típusú dinamint tartalmazó sejtekkel összehasonlítva. Az eredmények alapján tehát az I130N mutáció hatására a receptor bazális endocitózisa független β -arresztintől, de dinamin függő módon történik. Hasonló körülmények között végzett kísérletekben a domináns negatív dinamin az R137C/L mutánsok sejtfelszíni kifejeződését és β -arresztin/AP2 interakcióját fokozta, amely a szerzők szerint arra utal, hogy az R137C/L receptorok csapdába estek a plazmamembránban és β -arresztin-AP2 komplexben felhalmozódtak (204). Az F229V-V2R azonban nem mutatott fokozódást a β -arresztin/AP2 interakció mérésekor domináns negatív dinamin jelenlétében, amely eredmény konzisztens a mutáns bazális endocitózisának β -arresztin-független mechanizmusával. Ebben a munkában azonban nem vizsgálták a domináns negatív dinamin hatását az F229-V2R sejtfelszíni megjelenésére (205). Az I130N-V2R-nál feltárt endocitotikus pálya jól ismert a GFKR-ok esetében. Az irodalomban leírtak szerint az endocitotikus funkciók plasztikusak és a receptorok képesek β -arresztin-független, de dinamin-függő módon a sejtek belsejébe jutni (43,229-231).

A domináns negatív dinamin jelenlétében végzett cAMP mérések az I130N-V2R egyik érdekes tulajdonságára hívták fel a figyelmünket, amely mérések alapján is ez a

mutáns a többi ismert NSIAD-ot okozó mutációtól igen eltérő tulajdonságokkal rendelkezik (29. ábra). Domináns negatív dinamin jelenlétében az I130N-V2R-t kifejező sejtek cAMP szintje meglepő módon elmaradt a kontroll sejtekétől és így ellentétes irányban változott az irodalomban leírt mutánsokhoz képest. A jelenség magyarázata a I130N mutációt hordozó receptor heterológ deszenzitizációja lehet. A V2R esetében a cAMP által aktivált PKA-függő foszforiláció szétkapcsolja a receptort a G-fehérjétől (24). Carpentier és munkatársai szerint az R137C/L mutáns receptorok „bezáródtak” aktív konformációjukba. ezek a receptorok érzéketlenek a deszenzitizációs mechanizmusokra.

Az I130N misszenz mutáció miatt létrejövő változásokat a V2R funkciójában a 30. ábra foglalja össze.



30. ábra

Az I130N mutáció funkcionális következményei a receptor működésre. A nyilak vastagsága a cAMP jel, internalizáció és a β -arresztin kötés mértékét jelzi.

7. Következtetések

Genetikai vizsgálattal a II. sz. Belgyógyászati Klinikán kezelt beteg esetében a V2R 321. pozíciójában aszparigin-lizin aminosav cserét azonosítottunk. *In vitro* vizsgálataink alapján az N321K-V2R kifejeződik a sejtek plazmamembránján, a vad típusú receptorhoz hasonló mennyiségben megjelenik a sejtek felszínén. A mutáns V2R bazális cAMP termelése elmarad a vad típusú receptorétól, AVP stimulus esetén mért dózis-hatás görbéje pedig jelentősen csökkent hatáserőséget és változatlan hatékonyságot mutatott. Patomechanizmus alapján a receptor III. osztályba tartozó V2R mutáns, amely károsodott G-fehérje kötési képességgel bír. Az N321K-V2R internalizációs kinetikája a vad típusú receptorhoz képest csökkent mértékű. Kimutattuk, hogy a mutáció következményeként olyan receptor konformáció jön létre, amely eltérő agonista érzékenységhez vezet. Kísérleteink alapján a dVDAVP képes a mutáns receptort olyan koncentrációban aktiválni, amely nem hoz létre V1R mediált vazokonstriktiót. Mindezek alapján a terápiás stratégia alapja a kedvező mellékhatás profillal rendelkező dVDAVP adása lehet az N321K mutációt hordozó betegeknek.

Kísérleteink alapján az NSIAD betegség fenotípusát létrehozó I130N mutáció funkciónyerő GFKR mutáció. Az I130N-V2R kijut a sejtek felszínére, de a plazmamembránban kisebb mennyiségben helyezkedik el, mint a vad típusú receptor. Funkcionális vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a mutáns receptor emelkedett bazális cAMP termeléshez vezet a sejtekben, amely tolvaptannal gátolható, AVP adásával fokozható volt. Az emelkedett bazális aktivitás az I130N-V2R konstitutív internalizációjával jár együtt, amely a csökkent plazmamembrán megjelenés háttérében áll. A mutáns receptor konstitutív internalizációja β -arresztin2-független, de dinamin-függő mechanizmussal történik. Eredményeink alapján elfogult aktív receptor-konformáció jön létre a mutáció miatt, amely szelektíven aktiválja a G-fehérje-függő jelátviteli utat. Az I130N-V2R agonista-indukált internalizációja β -arresztin2-függőnek bizonyult. Kísérleteink szerint az NSIAD komplikációjaként fellépő patológiás állapotok rendezésében tolvaptan adása lehet a terápia alapja.

8. Összefoglalás

A GFKR-ok a fiziológias folyamatok alapvető szabályozói, mutációik betegségeket okoznak. A V2R a vesében kifejeződve az arginin-vasopresszin hormon hatását közvetíti és a vízhomeosztázis centrális szabályozója. A V2R funkcióvesztő mutációja NDI betegséghez vezet. A betegségre jellemző poliuria, polidipszia és hiposzténuria folyamatos vízfelvétellel kompenzálható, de konvencionális terápiával nem gyógyítható. A funkcióvesztő mutációk több, egymástól eltérő mechanizmussal károsíthatják a V2R funkcióját a sejtekben. A V2R funkciónyerő mutációja NSIAD betegséghez vezet. A nemrégiben felfedezett betegség hiponatrémiát okoz, amely állapot felnőttekben tünetmentes lehet, azonban csecsemőkben és kisgyermekekben görcsállapotok kialakulásához vezethet.

Eredményeink szerint az általunk vizsgált NDI-os beteg N321K mutációt hordoz. Az N321K-V2R nem szenved ER retenciót, kijut a sejtek plazmamembránjára. Bár a receptor fiziológias hormon stimulusra a vad típuséhoz hasonló hatékonyságot mutatott, jelentős hatáserősség csökkenés jellemző rá. Kimutattuk, hogy a mutáns receptor csökkent G-fehérje kötési képessége állhat a funkcióvesztés mögött. A károsodott internalizációs folyamatokért az I130N-V2R nem detektálható β -arresztin kötése lehet felelős. A mutáció által létrehozott konformáció agonista szelektivitásnak kedvez, nagyobb az érzékenysége a dVDAVP, mint más vizsgált peptidek iránt. A N321K-V2R funkciója megmenthető dVDAVP adásával, cAMP termelést aktiváló koncentrációban nem hozott létre vazokonstriktiót. Vizsgálatainkkal karakterizáltuk az N321K mutációt és eredményeink alapján a terápiás stratégia alapja dVDAVP adása lehet a mutációt hordozó betegeknek.

A NSIAD betegséghez okozó új, eddig nem ismert I130N mutációt karakterizáltunk. A mutáció elfogult receptor konformációhoz vezet. A receptor emelkedett bazális cAMP termelést okoz a sejtekben, de aktivitása nem jár konstitutív β -arresztin kötéssel. Az I130N-V2R azonban agonista hiányában is internalizálódik, dinamin-függő módon. A receptor aktivitása tolvaptannal gátolható, a vegyület a sejtfelszíni receptor mennyiséget is növeli. Eredményeink alapján a főleg gyermekkorban jelentkező NSIAD komplikációk esetén tolvaptan adása segíthet a mutációt hordozó betegeknek.

9. Summary

The G-protein coupled receptors (GPCR) are essential in the regulation of physiological processes. Mutations of GPCRs may lead to diseases. V2R expressed in the kidney mediates the water-conserving effect of the AVP hormone. Loss-of-function mutations of the V2R lead to NDI. The symptoms of NDI (polyuria, polydipsia, hyposthenuria) may be compensated with excessive water-uptake. Until today, there is no effective therapy for NDI. Various mechanisms may be responsible for the impaired receptor functions. Gain-of-function mutations of the V2R lead to NSIAD disease. This recently discovered syndrome may cause hyponatremia and especially in infants, convulsions.

We identified a not characterized mutation in our patient. We demonstrated that N321K mutation does not lead to ER retention, mutant receptors can reach the plasma membrane of the cells. The mutant receptor showed decreased potency and unchanged efficacy for AVP, most likely due to impaired G-protein coupling. The N321K-V2R showed impaired internalization and we could not detect β -arrestin binding. The mutant receptor had different sensitivity for agonists. Our results showed, that the receptor function may be rescued with the administration of dDAVP without detectible side effects on V1R. Based on our findings, a therapeutic strategy can be formed for patients carrying N321K mutation.

We characterized a newly identified gain-of-function mutation of the V2R. The conformation of the I130N receptor leads to selective G-protein activation and cAMP production without β -arrestin binding. The biased receptor showed constitutive internalization, which process was dynamin dependent. The activity of the I130N-V2R can be blocked with tolvaptan and the inverse agonist also leads to increased cell surface expression of the receptor. According to our data, tolvaptan could be the treatment for seizures resulting from NSIAD and hyponatremia in children carrying the I130N mutation.

10. Irodalomjegyzék

1. Lagerstrom, M. C., and Schioth, H. B. (2008) Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery* **7**, 339-357
2. Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G., and Schioth, H. B. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular pharmacology* **63**, 1256-1272
3. Vandergheynst, F., Pradier, O., Beukinga, I., Kornreich, A., Vassart, G., and Decaux, G. (2012) Lack of responsiveness to 1-desamino-D arginin vasopressin (desmopressin) in male patients with nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis: from bench to bedside. *European journal of clinical investigation* **42**, 254-259
4. Kruse, A. C., Hu, J., Pan, A. C., Arlow, D. H., Rosenbaum, D. M., Rosemond, E., Green, H. F., Liu, T., Chae, P. S., Dror, R. O., Shaw, D. E., Weis, W. I., Wess, J., and Kobilka, B. K. (2012) Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **482**, 552-556
5. Dror, R. O., Pan, A. C., Arlow, D. H., Borhani, D. W., Maragakis, P., Shan, Y., Xu, H., and Shaw, D. E. (2011) Pathway and mechanism of drug binding to G-protein-coupled receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 13118-13123
6. Manglik, A., Kruse, A. C., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Mathiesen, J. M., Sunahara, R. K., Pardo, L., Weis, W. I., Kobilka, B. K., and Granier, S. (2012) Crystal structure of the micro-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* **485**, 321-326
7. Rasmussen, S. G., DeVree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Chae, P. S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J. M., Shah, S. T., Lyons, J. A., Caffrey, M., Gellman, S. H., Steyaert, J., Skiniotis, G., Weis, W. I., Sunahara, R. K., and Kobilka, B. K. (2011) Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **477**, 549-555
8. Barak, L. S., Menard, L., Ferguson, S. S., Colapietro, A. M., and Caron, M. G. (1995) The conserved seven-transmembrane sequence NP(X)₂3Y of the G-protein-coupled receptor superfamily regulates multiple properties of the beta 2-adrenergic receptor. *Biochemistry* **34**, 15407-15414
9. Hunyady, L., Bor, M., Baukal, A. J., Balla, T., and Catt, K. J. (1995) A conserved NPLFY sequence contributes to agonist binding and signal transduction but is not an internalization signal for the type 1 angiotensin II receptor. *The Journal of biological chemistry* **270**, 16602-16609
10. Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiological reviews* **85**, 1159-1204
11. Hunyady, L., and Catt, K. J. (2006) Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Molecular endocrinology* **20**, 953-970

12. Frauenfelder, H., Sligar, S. G., and Wolynes, P. G. (1991) The energy landscapes and motions of proteins. *Science* **254**, 1598-1603
13. Kenakin, T. (2004) Principles: receptor theory in pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 186-192
14. Kobilka, B. K., and Deupi, X. (2007) Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* **28**, 397-406
15. Seifert, R., and Wenzel-Seifert, K. (2002) Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **366**, 381-416
16. Adan, R. A. (2006) Constitutive receptor activity series: endogenous inverse agonists and constitutive receptor activity in the melanocortin system. *Trends Pharmacol Sci* **27**, 183-186
17. Wieland, K., Bongers, G., Yamamoto, Y., Hashimoto, T., Yamatodani, A., Menge, W. M., Timmerman, H., Lovenberg, T. W., and Leurs, R. (2001) Constitutive activity of histamine h(3) receptors stably expressed in SK-N-MC cells: display of agonism and inverse agonism by H(3) antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* **299**, 908-914
18. Turu, G., and Hunyady, L. (2010) Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *J Mol Endocrinol* **44**, 75-85
19. Kudo, M., Osuga, Y., Kobilka, B. K., and Hsueh, A. J. (1996) Transmembrane regions V and VI of the human luteinizing hormone receptor are required for constitutive activation by a mutation in the third intracellular loop. *The Journal of biological chemistry* **271**, 22470-22478
20. Bond, R. A., and Ijzerman, A. P. (2006) Recent developments in constitutive receptor activity and inverse agonism, and their potential for GPCR drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* **27**, 92-96
21. Premont, R. T., and Gainetdinov, R. R. (2007) Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol* **69**, 511-534
22. Oppermann, M., Freedman, N. J., Alexander, R. W., and Lefkowitz, R. J. (1996) Phosphorylation of the type 1A angiotensin II receptor by G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C. *The Journal of biological chemistry* **271**, 13266-13272
23. Stadel, J. M., Nambi, P., Shorr, R. G., Sawyer, D. F., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1983) Catecholamine-induced desensitization of turkey erythrocyte adenylate cyclase is associated with phosphorylation of the beta-adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**, 3173-3177
24. Hausdorff, W. P., Bouvier, M., O'Dowd, B. F., Irons, G. P., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1989) Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *The Journal of biological chemistry* **264**, 12657-12665
25. Ferguson, S. S. (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* **53**, 1-24

26. Tang, H., Guo, D. F., Porter, J. P., Wanaka, Y., and Inagami, T. (1998) Role of cytoplasmic tail of the type 1A angiotensin II receptor in agonist- and phorbol ester-induced desensitization. *Circ Res* **82**, 523-531
27. Benovic, J. L., Kuhn, H., Weyand, I., Codina, J., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1987) Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 8879-8882
28. Kohout, T. A., and Lefkowitz, R. J. (2003) Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Molecular pharmacology* **63**, 9-18
29. Granzin, J., Wilden, U., Choe, H. W., Labahn, J., Krafft, B., and Buldt, G. (1998) X-ray crystal structure of arrestin from bovine rod outer segments. *Nature* **391**, 918-921
30. Han, M., Gurevich, V. V., Vishnivetskiy, S. A., Sigler, P. B., and Schubert, C. (2001) Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane Translocation. *Structure* **9**, 869-880
31. Hirsch, J. A., Schubert, C., Gurevich, V. V., and Sigler, P. B. (1999) The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation. *Cell* **97**, 257-269
32. Moore, C. A., Milano, S. K., and Benovic, J. L. (2007) Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol* **69**, 451-482
33. Ungewickell, E., and Branton, D. (1981) Assembly units of clathrin coats. *Nature* **289**, 420-422
34. Kirchhausen, T. (2000) Clathrin. *Annu Rev Biochem* **69**, 699-727
35. Ahle, S., Mann, A., Eichelsbacher, U., and Ungewickell, E. (1988) Structural relationships between clathrin assembly proteins from the Golgi and the plasma membrane. *EMBO J* **7**, 919-929
36. Krupnick, J. G., Goodman, O. B., Jr., Keen, J. H., and Benovic, J. L. (1997) Arrestin/clathrin interaction. Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxy terminus. *The Journal of biological chemistry* **272**, 15011-15016
37. Laporte, S. A., Oakley, R. H., Zhang, J., Holt, J. A., Ferguson, S. S., Caron, M. G., and Barak, L. S. (1999) The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 3712-3717
38. Zhang, J., Barak, L. S., Anborgh, P. H., Laporte, S. A., Caron, M. G., and Ferguson, S. S. (1999) Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes. *The Journal of biological chemistry* **274**, 10999-11006
39. Takei, K., McPherson, P. S., Schmid, S. L., and De Camilli, P. (1995) Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. *Nature* **374**, 186-190
40. van der Blik, A. M., Redelmeier, T. E., Damke, H., Tisdale, E. J., Meyerowitz, E. M., and Schmid, S. L. (1993) Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *J Cell Biol* **122**, 553-563

41. Seachrist, J. L., and Ferguson, S. S. (2003) Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases. *Life Sci* **74**, 225-235
42. Koch, T., Widera, A., Bartzsch, K., Schulz, S., Brandenburg, L. O., Wundrack, N., Beyer, A., Grecksch, G., and Holtt, V. (2005) Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance. *Molecular pharmacology* **67**, 280-287
43. Claing, A., Laporte, S. A., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (2002) Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Progress in neurobiology* **66**, 61-79
44. Shenoy, S. K., and Lefkowitz, R. J. (2003) Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *The Biochemical journal* **375**, 503-515
45. Luttrell, L. M., Ferguson, S. S., Daaka, Y., Miller, W. E., Maudsley, S., Della Rocca, G. J., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D. K., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1999) Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* **283**, 655-661
46. Luttrell, L. M., Roudabush, F. L., Choy, E. W., Miller, W. E., Field, M. E., Pierce, K. L., and Lefkowitz, R. J. (2001) Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 2449-2454
47. Seta, K., Nanamori, M., Modrall, J. G., Neubig, R. R., and Sadoshima, J. (2002) AT1 receptor mutant lacking heterotrimeric G protein coupling activates the Src-Ras-ERK pathway without nuclear translocation of ERKs. *The Journal of biological chemistry* **277**, 9268-9277
48. Tohgo, A., Pierce, K. L., Choy, E. W., Lefkowitz, R. J., and Luttrell, L. M. (2002) beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *The Journal of biological chemistry* **277**, 9429-9436
49. Rajagopal, S., Rajagopal, K., and Lefkowitz, R. J. (2010) Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nature reviews. Drug discovery* **9**, 373-386
50. Szidonya, L., Supeki, K., Karip, E., Turu, G., Varnai, P., Clark, A. J., and Hunyady, L. (2007) AT1 receptor blocker-insensitive mutant AT1A angiotensin receptors reveal the presence of G protein-independent signaling in C9 cells. *Biochem Pharmacol* **73**, 1582-1592
51. Wei, H., Ahn, S., Shenoy, S. K., Karnik, S. S., Hunyady, L., Luttrell, L. M., and Lefkowitz, R. J. (2003) Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 10782-10787
52. Fisher, A., Heldman, E., Gurwitz, D., Haring, R., Barak, D., Meshulam, H., Marciano, D., Brandeis, R., Pittel, Z., Segal, M., and et al. (1993) Selective signaling via unique M1 muscarinic agonists. *Ann N Y Acad Sci* **695**, 300-303
53. Gurwitz, D., Haring, R., Heldman, E., Fraser, C. M., Manor, D., and Fisher, A. (1994) Discrete activation of transduction pathways associated with

- acetylcholine m1 receptor by several muscarinic ligands. *Eur J Pharmacol* **267**, 21-31
54. Kenakin, T. (2007) Collateral efficacy in drug discovery: taking advantage of the good (allosteric) nature of 7TM receptors. *Trends Pharmacol Sci* **28**, 407-415
 55. Bohn, L. M., Gainetdinov, R. R., Lin, F. T., Lefkowitz, R. J., and Caron, M. G. (2000) Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature* **408**, 720-723
 56. Conner, D. A., Mathier, M. A., Mortensen, R. M., Christe, M., Vatner, S. F., Seidman, C. E., and Seidman, J. G. (1997) beta-Arrestin1 knockout mice appear normal but demonstrate altered cardiac responses to beta-adrenergic stimulation. *Circ Res* **81**, 1021-1026
 57. Deshpande, D. A., Theriot, B. S., Penn, R. B., and Walker, J. K. (2008) Beta-arrestins specifically constrain beta2-adrenergic receptor signaling and function in airway smooth muscle. *FASEB J* **22**, 2134-2141
 58. Wang, W. C., Muhlbacher, K. A., Brunnett, A. C., and Liggett, S. B. (2009) Targeted transgenesis reveals discrete attenuator functions of GRK and PKA in airway beta2-adrenergic receptor physiologic signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 15007-15012
 59. Kim, I. M., Tilley, D. G., Chen, J., Salazar, N. C., Whalen, E. J., Violin, J. D., and Rockman, H. A. (2008) Beta-blockers alprenolol and carvedilol stimulate beta-arrestin-mediated EGFR transactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 14555-14560
 60. Noma, T., Lemaire, A., Naga Prasad, S. V., Barki-Harrington, L., Tilley, D. G., Chen, J., Le Corvoisier, P., Violin, J. D., Wei, H., Lefkowitz, R. J., and Rockman, H. A. (2007) Beta-arrestin-mediated beta1-adrenergic receptor transactivation of the EGFR confers cardioprotection. *The Journal of clinical investigation* **117**, 2445-2458
 61. Felker, G. M., Butler, J., Collins, S. P., Cotter, G., Davison, B. A., Ezekowitz, J. A., Filippatos, G., Levy, P. D., Metra, M., Ponikowski, P., Soergel, D. G., Teerlink, J. R., Violin, J. D., Voors, A. A., and Pang, P. S. (2015) Heart failure therapeutics on the basis of a biased ligand of the angiotensin-2 type 1 receptor. Rationale and design of the BLAST-AHF study (Biased Ligand of the Angiotensin Receptor Study in Acute Heart Failure). *JACC Heart Fail* **3**, 193-201
 62. Violin, J. D., DeWire, S. M., Yamashita, D., Rominger, D. H., Nguyen, L., Schiller, K., Whalen, E. J., Gowen, M., and Lark, M. W. (2010) Selectively engaging beta-arrestins at the angiotensin II type 1 receptor reduces blood pressure and increases cardiac performance. *J Pharmacol Exp Ther* **335**, 572-579
 63. Schoneberg, T., Schulz, A., Biebermann, H., Hermsdorf, T., Rompler, H., and Sangkuhl, K. (2004) Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases. *Pharmacology & therapeutics* **104**, 173-206
 64. D'Souza-Li, L., Canaff, L., Janicic, N., Cole, D. E., and Hendy, G. N. (2001) An acceptor splice site mutation in the calcium-sensing receptor (CASR) gene

- in familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Hum Mutat* **18**, 411-421
65. Radford, S. E., and Dobson, C. M. (1999) From computer simulations to human disease: emerging themes in protein folding. *Cell* **97**, 291-298
 66. Sanders, C. R., and Nagy, J. K. (2000) Misfolding of membrane proteins in health and disease: the lady or the tiger? *Curr Opin Struct Biol* **10**, 438-442
 67. Birnbaumer, M., Gilbert, S., and Rosenthal, W. (1994) An extracellular congenital nephrogenic diabetes insipidus mutation of the vasopressin receptor reduces cell surface expression, affinity for ligand, and coupling to the Gs/adenylyl cyclase system. *Molecular endocrinology* **8**, 886-894
 68. Sung, C. H., Schneider, B. G., Agarwal, N., Papermaster, D. S., and Nathans, J. (1991) Functional heterogeneity of mutant rhodopsins responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 8840-8844
 69. Biebermann, H., Gruters, A., Schoneberg, T., and Gudermann, T. (1997) Congenital hypothyroidism caused by mutations in the thyrotropin-receptor gene. *The New England journal of medicine* **336**, 1390-1391
 70. de Roux, N., Young, J., Brailly-Tabard, S., Misrahi, M., Milgrom, E., and Schaison, G. (1999) The same molecular defects of the gonadotropin-releasing hormone receptor determine a variable degree of hypogonadism in affected kindred. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **84**, 567-572
 71. Schoneberg, T., Schulz, A., Biebermann, H., Gruters, A., Grimm, T., Hubschmann, K., Filler, G., Gudermann, T., and Schultz, G. (1998) V2 vasopressin receptor dysfunction in nephrogenic diabetes insipidus caused by different molecular mechanisms. *Hum Mutat* **12**, 196-205
 72. Tarnow, P., Schoneberg, T., Krude, H., Gruters, A., and Biebermann, H. (2003) Mutationally induced disulfide bond formation within the third extracellular loop causes melanocortin 4 receptor inactivation in patients with obesity. *The Journal of biological chemistry* **278**, 48666-48673
 73. Fuchs, S., Amiel, J., Claudel, S., Lyonnet, S., Corvol, P., and Pinet, F. (2001) Functional characterization of three mutations of the endothelin B receptor gene in patients with Hirschsprung's disease: evidence for selective loss of Gi coupling. *Mol Med* **7**, 115-124
 74. Rosenthal, W., Antaramian, A., Gilbert, S., and Birnbaumer, M. (1993) Nephrogenic diabetes insipidus. A V2 vasopressin receptor unable to stimulate adenylyl cyclase. *The Journal of biological chemistry* **268**, 13030-13033
 75. Tao, Y. X. (2006) Inactivating mutations of G protein-coupled receptors and diseases: structure-function insights and therapeutic implications. *Pharmacology & therapeutics* **111**, 949-973
 76. Dryja, T. P., McGee, T. L., Reichel, E., Hahn, L. B., Cowley, G. S., Yandell, D. W., Sandberg, M. A., and Berson, E. L. (1990) A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* **343**, 364-366
 77. Wajnrajch, M. P., Gertner, J. M., Harbison, M. D., Chua, S. C., Jr., and Leibel, R. L. (1996) Nonsense mutation in the human growth hormone-releasing

- hormone receptor causes growth failure analogous to the little (lit) mouse. *Nat Genet* **12**, 88-90
78. Lubrano-Berthelie, C., Cavazos, M., Dubern, B., Shapiro, A., Stunff, C. L., Zhang, S., Picart, F., Govaerts, C., Froguel, P., Bougneres, P., Clement, K., and Vaisse, C. (2003) Molecular genetics of human obesity-associated MC4R mutations. *Ann N Y Acad Sci* **994**, 49-57
 79. Srinivasan, S., Lubrano-Berthelie, C., Govaerts, C., Picard, F., Santiago, P., Conklin, B. R., and Vaisse, C. (2004) Constitutive activity of the melanocortin-4 receptor is maintained by its N-terminal domain and plays a role in energy homeostasis in humans. *The Journal of clinical investigation* **114**, 1158-1164
 80. Kopp, P. (2001) The TSH receptor and its role in thyroid disease. *Cell Mol Life Sci* **58**, 1301-1322
 81. Aittomaki, K., Lucena, J. L., Pakarinen, P., Sistonen, P., Tapanainen, J., Gromoll, J., Kaskikari, R., Sankila, E. M., Lehtvaslaiho, H., Engel, A. R., Nieschlag, E., Huhtaniemi, I., and de la Chapelle, A. (1995) Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell* **82**, 959-968
 82. Latronico, A. C., Anasti, J., Arnhold, I. J., Rapaport, R., Mendonca, B. B., Bloise, W., Castro, M., Tsigos, C., and Chrousos, G. P. (1996) Brief report: testicular and ovarian resistance to luteinizing hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone-receptor gene. *The New England journal of medicine* **334**, 507-512
 83. Layman, L. C., Cohen, D. P., Jin, M., Xie, J., Li, Z., Reindollar, R. H., Bolbolan, S., Bick, D. P., Sherins, R. R., Duck, L. W., Musgrove, L. C., Sellers, J. C., and Neill, J. D. (1998) Mutations in gonadotropin-releasing hormone receptor gene cause hypogonadotropic hypogonadism. *Nat Genet* **18**, 14-15
 84. Shenker, A., Laue, L., Kosugi, S., Merendino, J. J., Jr., Minegishi, T., and Cutler, G. B., Jr. (1993) A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Nature* **365**, 652-654
 85. Gruters, A., Schoneberg, T., Biebermann, H., Krude, H., Krohn, H. P., Dralle, H., and Gudermann, T. (1998) Severe congenital hyperthyroidism caused by a germ-line neo mutation in the extracellular portion of the thyrotropin receptor. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **83**, 1431-1436
 86. Ward, B. K., Magno, A. L., Walsh, J. P., and Ratajczak, T. (2012) The role of the calcium-sensing receptor in human disease. *Clin Biochem* **45**, 943-953
 87. Knepper, M. A., Kwon, T. H., and Nielsen, S. (2015) Molecular physiology of water balance. *The New England journal of medicine* **372**, 1349-1358
 88. Stevens, L. A., Coresh, J., Greene, T., and Levey, A. S. (2006) Assessing kidney function--measured and estimated glomerular filtration rate. *The New England journal of medicine* **354**, 2473-2483
 89. Bockenhauer, D., and Bichet, D. G. (2015) Pathophysiology, diagnosis and management of nephrogenic diabetes insipidus. *Nat Rev Nephrol* **11**, 576-588

90. Obermuller, N., Kunchaparty, S., Ellison, D. H., and Bachmann, S. (1996) Expression of the Na-K-2Cl cotransporter by macula densa and thick ascending limb cells of rat and rabbit nephron. *The Journal of clinical investigation* **98**, 635-640
91. Klein, J. D., Murrell, B. P., Tucker, S., Kim, Y. H., and Sands, J. M. (2006) Urea transporter UT-A1 and aquaporin-2 proteins decrease in response to angiotensin II or norepinephrine-induced acute hypertension. *American journal of physiology. Renal physiology* **291**, F952-959
92. Ali, M. N. (1958) A comparison of some activities of arginine vasopressin and lysine vasopressin on kidney function in conscious dogs. *Br J Pharmacol Chemother* **13**, 131-137
93. Birnbaumer, M. (2000) Vasopressin receptors. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **11**, 406-410
94. Fenske, W. K., Christ-Crain, M., Horning, A., Simet, J., Szinnai, G., Fassnacht, M., Rutishauser, J., Bichet, D. G., Stork, S., and Allolio, B. (2014) A copeptin-based classification of the osmoregulatory defects in the syndrome of inappropriate antidiuresis. *J Am Soc Nephrol* **25**, 2376-2383
95. Prager-Khoutorsky, M., and Bourque, C. W. (2010) Osmosensation in vasopressin neurons: changing actin density to optimize function. *Trends Neurosci* **33**, 76-83
96. Goldsmith, S. R. (1988) Baroreceptor-mediated suppression of osmotically stimulated vasopressin in normal humans. *J Appl Physiol (1985)* **65**, 1226-1230
97. Leng, G., Brown, C. H., and Russell, J. A. (1999) Physiological pathways regulating the activity of magnocellular neurosecretory cells. *Progress in neurobiology* **57**, 625-655
98. Juul, K. V., Bichet, D. G., Nielsen, S., and Norgaard, J. P. (2014) The physiological and pathophysiological functions of renal and extrarenal vasopressin V2 receptors. *American journal of physiology. Renal physiology* **306**, F931-940
99. Thibonnier, M. (1992) Signal transduction of V1-vascular vasopressin receptors. *Regul Pept* **38**, 1-11
100. Holmes, C. L., Patel, B. M., Russell, J. A., and Walley, K. R. (2001) Physiology of vasopressin relevant to management of septic shock. *Chest* **120**, 989-1002
101. Oyama, H., Suzuki, Y., Satoh, S., Kajita, Y., Takayasu, M., Shibuya, M., and Sugita, K. (1993) Role of nitric oxide in the cerebral vasodilatory responses to vasopressin and oxytocin in dogs. *J Cereb Blood Flow Metab* **13**, 285-290
102. Okamura, T., Toda, M., Ayajiki, K., and Toda, N. (1997) Receptor subtypes involved in relaxation and contraction by arginine vasopressin in canine isolated short posterior ciliary arteries. *J Vasc Res* **34**, 464-472
103. Nakanishi, K., Mattson, D. L., Gross, V., Roman, R. J., and Cowley, A. W., Jr. (1995) Control of renal medullary blood flow by vasopressin V1 and V2 receptors. *Am J Physiol* **269**, R193-200
104. Izumi, Y., Hori, K., Nakayama, Y., Kimura, M., Hasuike, Y., Nanami, M., Kohda, Y., Otaki, Y., Kuragano, T., Obinata, M., Kawahara, K., Tanoue, A., Tomita, K., Nakanishi, T., and Nonoguchi, H. (2011) Aldosterone requires vasopressin

- V1a receptors on intercalated cells to mediate acid-base homeostasis. *J Am Soc Nephrol* **22**, 673-680
105. Antoni, F. A. (1984) Novel ligand specificity of pituitary vasopressin receptors in the rat. *Neuroendocrinology* **39**, 186-188
 106. Antoni, F. A. (1993) Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropin secretion comes of age. *Front Neuroendocrinol* **14**, 76-122
 107. Born, J., Pietrowsky, R., and Fehm, H. L. (1998) Neuropsychological effects of vasopressin in healthy humans. *Prog Brain Res* **119**, 619-643
 108. Sadeghi, H., and Birnbaumer, M. (1999) O-Glycosylation of the V2 vasopressin receptor. *Glycobiology* **9**, 731-737
 109. Sadeghi, H. M., Innamorati, G., Dagarag, M., and Birnbaumer, M. (1997) Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor. *Molecular pharmacology* **52**, 21-29
 110. Schulein, R., Zuhlke, K., Oksche, A., Hermosilla, R., Furkert, J., and 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 letters* **466**, 101-106
 111. Chabardes, D., Firsov, D., Aarab, L., Clabecq, A., Bellanger, A. C., Siaume-Perez, S., and Elalouf, J. M. (1996) Localization of mRNAs encoding Ca²⁺-inhibitable adenylyl cyclases along the renal tubule. Functional consequences for regulation of the cAMP content. *The Journal of biological chemistry* **271**, 19264-19271
 112. Champigneulle, A., Siga, E., Vassent, G., and Imbert-Teboul, M. (1993) V2-like vasopressin receptor mobilizes intracellular Ca²⁺ in rat medullary collecting tubules. *Am J Physiol* **265**, F35-45
 113. Ecelbarger, C. A., Chou, C. L., Lolait, S. J., Knepper, M. A., and DiGiovanni, S. R. (1996) Evidence for dual signaling pathways for V2 vasopressin receptor in rat inner medullary collecting duct. *Am J Physiol* **270**, F623-633
 114. Yip, K. P. (2006) Epac-mediated Ca(2+) mobilization and exocytosis in inner medullary collecting duct. *American journal of physiology. Renal physiology* **291**, F882-890
 115. Pisitkun, T., Jacob, V., Schleicher, S. M., Chou, C. L., Yu, M. J., and Knepper, M. A. (2008) Akt and ERK1/2 pathways are components of the vasopressin signaling network in rat native IMCD. *American journal of physiology. Renal physiology* **295**, F1030-1043
 116. Charest, P. G., Oligny-Longpre, G., Bonin, H., Azzi, M., and Bouvier, M. (2007) The V2 vasopressin receptor stimulates ERK1/2 activity independently of heterotrimeric G protein signalling. *Cell Signal* **19**, 32-41
 117. Oligny-Longpre, G., Corbani, M., Zhou, J., Hogue, M., Guillon, G., and Bouvier, M. (2012) Engagement of beta-arrestin by transactivated insulin-like growth factor receptor is needed for V2 vasopressin receptor-stimulated ERK1/2 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, E1028-1037
 118. Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S., and Caron, M. G. (1999) Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during

- clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *The Journal of biological chemistry* **274**, 32248-32257
119. Feinstein, T. N., Yui, N., Webber, M. J., Wehbi, V. L., Stevenson, H. P., King, J. D., Jr., Hallows, K. R., Brown, D., Bouley, R., and Vilardaga, J. P. (2013) Noncanonical control of vasopressin receptor type 2 signaling by retromer and arrestin. *The Journal of biological chemistry* **288**, 27849-27860
 120. Bouley, R., Sun, T. X., Chenard, M., McLaughlin, M., McKee, M., Lin, H. Y., Brown, D., and Ausiello, D. A. (2003) Functional role of the NPxxY motif in internalization of the type 2 vasopressin receptor in LLC-PK1 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**, C750-762
 121. Lutz, W., Sanders, M., Salisbury, J., and Kumar, R. (1990) Internalization of vasopressin analogs in kidney and smooth muscle cells: evidence for receptor-mediated endocytosis in cells with V2 or V1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 6507-6511
 122. Martin, N. P., Lefkowitz, R. J., and Shenoy, S. K. (2003) Regulation of V2 vasopressin receptor degradation by agonist-promoted ubiquitination. *The Journal of biological chemistry* **278**, 45954-45959
 123. Bouley, R., Lin, H. Y., Raychowdhury, M. K., Marshansky, V., Brown, D., and Ausiello, D. A. (2005) Downregulation of the vasopressin type 2 receptor after vasopressin-induced internalization: involvement of a lysosomal degradation pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**, C1390-1401
 124. Zalyapin, E. A., Bouley, R., Hasler, U., Vilardaga, J. P., Lin, H. Y., Brown, D., and Ausiello, D. A. (2008) Effects of the renal medullary pH and ionic environment on vasopressin binding and signaling. *Kidney Int* **74**, 1557-1567
 125. Raychowdhury, M. K., Ramos, A. J., Zhang, P., McLaughlin, M., Dai, X. Q., Chen, X. Z., Montalbetti, N., Del Rocio Cantero, M., Ausiello, D. A., and Cantiello, H. F. (2009) Vasopressin receptor-mediated functional signaling pathway in primary cilia of renal epithelial cells. *American journal of physiology. Renal physiology* **296**, F87-97
 126. Marion, V., Schlicht, D., Mockel, A., Caillard, S., Imhoff, O., Stoetzel, C., van Dijk, P., Brandt, C., Moulin, B., and Dollfus, H. (2011) Bardet-Biedl syndrome highlights the major role of the primary cilium in efficient water reabsorption. *Kidney Int* **79**, 1013-1025
 127. Nielsen, S., Marples, D., Frokiaer, J., Knepper, M., and Agre, P. (1996) The aquaporin family of water channels in kidney: an update on physiology and pathophysiology of aquaporin-2. *Kidney Int* **49**, 1718-1723
 128. Bichet, D. G., Oksche, A., and Rosenthal, W. (1997) Congenital nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* **8**, 1951-1958
 129. Knepper, M. A., and Nielsen, S. (1993) Kinetic model of water and urea permeability regulation by vasopressin in collecting duct. *Am J Physiol* **265**, F214-224
 130. Nielsen, S., and Knepper, M. A. (1993) Vasopressin activates collecting duct urea transporters and water channels by distinct physical processes. *Am J Physiol* **265**, F204-213

131. Kortenoeven, M. L., and Fenton, R. A. (2014) Renal aquaporins and water balance disorders. *Biochim Biophys Acta* **1840**, 1533-1549
132. Fushimi, K., Sasaki, S., and Marumo, F. (1997) Phosphorylation of serine 256 is required for cAMP-dependent regulatory exocytosis of the aquaporin-2 water channel. *The Journal of biological chemistry* **272**, 14800-14804
133. Tamma, G., Robben, J. H., Trimpert, C., Boone, M., and Deen, P. M. (2011) Regulation of AQP2 localization by S256 and S261 phosphorylation and ubiquitination. *Am J Physiol Cell Physiol* **300**, C636-646
134. Hoffert, J. D., Fenton, R. A., Moeller, H. B., Simons, B., Tchapyjnikov, D., McDill, B. W., Yu, M. J., Pisitkun, T., Chen, F., and Knepper, M. A. (2008) Vasopressin-stimulated increase in phosphorylation at Ser269 potentiates plasma membrane retention of aquaporin-2. *The Journal of biological chemistry* **283**, 24617-24627
135. Moeller, H. B., Praetorius, J., Rutzler, M. R., and Fenton, R. A. (2010) Phosphorylation of aquaporin-2 regulates its endocytosis and protein-protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 424-429
136. Hozawa, S., Holtzman, E. J., and Ausiello, D. A. (1996) cAMP motifs regulating transcription in the aquaporin 2 gene. *Am J Physiol* **270**, C1695-1702
137. Matsumura, Y., Uchida, S., Rai, T., Sasaki, S., and Marumo, F. (1997) Transcriptional regulation of aquaporin-2 water channel gene by cAMP. *J Am Soc Nephrol* **8**, 861-867
138. Kortenoeven, M. L., Trimpert, C., van den Brand, M., Li, Y., Wetzels, J. F., and Deen, P. M. (2012) In mpkCCD cells, long-term regulation of aquaporin-2 by vasopressin occurs independent of protein kinase A and CREB but may involve Epac. *American journal of physiology. Renal physiology* **302**, F1395-1401
139. Sands, J. M. (2003) Molecular mechanisms of urea transport. *J Membr Biol* **191**, 149-163
140. Knepper, M. A., Kim, G. H., Fernandez-Llama, P., and Ecelbarger, C. A. (1999) Regulation of thick ascending limb transport by vasopressin. *J Am Soc Nephrol* **10**, 628-634
141. Bankir, L., Fernandes, S., Bardoux, P., Bouby, N., and Bichet, D. G. (2005) Vasopressin-V2 receptor stimulation reduces sodium excretion in healthy humans. *J Am Soc Nephrol* **16**, 1920-1928
142. Kaufmann, J. E., Oksche, A., Wollheim, C. B., Gunther, G., Rosenthal, W., and Vischer, U. M. (2000) Vasopressin-induced von Willebrand factor secretion from endothelial cells involves V2 receptors and cAMP. *The Journal of clinical investigation* **106**, 107-116
143. Kozniowska, E., and Szczepanska-Sadowska, E. (1990) V2-like receptors mediate cerebral blood flow increase following vasopressin administration in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* **15**, 579-585
144. Hirasawa, A., Nakayama, Y., Ishiharada, N., Honda, K., Saito, R., Tsujimoto, G., Takano, Y., and Kamiya, H. (1994) Evidence for the existence of vasopressin V2 receptor mRNA in rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* **205**, 1702-1706

145. Fujiwara, T. M., and Bichet, D. G. (2005) Molecular biology of hereditary diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* **16**, 2836-2846
146. Ito, M., Jameson, J. L., and Ito, M. (1997) Molecular basis of autosomal dominant neurohypophyseal diabetes insipidus. Cellular toxicity caused by the accumulation of mutant vasopressin precursors within the endoplasmic reticulum. *The Journal of clinical investigation* **99**, 1897-1905
147. Ito, M., Yu, R. N., and Jameson, J. L. (1999) Mutant vasopressin precursors that cause autosomal dominant neurohypophyseal diabetes insipidus retain dimerization and impair the secretion of wild-type proteins. *The Journal of biological chemistry* **274**, 9029-9037
148. Rittig, S., Robertson, G. L., Siggaard, C., Kovacs, L., Gregersen, N., Nyborg, J., and Pedersen, E. B. (1996) Identification of 13 new mutations in the vasopressin-neurophysin II gene in 17 kindreds with familial autosomal dominant neurohypophyseal diabetes insipidus. *Am J Hum Genet* **58**, 107-117
149. Sawyer, W. H., Acosta, M., Balaspiri, L., Judd, J., and Manning, M. (1974) Structural changes in the arginine vasopressin molecule that enhance antidiuretic activity and specificity. *Endocrinology* **94**, 1106-1115
150. Manning, M., Misicka, A., Olma, A., Bankowski, K., Stoev, S., Chini, B., Durroux, T., Mouillac, B., Corbani, M., and Guillon, G. (2012) Oxytocin and vasopressin agonists and antagonists as research tools and potential therapeutics. *Journal of neuroendocrinology* **24**, 609-628
151. Vande Walle, J., Stockner, M., Raes, A., and Norgaard, J. P. (2007) Desmopressin 30 years in clinical use: a safety review. *Curr Drug Saf* **2**, 232-238
152. Bai, L., Fushimi, K., Sasaki, S., and Marumo, F. (1996) Structure of aquaporin-2 vasopressin water channel. *The Journal of biological chemistry* **271**, 5171-5176
153. Wesche, D., Deen, P. M., and Knoers, N. V. (2012) Congenital nephrogenic diabetes insipidus: the current state of affairs. *Pediatric nephrology* **27**, 2183-2204
154. Robben, J. H., Knoers, N. V., and Deen, P. M. (2006) Cell biological aspects of the vasopressin type-2 receptor and aquaporin 2 water channel in nephrogenic diabetes insipidus. *American journal of physiology. Renal physiology* **291**, F257-270
155. Tamarappoo, B. K., and Verkman, A. S. (1998) Defective aquaporin-2 trafficking in nephrogenic diabetes insipidus and correction by chemical chaperones. *The Journal of clinical investigation* **101**, 2257-2267
156. Kamsteeg, E. J., Wormhoudt, T. A., Rijss, J. P., van Os, C. H., and Deen, P. M. (1999) An impaired routing of wild-type aquaporin-2 after tetramerization with an aquaporin-2 mutant explains dominant nephrogenic diabetes insipidus. *EMBO J* **18**, 2394-2400
157. Nomura, Y., Onigata, K., Nagashima, T., Yutani, S., Mochizuki, H., Nagashima, K., and Morikawa, A. (1997) Detection of skewed X-inactivation in two female carriers of vasopressin type 2 receptor gene mutation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **82**, 3434-3437

158. Sasaki, S., Chiga, M., Kikuchi, E., Rai, T., and Uchida, S. (2013) Hereditary nephrogenic diabetes insipidus in Japanese patients: analysis of 78 families and report of 22 new mutations in AVPR2 and AQP2. *Clin Exp Nephrol* **17**, 338-344
159. Satoh, M., Ogikubo, S., and Yoshizawa-Ogasawara, A. (2008) Correlation between clinical phenotypes and X-inactivation patterns in six female carriers with heterozygote vasopressin type 2 receptor gene mutations. *Endocr J* **55**, 277-284
160. Spanakis, E., Milord, E., and Gragnoli, C. (2008) AVPR2 variants and mutations in nephrogenic diabetes insipidus: review and missense mutation significance. *Journal of cellular physiology* **217**, 605-617
161. Moeller, H. B., Rittig, S., and Fenton, R. A. (2013) Nephrogenic diabetes insipidus: essential insights into the molecular background and potential therapies for treatment. *Endocrine reviews* **34**, 278-301
162. Bichet, D. G., Birnbaumer, M., Lonergan, M., Arthus, M. F., Rosenthal, W., Goodyer, P., Nivet, H., Benoit, S., Giampietro, P., Simonetti, S., and et al. (1994) Nature and recurrence of AVPR2 mutations in X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Hum Genet* **55**, 278-286
163. Morello, J. P., and Bichet, D. G. (2001) Nephrogenic diabetes insipidus. *Annu Rev Physiol* **63**, 607-630
164. Arthus, M. F., Lonergan, M., Crumley, M. J., Naumova, A. K., Morin, D., De Marco, L. A., Kaplan, B. S., Robertson, G. L., Sasaki, S., Morgan, K., Bichet, D. G., and Fujiwara, T. M. (2000) Report of 33 novel AVPR2 mutations and analysis of 117 families with X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* **11**, 1044-1054
165. Ala, Y., Morin, D., Mouillac, B., Sabatier, N., Vargas, R., Cotte, N., Dechaux, M., Antignac, C., Arthus, M. F., Lonergan, M., Turner, M. S., Balestre, M. N., Alonso, G., Hibert, M., Barberis, C., Hendy, G. N., Bichet, D. G., and Jard, S. (1998) Functional studies of twelve mutant V2 vasopressin receptors related to nephrogenic diabetes insipidus: molecular basis of a mild clinical phenotype. *J Am Soc Nephrol* **9**, 1861-1872
166. Tsukaguchi, H., Matsubara, H., Taketani, S., Mori, Y., Seido, T., and Inada, M. (1995) Binding-, intracellular transport-, and biosynthesis-defective mutants of vasopressin type 2 receptor in patients with X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *The Journal of clinical investigation* **96**, 2043-2050
167. Ellgaard, L., and Helenius, A. (2001) ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 431-437
168. Hermosilla, R., Oueslati, M., Donalies, U., Schonenberger, E., Krause, E., Oksche, A., Rosenthal, W., and Schulein, R. (2004) Disease-causing V(2) vasopressin receptors are retained in different compartments of the early secretory pathway. *Traffic* **5**, 993-1005
169. Barak, L. S., Oakley, R. H., Laporte, S. A., and Caron, M. G. (2001) Constitutive arrestin-mediated desensitization of a human vasopressin receptor mutant associated with nephrogenic diabetes insipidus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 93-98

170. Robben, J. H., Knoers, N. V., and Deen, P. M. (2005) Characterization of vasopressin V2 receptor mutants in nephrogenic diabetes insipidus in a polarized cell model. *American journal of physiology. Renal physiology* **289**, F265-272
171. Sadeghi, H., Robertson, G. L., Bichet, D. G., Innamorati, G., and Birnbaumer, M. (1997) Biochemical basis of partial nephrogenic diabetes insipidus phenotypes. *Molecular endocrinology* **11**, 1806-1813
172. Daniel G Bichet, M. (2015) Clinical manifestations and causes of nephrogenic diabetes insipidus. *UpToDate*
173. van Lieburg, A. F., Knoers, N. V., and Monnens, L. A. (1999) Clinical presentation and follow-up of 30 patients with congenital nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* **10**, 1958-1964
174. Hoekstra, J. A., van Lieburg, A. F., Monnens, L. A., Hulstijn-Dirkmaat, G. M., and Knoers, V. V. (1996) Cognitive and psychosocial functioning of patients with congenital nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Med Genet* **61**, 81-88
175. Daniel G Bichet, M. (2015) Diagnosis of polyuria and diabetes insipidus. *UpToDate*, 2381
176. Moses, A. M., and Clayton, B. (1993) Impairment of osmotically stimulated AVP release in patients with primary polydipsia. *Am J Physiol* **265**, R1247-1252
177. Bockenbauer, D., and Bichet, D. G. (2014) Urinary concentration: different ways to open and close the tap. *Pediatric nephrology* **29**, 1297-1303
178. Kennedy, G. C., and Crawford, J. D. (1959) Treatment of diabetes insipidus with hydrochlorothiazide. *Lancet* **1**, 866-867
179. Sinke, A. P., Kortenoeven, M. L., de Groot, T., Baumgarten, R., Devuyst, O., Wetzels, J. F., Loffing, J., and Deen, P. M. (2014) Hydrochlorothiazide attenuates lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus independently of the sodium-chloride cotransporter. *American journal of physiology. Renal physiology* **306**, F525-533
180. Kramer, H. J., Glanzer, K., and Dusing, R. (1981) Role of prostaglandins in the regulation of renal water excretion. *Kidney Int* **19**, 851-859
181. Libber, S., Harrison, H., and Spector, D. (1986) Treatment of nephrogenic diabetes insipidus with prostaglandin synthesis inhibitors. *J Pediatr* **108**, 305-311
182. Morello, J. P., Salahpour, A., Laperriere, A., Bernier, V., Arthus, M. F., Lonergan, M., Petaja-Repo, U., Angers, S., Morin, D., Bichet, D. G., and Bouvier, M. (2000) Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *The Journal of clinical investigation* **105**, 887-895
183. Ward, N. A., Hirst, S., Williams, J., and Findlay, J. B. (2012) Pharmacological chaperones increase the cell-surface expression of intracellularly retained mutants of the melanocortin 4 receptor with unique rescuing efficacy profiles. *Biochem Soc Trans* **40**, 717-720
184. Robben, J. H., Sze, M., Knoers, N. V., and Deen, P. M. (2007) Functional rescue of vasopressin V2 receptor mutants in MDCK cells by pharmacochaperones: relevance to therapy of nephrogenic diabetes insipidus. *American journal of physiology. Renal physiology* **292**, F253-260

185. Wuller, S., Wiesner, B., Loffler, A., Furkert, J., Krause, G., Hermosilla, R., Schaefer, M., Schulein, R., Rosenthal, W., and Oksche, A. (2004) Pharmacochaperones post-translationally enhance cell surface expression by increasing conformational stability of wild-type and mutant vasopressin V2 receptors. *The Journal of biological chemistry* **279**, 47254-47263
186. Bernier, V., Lagace, M., Lonergan, M., Arthus, M. F., Bichet, D. G., and Bouvier, M. (2004) Functional rescue of the constitutively internalized V2 vasopressin receptor mutant R137H by the pharmacological chaperone action of SR49059. *Molecular endocrinology* **18**, 2074-2084
187. Ranadive, S. A., Ersoy, B., Favre, H., Cheung, C. C., Rosenthal, S. M., Miller, W. L., and Vaisse, C. (2009) Identification, characterization and rescue of a novel vasopressin-2 receptor mutation causing nephrogenic diabetes insipidus. *Clinical endocrinology* **71**, 388-393
188. Bernier, V., Morello, J. P., Zarruk, A., Debrand, N., Salahpour, A., Lonergan, M., Arthus, M. F., Laperriere, A., Brouard, R., Bouvier, M., and Bichet, D. G. (2006) Pharmacologic chaperones as a potential treatment for X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* **17**, 232-243
189. Robben, J. H., Kortenoeven, M. L., Sze, M., Yae, C., Milligan, G., Oorschot, V. M., Klumperman, J., Knoers, N. V., and Deen, P. M. (2009) Intracellular activation of vasopressin V2 receptor mutants in nephrogenic diabetes insipidus by nonpeptide agonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 12195-12200
190. Li, J. H., Chou, C. L., Li, B., Gavrilova, O., Eisner, C., Schnermann, J., Anderson, S. A., Deng, C. X., Knepper, M. A., and Wess, J. (2009) A selective EP4 PGE2 receptor agonist alleviates disease in a new mouse model of X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *The Journal of clinical investigation* **119**, 3115-3126
191. Olesen, E. T., Rutzler, M. R., Moeller, H. B., Praetorius, H. A., and Fenton, R. A. (2011) Vasopressin-independent targeting of aquaporin-2 by selective E-prostanoid receptor agonists alleviates nephrogenic diabetes insipidus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 12949-12954
192. Procino, G., Milano, S., Carosino, M., Barbieri, C., Nicoletti, M. C., Li, J. H., Wess, J., and Svelto, M. (2014) Combination of secretin and fluvastatin ameliorates the polyuria associated with X-linked nephrogenic diabetes insipidus in mice. *Kidney Int* **86**, 127-138
193. Schwartz, W. B., Bennett, W., Curelop, S., and Bartter, F. C. (1957) A syndrome of renal sodium loss and hyponatremia probably resulting from inappropriate secretion of antidiuretic hormone. *The American journal of medicine* **23**, 529-542
194. Johnson, B. E., Chute, J. P., Rushin, J., Williams, J., Le, P. T., Venzon, D., and Richardson, G. E. (1997) A prospective study of patients with lung cancer and hyponatremia of malignancy. *Am J Respir Crit Care Med* **156**, 1669-1678
195. Richard H Sterns, M. (2014) Pathophysiology and etiology of the syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion (SIADH). *UpToDate*, 2384
196. Miyazaki, T., Yamamura, Y., Onogawa, T., Nakamura, S., Kinoshita, S., Nakayama, S., Fujiki, H., and Mori, T. (2005) Therapeutic effects of

- tolvaptan, a potent, selective nonpeptide vasopressin V2 receptor antagonist, in rats with acute and chronic severe hyponatremia. *Endocrinology* **146**, 3037-3043
197. Verbalis, J. G. (2001) Escape from antidiuresis: a good story. *Kidney Int* **60**, 1608-1610
 198. Murase, T., Ecelbarger, C. A., Baker, E. A., Tian, Y., Knepper, M. A., and Verbalis, J. G. (1999) Kidney aquaporin-2 expression during escape from antidiuresis is not related to plasma or tissue osmolality. *J Am Soc Nephrol* **10**, 2067-2075
 199. Saito, T., Higashiyama, M., Nagasaka, S., Sasaki, S., Saito, T., and Ishikawa, S. E. (2001) Role of aquaporin-2 gene expression in hyponatremic rats with chronic vasopressin-induced antidiuresis. *Kidney Int* **60**, 1266-1276
 200. Hoorn, E. J., Hoffert, J. D., and Knepper, M. A. (2005) Combined proteomics and pathways analysis of collecting duct reveals a protein regulatory network activated in vasopressin escape. *J Am Soc Nephrol* **16**, 2852-2863
 201. Stewart, G. S., Thistlethwaite, A., Lees, H., Cooper, G. J., and Smith, C. (2009) Vasopressin regulation of the renal UT-A3 urea transporter. *American journal of physiology. Renal physiology* **296**, F642-648
 202. Feldman, B. J., Rosenthal, S. M., Vargas, G. A., Fenwick, R. G., Huang, E. A., Matsuda-Abedini, M., Lustig, R. H., Mathias, R. S., Portale, A. A., Miller, W. L., and Gitelman, S. E. (2005) Nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis. *The New England journal of medicine* **352**, 1884-1890
 203. Robertson, G. L. (2006) Regulation of arginine vasopressin in the syndrome of inappropriate antidiuresis. *The American journal of medicine* **119**, S36-42
 204. Rochdi, M. D., Vargas, G. A., Carpentier, E., Oligny-Longpre, G., Chen, S., Kovoor, A., Gitelman, S. E., Rosenthal, S. M., von Zastrow, M., and Bouvier, M. (2010) Functional characterization of vasopressin type 2 receptor substitutions (R137H/C/L) leading to nephrogenic diabetes insipidus and nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis: implications for treatments. *Molecular pharmacology* **77**, 836-845
 205. Carpentier, E., Greenbaum, L. A., Rochdi, D., Abrol, R., Goddard, W. A., 3rd, Bichet, D. G., and Bouvier, M. (2012) Identification and characterization of an activating F229V substitution in the V2 vasopressin receptor in an infant with NSIAD. *J Am Soc Nephrol* **23**, 1635-1640
 206. Schulz, A., Sangkuhl, K., Lennert, T., Wigger, M., Price, D. A., Nuuja, A., Gruters, A., Schultz, G., and Schoneberg, T. (2002) Aminoglycoside pretreatment partially restores the function of truncated V(2) vasopressin receptors found in patients with nephrogenic diabetes insipidus. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **87**, 5247-5257
 207. Armstrong, S. P., Seeber, R. M., Ayoub, M. A., Feldman, B. J., and Pfleger, K. D. (2013) Characterization of Three Vasopressin Receptor 2 Variants: An Apparent Polymorphism (V266A) and Two Loss-of-Function Mutations (R181C and M311V). *PloS one* **8**, e65885
 208. Decaux, G., Vandergheynst, F., Bouko, Y., Parma, J., Vassart, G., and Vilain, C. (2007) Nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis in adults: high phenotypic variability in men and women from a large pedigree. *J Am Soc Nephrol* **18**, 606-612

209. Klarenbeek, J. B., Goedhart, J., Hink, M. A., Gadella, T. W., and Jalink, K. (2011) A mTurquoise-based cAMP sensor for both FLIM and ratiometric read-out has improved dynamic range. *PLoS one* **6**, e19170
210. Turu, G., Szidonya, L., Gaborik, Z., Buday, L., Spat, A., Clark, A. J., and Hunyady, L. (2006) Differential beta-arrestin binding of AT1 and AT2 angiotensin receptors. *FEBS letters* **580**, 41-45
211. Zacharias, D. A., Violin, J. D., Newton, A. C., and Tsien, R. Y. (2002) Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* **296**, 913-916
212. Balla, A., Toth, D. J., Soltesz-Katona, E., Szakadati, G., Erdelyi, L. S., Varnai, P., and Hunyady, L. (2012) Mapping of the localization of type 1 angiotensin receptor in membrane microdomains using bioluminescence resonance energy transfer-based sensors. *The Journal of biological chemistry* **287**, 9090-9099
213. Szaszak, M., Gaborik, Z., Turu, G., McPherson, P. S., Clark, A. J., Catt, K. J., and Hunyady, L. (2002) Role of the proline-rich domain of dynamin-2 and its interactions with Src homology 3 domains during endocytosis of the AT1 angiotensin receptor. *The Journal of biological chemistry* **277**, 21650-21656
214. Szekeres, M., Nadasy, G. L., Turu, G., Soltesz-Katona, E., Toth, Z. E., Balla, A., Catt, K. J., and Hunyady, L. (2012) Angiotensin II induces vascular endocannabinoid release, which attenuates its vasoconstrictor effect via CB1 cannabinoid receptors. *The Journal of biological chemistry* **287**, 31540-31550
215. Woo, J., and von Arnim, A. G. (2008) Mutational optimization of the coelenterazine-dependent luciferase from Renilla. *Plant methods* **4**, 23
216. Lohse, M. J., Nuber, S., and Hoffmann, C. (2012) Fluorescence/bioluminescence resonance energy transfer techniques to study G-protein-coupled receptor activation and signaling. *Pharmacol Rev* **64**, 299-336
217. Toth, D. J., Toth, J. T., Gulyas, G., Balla, A., Balla, T., Hunyady, L., and Varnai, P. (2012) Acute depletion of plasma membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate impairs specific steps in endocytosis of the G-protein-coupled receptor. *Journal of cell science* **125**, 2185-2197
218. Manning, M., Lowbridge, J., Stier, C. T., Jr., Haldar, J., and Sawyer, W. H. (1977) [1-deaminopenicillamine,4-valine]-8-D-arginine-vasopressin, a highly potent inhibitor of the vasopressor response to arginine-vasopressin. *Journal of medicinal chemistry* **20**, 1228-1230
219. Hase, S., Sakakibara, S., Wahrenburg, M., Kirchberger, M., Schwartz, I. L., and Walter, R. (1972) 1,6-Aminosuberic acid analogs of lysine- and arginine-vasopressin and -vasotocin. Synthesis and biological properties. *Journal of the American Chemical Society* **94**, 3590-3600
220. Kocan, M., See, H. B., Sampaio, N. G., Eidne, K. A., Feldman, B. J., and Pflieger, K. D. (2009) Agonist-independent interactions between beta-arrestins and mutant vasopressin type II receptors associated with nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis. *Molecular endocrinology* **23**, 559-571

221. Ehnis, T., Hocher, B., Abou-Rebyeh, H., Oelkers, W., and Hensen, J. (1993) Expression of vasopressin receptors (V2-subtype) on LLC-PK1 cells during cell culture. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* **31**, 273-276
222. Koshimizu, T. A., Nakamura, K., Egashira, N., Hiroyama, M., Nonoguchi, H., and Tanoue, A. (2012) Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. *Physiological reviews* **92**, 1813-1864
223. Russell, J. A., Walley, K. R., Singer, J., Gordon, A. C., Hebert, P. C., Cooper, D. J., Holmes, C. L., Mehta, S., Granton, J. T., Storms, M. M., Cook, D. J., Presneill, J. J., Ayers, D., and Investigators, V. (2008) Vasopressin versus norepinephrine infusion in patients with septic shock. *The New England journal of medicine* **358**, 877-887
224. Czako, L., Laszlo, F., and Manning, M. (1980) [Treatment of diabetes insipidus with synthetic vasopressin derivatives (effect of 1-deamino-8-D-arginine vasopressin and 1-deamino-valine-8-D-arginine vasopressin)]. *Orvosi hetilap* **121**, 773-778
225. Dale, L. B., Bhattacharya, M., Seachrist, J. L., Anborgh, P. H., and Ferguson, S. S. (2001) Agonist-stimulated and tonic internalization of metabotropic glutamate receptor 1a in human embryonic kidney 293 cells: agonist-stimulated endocytosis is beta-arrestin1 isoform-specific. *Molecular pharmacology* **60**, 1243-1253
226. Holliday, N. D., Lam, C. W., Tough, I. R., and Cox, H. M. (2005) Role of the C terminus in neuropeptide Y Y1 receptor desensitization and internalization. *Molecular pharmacology* **67**, 655-664
227. Parent, J. L., Labrecque, P., Driss Rochdi, M., and Benovic, J. L. (2001) Role of the differentially spliced carboxyl terminus in thromboxane A2 receptor trafficking: identification of a distinct motif for tonic internalization. *The Journal of biological chemistry* **276**, 7079-7085
228. Gyombolai, P., Boros, E., Hunyady, L., and Turu, G. (2013) Differential beta-arrestin2 requirements for constitutive and agonist-induced internalization of the CB1 cannabinoid receptor. *Molecular and cellular endocrinology* **372**, 116-127
229. Bhatnagar, A., Willins, D. L., Gray, J. A., Woods, J., Benovic, J. L., and Roth, B. L. (2001) The dynamin-dependent, arrestin-independent internalization of 5-hydroxytryptamine 2A (5-HT2A) serotonin receptors reveals differential sorting of arrestins and 5-HT2A receptors during endocytosis. *The Journal of biological chemistry* **276**, 8269-8277
230. Okamoto, Y., Ninomiya, H., Miwa, S., and Masaki, T. (2000) Cholesterol oxidation switches the internalization pathway of endothelin receptor type A from caveolae to clathrin-coated pits in Chinese hamster ovary cells. *The Journal of biological chemistry* **275**, 6439-6446
231. Smyth, E. M., Austin, S. C., Reilly, M. P., and FitzGerald, G. A. (2000) Internalization and sequestration of the human prostacyclin receptor. *The Journal of biological chemistry* **275**, 32037-32045

11. Saját közlemények jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Erdélyi LS, Mann WA, Morris-Rosendahl DJ, Groß U, Nagel M, Várnai P, Balla A, Hunyady L. Mutation in the V2 vasopressin receptor gene, AVPR2, causes nephrogenic syndrome of inappropriate diuresis KIDNEY INTERNATIONAL Article in Press: doi: 10.1038/ki.2015.181. (2015) **IF: 8,563** (*megosztott elsőszerzős közlemény*)

Erdélyi LS, Balla A, Patocs A, Toth M, Varnai P, Hunyady L. Altered agonist sensitivity of a mutant V2 receptor suggests a novel therapeutic strategy for nephrogenic diabetes insipidus. MOLECULAR ENDOCRINOLOGY 28:(5) pp. 634-643. (2014) **IF: 4,022**

Az értekezés témájához kapcsolódó egyéb közlemények

Szakadati G, Toth AD, Olah I, **Erdélyi LS**, Balla T, Varnai P, Hunyady L, Balla A. Investigation of the fate of type I angiotensin receptor after biased activation MOLECULAR PHARMACOLOGY 87:(6) pp. 972-981. (2015) **IF: 4,128**

Szalai B, Hoffmann P, Prokop S, **Erdélyi LS**, Várnai P, Hunyady L. Improved methodical approach for quantitative BRET analysis of G protein coupled receptor dimerization PLOS ONE 9:(10) Paper e109503. (2014) **IF: 3,234**

Balla A, Toth D, Soltesz-Katona E, Szakadati G, **Erdélyi LS**, Varnai P, Hunyady L. Mapping of the localization of type I angiotensin receptor in membrane microdomains using bioluminescence resonance energy transfer-based sensors. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 287:(12) pp. 9090-9099. (2012) **IF: 4,651**

Balla A, **Erdélyi LS**, Soltesz-Katona E, Balla T, Varnai P, Hunyady L. Demonstration of angiotensin II-induced Ras activation in the trans-Golgi network and the endoplasmic reticulum using BRET-based biosensors. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 286:(7) pp. 5319-5327. (2011) **IF: 4,773**

12. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Hunyady Lászlónak, aki lenyűgöző élettan előadásaival a tárgy iránti érdeklődésemet felkeltette, előbb tudományos diákkörösként, majd doktorandusz hallgatóként laborjába fogadott. A munkám során törekvéseimet mindig támogatta, ugyanakkor előrelátó tervezéssel segítette a kutatási téma fejlődését. Labor- és intézetvezető tevékenysége az Élettani Intézet kiváló légkörét biztosította. Hálás köszönettel tartozom Dr. Balla Andrásnak, aki a kutatás során használt technikákat, gondolkodásmódot, kísérlet tervezés, értékelés lépéseit tanította TDK-s koromtól kezdve és köszönöm a barátságát. Köszönöm Prof. Várnai Péternek, hogy molekuláris biológiai tudásom csiszolta és kérdéseimmel bármikor fordulhattam hozzá. Köszönettel tartozom Prof. Ligeti Erzsébetnek, hogy programvezetőként támogatta a dolgozat létrejöttét. Köszönöm a laborban dolgozó kollégáim és barátaim évek során nyújtott segítségét. Dr. Szalai Bence statisztikai kérdésekben támogatott, Dr. Tóth Dániel a napi eszmecsere-kkel segített (nem csak szakmailag) fejlődni. Dr. Tóth József esszenciális segítségét a dolgozat formázásánál külön köszönöm. Dr. Gyombolai Pál, Dr. Tóth András, Dr. Turu Gábor és Dr. Gulyás Gergő a rengeteg szakmai segítségeken túl egy igazán jó munkahellyé tették a labort. Köszönöm a segítségét azoknak, akiknek munkája nélkül nem készülhettek volna el kísérletek: kiemelném Oláh Ilona tevékenységét, de sokat köszönhetek Rácz Juditnak, Schulcz Mártonnénak, Halász Eszternek és Szabolcsi Katának is. TDK hallgatóimnak, Dr. Kétszeri Máténak és Sziráki Andrásnak köszönöm, hogy kérdéseikkel és szorgalmas munkájukkal segítettek a kísérleteket. Az Élettani Intézet minden munkatársának köszönöm, hogy kérdéseimmel bármikor fordulhattam hozzájuk.

Köszönöm családom és kiemelten édesapám önzetlen segítségét. Hálásan köszönöm feleségem támogatását és türelmét, amely a munkám esszenciális hátterét adta.