

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Rezeptoren des schilddrüsenstimulierenden Hormons (TSHR), des Lutropins/Choriogonadotrophins (LHCGR) und des Follitropins (FSHR) sind homologe Mitglieder der Rhodopsin-ähnlichen Rezeptorfamilie innerhalb der Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs). Die Hormone sind Glykoproteine (GPHs), und demzufolge werden ihre Rezeptoren als Glykoprotein-Hormon Rezeptoren bezeichnet (GPHRen). Das schilddrüsenstimulierende Hormon und dessen Rezeptor sind Schlüsselproteine in der Kontrolle der Schilddrüsenaktivität. Fehlfunktionen des TSHR, hervorgerufen durch Mutationen oder autoimmune Reaktionen, sind Auslöser für Schilddrüsenunter- oder Überfunktion.

Die Aufklärung des Aktivierungsmechanismus des TSH-Rezeptors durch Untersuchungen von Sequenz-Struktur-Funktionsbeziehungen, ist für das Verständnis von molekularen Ursachen häufig auftretender pathogener Fehlfunktionen von elementarer Bedeutung. Insbesondere sind hierbei die Identifizierung und Charakterisierung von signalsensitiven Aminosäuren oder Proteinabschnitten im Bezug zu Aktivierung wie auch Inaktivierung essentiell. Der generelle Nutzen soll letztendlich darin liegen, neue therapeutische Perspektiven für die pharmakologische Intervention von Schilddrüsenerkrankungen erstmals direkt am TSH-Rezeptor, d.h., direkt an der molekularen Ursache zu eröffnen.

Bisher waren nur Fragmente zum Aktivierungsmechanismus des TSHR bekannt. Das Ziel dieser Studien war es daher auch, konzeptionelle Fortschritte für ein tieferes molekulares Verständnis zu entwickeln, wie ein Signal nach der extrazellulären Bindung des Hormons von der Ektodomäne auf die Transmembrandomäne übertragen wird, um den Übergang zwischen basaler und aktiver Konformation des Rezeptors zu induzieren. Die spezifischen Ziele hierbei waren: i.) Identifizierung und funktionelle/strukturelle Beschreibung von signalsensitiven Determinanten, welche direkt involviert sind in die Modifizierung verschiedener Rezeptorkonformationen, ii.) die Beschreibung von Lokalisation und Bindungsmodi kleiner Moleküle im TSHR und LHCGR, iii.) die Generierung einer Datenbank für die Sequenz-Struktur-Funktionsanalyse an den GPHRen. Dafür wurden durch einen iterativen Zyklus von homologer Strukturmodellierung (Hypothese) und ortsgerichteter Mutagenese (experimentelle Überprüfung) die strukturellen und physiologischen Aspekte miteinander verbunden.

In dieser Arbeit werden neue strukturelle Details und daraus resultierende wichtige Aspekte der generellen Architektur für die Leucin-reiche repetitive Hormonbindungsdomäne (LRRD) vorgestellt. Unter Verwendung von Homologiemodellierung wurden zwei zusätzliche repetitive Struktureinheiten zu den bisher neun angenommenen vorgeschlagen, sowie eine N- und C-terminale Begrenzung zur Faltungsstabilisierung durch Cystein-reiche Regionen. Sowohl die Vorschläge zu detaillierten Strukturmerkmalen als auch zur generellen Faltung der LRRD wurden im Nachhinein durch eine veröffentlichte Kristallstruktur der LRRD des FSH-Rezeptor bestätigt.

Weiterhin wurde ein Teil-Modell der extrazellulären ‚Hinge-Region‘ erarbeitet, welche die LRRD mit der Transmembrandomäne verbindet. Dieses Modell führte zur Identifizierung eines neuen, signalrelevanten Epitops am TSH-Rezeptor. Hierbei wurde die Hypothese entwickelt, dass die N- und C- terminalen Cystein-reichen Komponenten (Cystein-Box 2 und 3) der ‚Hinge-Region‘ in engster räumlicher Nähe zueinander lokalisiert sind und eine funktionale Schnittstelle zwischen extrazellulärer und transmembranaler Domäne darstellen. Durch daraus resultierende Mutagenesestudien konnte gezeigt werden, dass diese strukturellen Determinanten tatsächlich für die primären bzw. sekundären Aktivierungsschritte des TSHR von wesentlicher Bedeutung sind. Punktmutationen führten einerseits zu 5 neuen Aminosäurepositionen mit konstitutiver Rezeptoraktivierung (Cystein-Box 2: K291A; Cystein-Box 3: D403A, E404K, N406A, P407D). Andererseits wurden 3 neue inaktivierende Mutationen charakterisiert (P400A, P407A, E409A), welche Hinweise auf intramolekulare Komponenten darstellen, die in die Formation einer aktiven Rezeptorkonformation involviert sind. Diese signalrelevanten Aminosäuren sind sehr wahrscheinlich Bestandteile eines internen Signaltransmitters, welcher sowohl für die Stabilisierung der basalen als auch für die (partial) aktivierte Konformation und damit potentiell für die Signalweiterleitung zwischen der Ektodomäne und der Transmembrandomäne des TSHRs eine wichtige Rolle spielt.

Ein weiterer Fokus dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung der extrazellulären Loops (ECLs). Zahlreiche Mutationen in den extrazellulären Loops 2 (K565A) und 3 (P652A-V656A) führten zur Inaktivierung des TSHR. Diese extrazellulär lokalisierten Aminosäuren sind als wichtig für den Signalisierungsprozeß und die G-Proteinaktivierung durch den Rezeptor anzusehen. Außerdem ist die Identifizierung eines direkten Kontaktes zwischen hydrophoben Aminosäuren des extrazellulären Loop 2 und der Transmembranhelix 6 (TMH6) ein weiteres Hauptergebnis der vorliegenden Arbeit. Im Einzelnen wurden die Isoleucine 568 des ECL2 und 640 der TMH6 als komplementäre Gegenspieler identifiziert, die direkt

miteinander interagieren und eine Schlüsselstellung im Signalisierungsprozess innehaben. Kleinste Seitenkettenveränderungen an beiden Positionen führen entweder zu einer Absenkung oder zur Anhebung der Signalisierungsaktivität des TSHR. Dies läßt sehr wahrscheinlich auf eine spezifische konformationelle Verschiebung der Komponenten zueinander schließen. Dieser identifizierte Kontakt stellt ebenfalls eine funktionale intramolekulare Schnittstelle im TSHR dar und ist in die Steuerung verschiedener Konformationen des TSHR involviert. Dieses Resultat bestätigt auch, dass im TSHR die Translokation der TMH6 eine zentrale Rolle für verschiedene Aktivitätszustände spielt.

Als weiterer Punkt dieser Arbeit wurde die Interaktion kleiner Liganden am TSHR und LHCGR untersucht. Basierend auf den molekularen Strukturmodellen sind Dockingstudien für kleine aktivierende Substanzen an diesen Rezeptoren durchgeführt worden. Diese beschreiben erstmals detailliert allosterische Bindungsmodi kleiner Moleküle in TSHR und LHCGR. Die vorgeschlagene Lokalisierung und postulierte Interaktionen im transmembranalen Raum zwischen Rezeptor und Ligand konnten experimentell verifiziert werden. Diese Informationen bilden eine rationale Basis für die Weiterentwicklung von aktivierenden und inaktivierenden synthetischen Liganden.

Parallel zu diesen Studien wurde ein Internet-basiertes Informationssystem geschaffen (www.fmp-berlin.de/ssfa). Am Rezeptor-Wildtyp kalibrierte Funktionsdaten von 900 publizierten Mutationsphenotypen der GPHRen sind hier unter anderem mit räumlichen Strukturdaten verknüpft worden und ermöglichen damit semiquantitative Sequenz-Struktur-Funktionsanalysen. Komplementär zu bekannten Mutationsdatenbanken sind differenzierbare Suchstrategien für die Aufdeckung von Struktur-Funktionszusammenhängen implementiert. Das erlaubt eine gezielte Extraktion von funktional wichtigen Rezeptorkomponenten, wie z.B. Determinanten selektiver G-Proteinkopplung oder die bereits erwähnten Schnittstellen der Signalübertragung.

Zusammengefasst, die hier vorgestellten Arbeiten geben einen erweiterten detaillierten Einblick in die Signalisierungsmechanismen des TSH-Rezeptors durch die Identifizierung und Beschreibung von Struktur-Funktionsbeziehungen involvierter molekularer Determinanten.