

1. Die Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und ihre Funktion in der Übertragung endokriner Signale

Die Vermittlung endokriner Signale, die an sehr unterschiedlichen Zielzellen (wie im Falle von Schilddrüsenhormonen) oder nur an einzelnen Zielorganen (wie zum Beispiel das Schilddrüsen-stimulierende Hormon TSH) ihre Wirkung entfalten, wird durch die passive Aufnahme dieser Hormone in die Zellen initialisiert oder durch eine aktive Aufnahme durch Kanäle oder Rezeptoren. Da jedoch eine Vielzahl von Hormonen nicht in die Zelle aufgenommen werden können, entfalten diese Hormone ihre Wirkung an membranständigen Rezeptoren. Es gibt verschiedene membranständige Rezeptoren, die größte Gruppe stellt die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) dar, sie ist die größte Protein-Familie überhaupt.

Die Aufgabe dieser membranständigen Rezeptoren ist die Vermittlung von vielfältigen extrazellulären Signalen z. B. Licht, Aminosäuren, Ionen, kleine Peptide und Proteine in das Zellinnere, um die lebensnotwendigen Funktionen von Zellen und Organismen zu gewährleisten. Dies setzt eine spezifische Interaktion dieser Liganden mit ihren Rezeptoren voraus. Durch diese Interaktion wird der Rezeptor aktiviert, was in der Regel zu dessen Konformationsänderung führt. Dadurch wird ein Signal in den Intrazellularraum weitergeleitet, das die Aktivierung von G-Proteinen bewirkt. Diese Aktivierung führt nun zu einem Austausch von GDT- nach GTP der G-Protein- α -Untereinheit, wodurch einzelne oder verschiedene zelluläre Effektorsysteme wie Enzyme oder Ionenkanäle aktiviert werden können. G-Proteine sind heterotrimere Proteine, die aus einer α -Untereinheit bestehen, die der G-Protein-Familie den Namen gibt (G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$, $G_{12/13}$) und einer β/γ -Untereinheit, die zusammen als eine funktionelle Einheit betrachtet werden kann. Der großen Vielzahl von GPCR und ihrer Liganden steht nach Aktivierung nur eine limitierte Anzahl von vier G-Protein-Familien zur Verfügung. Die Frage nach den strukturellen Determinanten für die Kopplungsspezifität ist noch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt. Nach der Ligandenaktivierung kann es zur Kopplung an eine G-Protein-Familie wie im Falle des Melanocortin 4 Rezeptors (MC4R) an die G_s -Familie (Gantz et al., 1993) oder an mehrere G-Protein-Familien wie im Falle des TSH Rezeptors

(TSHR) an alle vier G-Protein-Familien (Laugwitz et al., 1996) kommen (Abbildung 1).

Das Bauprinzip der GPCR ist einheitlich. Die GPCR sind aus sieben die Membran durchspannenden α -helikalen Strukturen, die aus 20 bis ca. 35 Aminosäuren bestehen, aufgebaut. Diese Transmembranregionen werden durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden. Der N-terminale Teil des Rezeptors liegt im Extrazellularraum und der C-Terminus im Intrazellularraum. Die Familie der GPCR hat untereinander nur eine sehr geringe Homologie in ihrer Aminosäuresequenz. Dementsprechend wird die Familie der GPCR in drei große Untergruppen eingeteilt, die untereinander nur innerhalb der Gruppe eine Homologie aufweisen. In die Familie 1 gehören alle Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren. Diese Sub-Familie ist die größte der drei Familien und umfasst Rezeptoren, welche ein großes Spektrum von Liganden wie kleine Peptide wie z.B. α -Melanozyten stimulierendes Hormon (α -MSH) oder Proteine wie Glykoprotein hormone wie z. B. TSH binden können (siehe Abbildung 1). Große extrazelluläre Domänen in dieser Gruppe sind selten, wobei die Glykoprotein hormone Rezeptoren TSHR, Luteinisierenden-Hormon Rezeptor (LHR) und Follikel-stimulierenden-Hormon Rezeptor (FSHR) hier eine Ausnahme darstellen. Die Sub-Familie 2 ist die zweitgrößte Familie und umfasst Rezeptoren mit einer sehr großen extrazellulären Domäne wie z.B. beim Kalzitoninrezeptor. Die Sub-Familie 3 ist die kleinste der drei Gruppen. Diese Rezeptoren haben wie Rezeptoren der Subfamilie 2 eine sehr große extrazelluläre Domäne. In diese Familie gehört der Calcium-sensing Rezeptor und der GABA(B)-Rezeptor. Da im Rahmen dieser Arbeit nur Untersuchungen zu Rezeptoren der Rhodopsin-ähnliche Gruppe 1 durchgeführt wurden, wird im Folgenden nur auf die strukturellen Eigenschaften dieser Rezeptor-Familie eingegangen.

1.2 Strukturelle Eigenschaften der GPCR aus Sub-Familie 1

Die Strukturaufklärung von Membranproteinen ist kompliziert. Die ersten Informationen über eine Struktur von GPCR stammen vom Bakteriorhodopsin, welches auch eine Siebentransmembranstruktur aufweist, jedoch eine Protonenpumpe und kein GPCR ist. Arbeiten am bovinen Rhodopsin ermöglichten durch Kryo-Elektronenmikroskopie erste Einblicke in die Struktur, die eine sehr enge

Packung der Transmembrandomänen zeigt (Schertler et al., 1998), welche zirkulär im Uhrzeigersinn von intrazellulär betrachtet, angeordnet sind. Heute gibt es Strukturinformationen aus einer Auflösung von 2.8 Å für das Rhodopsin, das stellvertretend für alle GPCR verwendet wird (Palczewski et al., 2000).

In der Sub-Familie 1 gibt es eine Reihe von hochkonservierten Aminosäuren (siehe Abbildung 1), die in den anderen Sub-Familien nicht konserviert sind. Bei diesen Aminosäuren handelt es sich um ein Aspartat in Transmembrandomäne (TM) 2, welches die am stärksten konservierte Aminosäure in der Familie der GPCR ist. Kommt es bedingt durch eine Mutation zur Änderung in eine andere Aminosäure an dieser Position, so hat das in verschiedenen Rezeptoren eine erheblich gestörte Signaltransduktion zur Folge, wobei bei vielen Rezeptoren die Bindung des Liganden nicht beeinträchtigt ist (Valverde et al., 1996; Sealfon et al., 1995; Wang et al., 1991).

Eine weiteres wichtiges Motiv liegt am Übergang von Transmembrandomäne 3 in die intrazelluläre Schleife (icl) 2, das D/ERY-Motif. Es wird angenommen, dass diese Aminosäurekonfiguration essentiell für die Ausbildung einer Salzbrücke ist. Wird das Aspartat dieses Motivs gegen eine andere Aminosäure ausgetauscht, dann kommt es zu einer Störung der G-Protein Kopplung. Es wird vermutet, daß dieses Aspartat ein zentraler Auslöser für den Austausch von GDP von der α -Untereinheit des G-Protein ist (Achary and Karnik et al., 1996). In anderen Rezeptoren liegt jedoch an der Position korrespondierend zu D/E eine andere Aminosäure vor, was die generelle Bedeutung dieser Salzbrücke für die Signaltransduktion in Frage stellt. Für einige Rezeptoren, wie z.B. den LHR wurde gezeigt, dass diese Aminosäureposition eher wichtig für die korrekte Rezeptorfaltung und den Transport auf die Zelloberfläche als für die Signaltransduktion ist (Schulz et al., 1999; Schulz et al., 2000a). Man kann daraus schließen, dass dieses Motiv in den einzelnen Rezeptoren eine unterschiedliche Funktion hat.

Ein drittes wichtiges Motiv befindet sich in Transmembrandomäne 7, das NP(X)nY Motiv, welchem eine wichtige Rolle in der Rezeptoraktivierung und Regulation zukommt (Wang et al., 1996). Dabei wird dem Asparagin eine entscheidende Rolle für die G-Proteinaktivierung zugesprochen.

Ferner gibt es in den extrazellulären Schleifen (ecl) 1 und 2 je ein Cystein, welche zusammen eine Disulfidbrücke bilden. Diese Struktur liegt bei ca. 80 Prozent aller

GPCR der Familie 1 und auch bei einigen GPCR der Familie 2 vor. Für eine Vielzahl von Rezeptoren konnte gezeigt werden, daß eine Veränderung dieser Cysteine die Signaltransduktionseigenschaften beeinträchtigen (Cook & Eidner, 1997). Für andere Rezeptoren scheinen diese Cysteine jedoch für die hochaffine Ligandenbindung und den Transport zur Zelloberfläche wichtig zu sein (Schulz et al., 2000b).

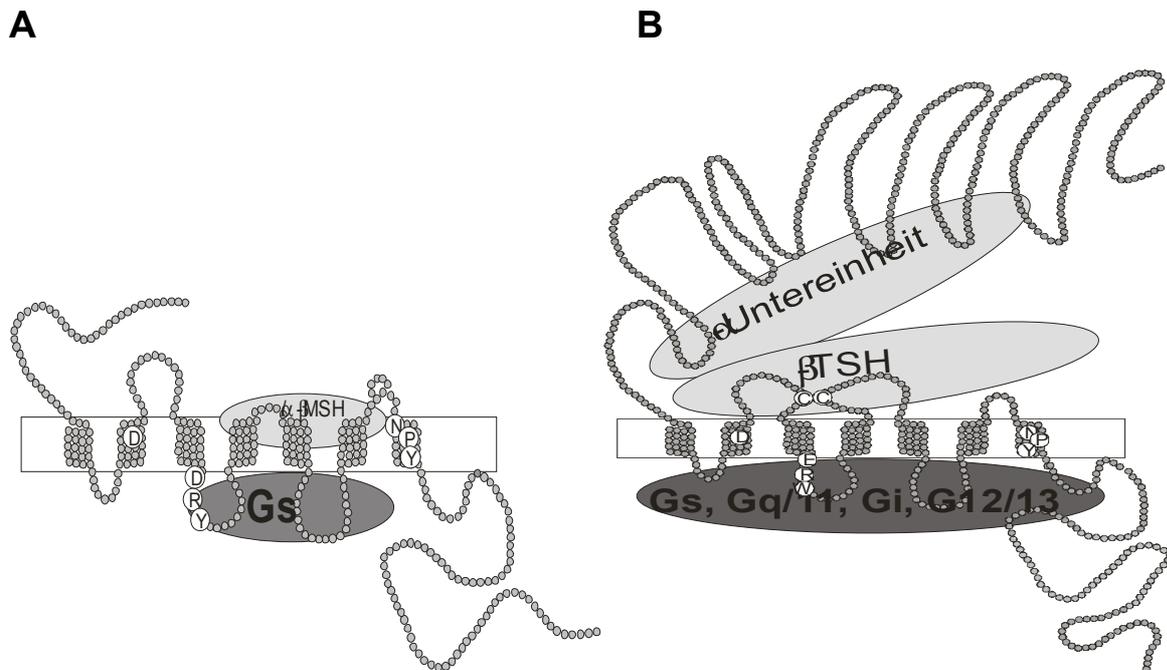


Abbildung 1: Grobschematische Darstellung von zwei GPCR der Subfamilie 1

A: Schematische Darstellung des MC4R. Dieser Rezeptor hat die typische kurze extrazelluläre Domäne der Subfamilie 1 Rezeptoren und alle konservierten Aminosäuren bis auf die Cysteine der extrazellulären Schleifen 1 und 2. Die zweite Schleife ist bei diesem Rezeptor ungewöhnlich kurz und die dritte extrazelluläre Schleife wird durch eine Disulfidbrücke stabilisiert. Die Bindung der natürlichen Liganden α - und β -MSH führt zu einer Kopplung an das Gs/Adenylatzyklasesystem, was durch die Bindung des endogenen inversen Agonisten Agouti-related peptide (AGRP) verhindert wird.

B: Schematische Darstellung des TSHR. Dieser Receptor hat für die Glykoproteinhormonrezeptoren die typische große extrazelluläre Domäne, die sonst in der Subfamilie 1 nicht auftritt. Diese Domäne ist hufeisenförmig angeordnet und dient der Bindung des Glykoproteinhormons TSH. Der Rezeptor hat die beiden konservierten Cysteine in den extrazellulären Schleifen 1 und 2, das konserviert Aspartat in TM2 und das NPY-Motif in TM7. Das typische DRY-Motif am Übergang von TM3 in die intrazelluläre Schleife 2 ist durch ein ERW-Motif ersetzt. Die Bindung des Liganden führt zur Aktivierung aller vier G-Protein Familien.

1.3 Agonistenbindung und Modelle der Rezeptoraktivierung

Die Bindungsstellen der Liganden an ihren Rezeptor ist in den einzelnen Unterfamilien der GPCR unterschiedlich und hängt von der Größe der Liganden ab. Große Liganden, wie die Glykoprotein hormone, binden an spezifische Strukturen der extrazellulären Domäne. Kleine Agonisten, wie biogene Amine, binden in einer aus hochkonservierten Aminosäuren gebildeten Tasche, welche aus den Transmembrandomänen gebildet wird. Für andere kleine Liganden sind außerdem Strukturen in den extrazellulären Schleifen wichtig für die hochaffine Bindung.

Eine Vielzahl von GPCR sind auch ohne Ligandenbindung bis zu einem gewissen Grad aktiv, wobei der Grad dieser konstitutiven Aktivität sehr unterschiedlich sein kann von relativ schwach wie im Falle des MC4R bis zu einer ausgeprägten basalen konstitutiven Aktivität beim TSHR und MC1R. Das Modell der Rezeptoraktivierung, das ternäre Komplexmodell von De Lean (1980), berücksichtigte jedoch nur die Agonisten-induzierte Verschiebung vom inaktiven Rezeptorzustand in den aktiven, was eine G-Protein-Aktivierung zur Folge hat. Mit der Entdeckung der basalen Aktivität einiger GPCR musste dieses Modell erweitert werden um die Beschreibung des Gleichgewichtes, welches sich zwischen dem inaktiven Zustand und der basalen Aktivität befindet. Die Bindung des Liganden führt dann zu einer vollständigen Verschiebung in den aktivierten Rezeptorzustand.

1.4 Di- und Multimerisierung von GPCR

Lange Zeit ist angenommen worden, dass die Ligandenbindung und Signaltransduktion eine Eigenschaft monomerer GPCR ist. Dagegen ist schon lange bekannt, dass andere Membranrezeptoren wie z.B. Tyrosin-Kinase-Rezeptoren als Dimere signalisieren. Anfang der 90er Jahre konnte jedoch mit Arbeiten mit Chimären des α 2-adrenergen/M3-muscarinen Rezeptors gezeigt werden, dass es durch Rekonstitution von einzelnen Rezeptordomänen zur Herstellung eines intakten Rezeptors kommen kann (Maggio et al., 1993). Dies konnte durch weitere Arbeiten am V2 Vasopression-Rezeptor und am Gonadotropin Releasing Hormon Rezeptor GnRHR) weiter belegt werden (Schöneberg et al., 1996; Grosse et al., 1997). Ende der 90er Jahre konnte dann an Arbeiten am GABA(B) Rezeptor zeigen,

dass auch für die physiologische Funktion von GPCR die Bildung von Dimeren wichtig ist (White et al., 1998). Nur die Co-Expression von zwei GABA(B)-Rezeptor Isoformen GABA(B1) und GABA(B2) führt zur Expression eines funktionsfähigen GABA-Rezeptors auf der Zelloberfläche. Kürzlich konnte auch für das bovine Rhodopsin mittel atomic-force-Mikroskopie gezeigt werden, dass das native Rhodopsin als Dimer in der Retina vorliegt (Fotiadis et al., 2003).

In den folgenden Jahren wurde dann für eine Vielzahl von GPCR die Bildung von Homo- und Heterodimeren gezeigt (Bouvier, 2001), so dass die Dimerisierung inzwischen ein akzeptiertes Konzept in der Funktion von GPCR ist. Wie diese Dimerisierung jedoch auf molekularer Ebene stattfindet, konnte nur für wenige Rezeptoren, wie die GABA(B)-Rezeptoren oder den Calcium-sensing Rezeptor gezeigt werden, wo Strukturen im N- oder C-terminus für die Dimerbildung entscheidend sind. Es scheinen zwei verschiedene Interaktionen für die Ausbildung von Dimeren eine Rolle zu spielen, zum einen sind Disulfidbrücken wie beim Calcium-sensing-Rezeptor beteiligt, zum anderen kann es zu Interaktionen mit den Transmembrandomänen kommen.

Allgemein existieren zwei Modellvorstellungen der Dimerisierung von GPCR: zum einen existiert das Modell der Kontakt-Dimere, bei dem es zum Kontakt zwischen den Transmembrandomänen der einzelnen GPCR kommt, ohne daß diese ihre enge Packung der Transmembrandomänen aufgeben. Dieses ist wahrscheinlich das Modell, welches für die Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren der Familie 1 am häufigsten zutreffen wird. Das Modell des Domäne-übergreifenden Dimers nimmt einen Austausch einzelner Transmembrandomänen der Dimerisierungspartner an.

Mit der Identifikation der Rezeptordimerisierung wurde auch beobachtet, dass einzelne Rezeptormutanten einen dominant-negativen Effekt auf den Wildtyp-Rezeptor ausüben. Die Identifikation einer dominant-negativen Mutante des Calcium-sensing Rezeptors hat eine pathophysiologische Bedeutung und führt zur Hypokalzämie (Bai, et al, 1996). Rezeptordimerisierung von Defektmutanten mit dem Wildtyp-Rezeptor kann jedoch auch eine protektive Wirkung haben, wie im Falle des CCR5-Rezeptors, bei dem die Dimerisierung einer Deletionsmutante mit dem Wildtyprezeptor die Expression des Rezeptorkomplexes auf der Zelloberfläche beeinträchtigt, wodurch ein wichtiger Co-Rezeptor für den Eintritt von HIV in die Zelle fehlt (Benkirane, et al., 1997).

Somit wird die Untersuchung von Rezeptordimerisierung ein fester Bestandteil für die Beurteilung von Signaltransduktionseigenschaften von GPCR sowie der Beurteilung von Mutationen in GPCR, von denen man eine Krankheitsassoziation annimmt.

1.5 Mutationen in GPCR

Da GPCR für die Aufrechterhaltung von vielen physiologischen Funktionen wichtig sind, können mutationsbedingte Veränderungen in GPCR die Ursache für eine Reihe von Erkrankungen sein. Bei den auftretenden Mutationen kann man zwischen Mutationen unterscheiden, die in einer Inaktivierung oder einer Aktivierung des Rezeptors resultieren. Mutationen, die zu einer konstitutiven Aktivität des Rezeptors führen, sind wesentlich seltener als solche, die den Rezeptor inaktivieren. Für die phänotypische Ausprägung dieser Mutationen reicht ein mutiertes Allel aus, aktivierende Keimbahn-Mutationen auf beiden Allelen eines Gens sind wahrscheinlich nicht mit dem Leben vereinbar. Die meisten aktivierenden Mutationen sind in den Glykoproteinrezeptoren TSHR, LHR und Calcium-sensing Rezeptor bekannt. Diese Mutationen, meist missense-Mutationen (in sehr seltenen Fällen Deletionen), liegen zum größten Teil in den Transmembrandomänen des Rezeptors mit einer Häufung in Transmembrandomäne 6 und am Übergang von Transmembrandomäne 6 in die intrazelluläre Schleife 3. Dort lokalisierte Mutationen führen zu einer permanenten Aktivierung des G_s /Adenylatzyklaseweges. Dies hat bei Patienten im Falle einer TSHR-Mutation die Folge einer nicht-autoimmunen Hyperthyreose und bei einer aktivierenden LHR-Mutation bei Jungen die Folge einer vorzeitigen Pubertät (Kopp et al., 1995; Duprez et al., 1994; Shenker et al., 1993). Diese Mutationen können sporadisch oder auch familiär auftretenden, wobei die sporadisch auftretenden Mutationen meistens mit einem schwereren Phänotyp einhergehen. Die Mutationen können neben der permanenten Aktivierung des G_s /Adenylatzyklaseweges auch in seltenen Fällen zu einer permanenten Aktivität des Phospholipase C-Weges führen. Diese Aktivierung kann dann bei einigen, bislang nur somatische auftretenden Mutationen, zu karzinogenen Veränderungen führen, z.B. zur Entstehung von Schilddrüsenkarzinomen oder Leydigzelltumoren (Russo et al., 1995; Liu et al., 1999).

Inaktivierende Mutationen in GPCR sind für sehr unterschiedliche Erkrankungen verantwortlich. Veränderungen in GPCR, die zu einer Inaktivierung führen, reichen über missense und nonsense Mutationen, Insertionen, Deletion, splice-site Mutationen und können sich im gesamten Rezeptor befinden. Diese Mutationen werden in der Regel autosomal rezessiv vererbt, eine Ausnahme stellen Mutationen im MC4R dar, die zumeist autosomal dominant vererbt zum Krankheitsbild der Adipositas führen. Die Ausprägung des Krankheitsbildes hängt von dem Grad der Rezeptorinaktivierung ab. So gibt es Mutationen, die zu einer partiellen Inaktivierung des TSHR führen und bei den betroffenen Patienten nur zu einer TSH-Erhöhung bei euthyreoter Stoffwechsellage bedingen und somit die Mutationen durch eine erhöhte TSH-Sekretion der Hypophyse kompensiert werden kann (Sunthornheparakul et al., 1995). Dagegen führen Mutationen, welche die Funktion des TSHR schwerer beeinträchtigen und die sich nicht durch hohe TSH-Spiegel kompensieren lassen, zu einer permanenten congenitalen Hypothyreose (Biebermann et al., 1997).

Tabelle 1: Mutationen in GPCR, die zu endokrinen Erkrankungen führen

GPCR	Erkrankung bei konstitutiver Aktivierung	Erkrankung bei Inaktivierung
TSHR	nicht-autoimmune Hyperthyreose	Hyperthyreotropimämie/congenitale Hypothyreose
LHR FSHR	vorzeitige Pubertät bei Jungen ovarielles Hyperstimulationssyndrom, Spermatogenese in Abwesenheit von Gonadotropinen	Pseudohermaphroditismus Ovarielle Dysplasie, Amenorrhoe
Ca ²⁺ -sensing Rezeptor	Hypoparathyroidismus	Hyperparathyroidismus
PTH/PTH-related Peptid-Rezeptor	Jansens Metaphyseal Chondrodysplasie	-
GnRH-Rezeptor	-	Hypogonadotropher Hypogonadismus
TRH Rezeptor	-	zentrale Hypothyreose
V2 Rezeptor	-	nephrogener Diabetes insipidus
GHRH Rezeptor	-	Kleinwuchs

PTH: Parathormon; GnRH: Gonadotropin releasing Hormon; V2R Vasopressin 2;
GHRH: growth hormone releasing hormone

1.6 Mutationen in Liganden von GPCR

Neben Mutationen in GPCR können auch Veränderungen im Liganden zur einer Veränderung der Signalübertragung führen. Es sind jedoch sehr viel weniger Mutationen in Liganden von GPCR bekannt als in GPCR selbst. Für Glykoproteinhormone, die aus einer gemeinsamen α -Untereinheit und einer für jedes Glykoproteinhormon spezifischen β -Untereinheit bestehen, sind nur Mutationen in der β -Untereinheit bekannt (Hayashizaki et al., 1989). Bislang sind nur Mutationen in Liganden von GPCR beschrieben, die eine Inaktivierung der Signalübertragung zur Folge haben. Dies kann die Ursache für verschiedene Erkrankungen sein, wie z.B. für die zentrale Hypothyreose im Fall von Mutationen im β -TSH. Auch in den β -Untereinheiten der Glykoproteinhormone LH (Weiss et al., 1992) und FSH (Matthews et al., 1993) sind Mutationen bekannt, die eine Aktivierung des Rezeptors verhindern und sich dann phänotypisch wie eine inaktivierende Rezeptormutation auswirken.