

**Struktur–Funktionsanalysen intramolekularer
Signalisierungsmechanismen und
pharmakologische Intervention am
Thyreoidea-stimulierenden Hormon Rezeptor**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Inna Hoyer

Berlin 2014

Diese Arbeit wurde von Januar 2010 bis November 2014 am Leibniz Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP, Berlin) in der Abteilung Struktur Biologie unter der Leitung von Dr. Gerd Krause angefertigt.

Erstgutachter: Dr. Gerd Krause

Zweitgutachter: PD. Dr. Hartmut Oschkinat

Tag der Disputation: 02. April 2015

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich Dr. Gerd Krause für die Bereitstellung des Themas und die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie während der Anfertigung meiner Doktorarbeit danken.

Prof. Dr. Hartmut Oschkinat möchte ich für die Übernahme des Gutachtens danken.

PD Dr. Ralf Schüle in danke ich für die Bereitstellung des Laborarbeitsplatzes und für die kontinuierliche Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der experimentellen Arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Ann-Karin Haas und Dr. Claudia Rutz für die Einweisung und Betreuung im praktischen Laboralltag, für die Unterstützung bei jeglichen Fragen und Problemen und für das angenehme Arbeitsklima.

Ich bedanke mich bei Dr. Gunnar Kleinau für das Erstellen des Homologiemodells.

Herzlichst bedanken möchte ich mich bei Dr. Jens Furkert für die Hilfe bei der Durchführung des cAMP-RIA's, für die zielführenden Diskussionen und anregenden Ideen, die zum guten Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Ein großes Dankeschön geht an die gesamte Screening Unit des FMP. Besonders möchte ich mich bei Andreas Oder für die Unterstützung beim Durchführen des HTS bedanken. Dr. Martin Neuenschwander danke ich für die Auswertung der experimentellen Daten. Ein großes Dankeschön gehen an Sebastian Sobottka und Dr. Edgar Specker für die stereoselektiven Synthesen der Substanzen, die meine Arbeit vervollständigten.

Annika Kreuchwig möchte ich für wertvolle Anregungen und für die tollen Zeiten während der gemeinsamen Konferenzen ein großes Dankeschön aussprechen!

Franziska Kreuchwig möchte ich für ihre Hilfe und Geduld bei der Erstellung der PyMol-Bilder, für die Tipps und Tricks rund um den Computer danken!

Большое спасибо Ирине Венк! Спасибо за твою помощь в подготовке к экзаменам, за твоё терпение и за твоё умение видеть во всём положительную сторону.

Дорогие мои мама и папа, Лариса, Роман и Олег, огромное спасибо вам за вашу поддержку в течение всей моей учёбы!

Meinen Schwiegereltern, Helmut und Petra, danke ich für Ihre Unterstützung und ihren Rückhalt, für die exklusive Betreuung und für die tolle gemeinsame Zeit.

Mein größter Dank gilt vor allem den beiden Menschen, die mich rund um die Uhr ertragen mussten, meinem Mann Denis und meiner Tochter Jeanny. Danke für das Vertrauen in mich und meine Fähigkeiten, für eure unendliche Geduld und Hilfe.

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG	I
2. SUMMARY.....	IV
3. EINLEITUNG	1
3.1. G-PROTEIN-GEKOPPELTE REZEPTOREN (GPCR)	1
3.1.1. STRUKTUR UND REGULATION DER GPCR.....	1
3.1.2. BEDEUTUNG DER GPCR.....	2
3.2. GLYKOPROTEINHORMONE UND IHRE REZEPTOREN	3
3.2.1. GLYKOPROTEINHORMONE: STRUKTUR UND FUNKTION.....	4
3.3. TSHR.....	5
3.3.1. DIE TOPOLOGIE UND STRUKTUR DES TSHR	5
3.3.2. DIE EKTODOMÄNE	5
3.3.3. AKTIVIERUNG UND SIGNALISIERUNG DES TSHR	10
3.3.4. DIE PHYSIOLOGISCHE ROLLE DES TSH UND DES TSHR	11
3.4. MORBUS BASEDOW UND DIE ENDOKRINE ORBITOPATHIE (EO)	11
3.4.1. TSHR ALS AUTOANTIGEN IN DER EO.....	12
3.5. TRANSMEMBRANÄRE BINDUNGSTASCHE UND ALLOSTERISCHE LIGANDEN	13
3.6. ALLOSTERISCHE LIGANDEN DES TSHR.....	14
3.7. EFFEKT DER ALLOSTERISCHEN LIGANDEN AM TSHR.....	15
3.8. PHARMAKOLOGISCHES POTENTIAL DER ALLOSTERISCHEN LIGANDEN.....	16
4. MOTIVATION UND ZIELSTELLUNG DER ARBEIT.....	18
5. MATERIAL UND METHODEN.....	20
5.1. GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	20
5.2. CHEMIKALIEN	21
5.2.1. PUFFER UND LÖSUNGEN	23
5.2.2. OLIGONUKLEOTIDE.....	24
5.2.3. BAKTERIENSTÄMME	24
5.2.4. EUKARYOTISCHE ZELLINIEN	25
5.2.5. SOFTWARE	25

5.3. METHODEN	26
5.3.1. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	26
5.3.2. ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	30
5.3.3. PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	31
5.3.4. PHARMAKOLOGISCHE METHODEN	36
5.3.5. HTS	40
5.3.6. MIKROSKOPISCHE METHODEN AN LEBENDEN ZELLEN.....	44
5.3.7. SPEZIFISCHE BASALE AKTIVITÄT	44
5.3.8. HOMOLOGE MOLEKÜLMODELLE DES TSHR.....	45
5.3.9. BALLESTROS-WEINSTEIN-NOMENKLATUR	45
6. ERGEBNISSE	46
6.1. KLÄRUNG DES EINFLUSSES VON ALANIN AN DER POSITION 593 (5.50) AUF DIE TSHR-KONFORMATION	46
6.1.1. DIE FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER TSHR-MUTANTEN	46
6.1.2. HOMOLOGIEMODELL DES TSHR.....	51
6.2. IDENTIFIZIERUNG DES TSHR-ANTAGONISTEN	53
6.2.1. ETABLIERUNG UND OPTIMIERUNG DES ECF-ASSAY.....	53
6.2.2. PRIMÄRES SCREENING	57
6.2.3. HIT-VALIDIERUNG	58
6.2.4. AUSSCHLUSS FALSCH POSITIVER HITS.....	59
6.3. SEKUNDÄRER ASSAY, RIA	62
6.3.1. BESTIMMUNG DER OPTIMALEN ZELLDICHTE UND DES ZELLSYSTEMS.....	62
6.3.2. PRÄINKUBATION UND INITIALE INHIBITIONSKURVEN.....	65
6.4. CHARAKTERISIERUNG UND OPTIMIERUNG DER HIT-SUBSTANZEN	66
6.4.1. STRUKTUR-AKTIVITÄTSBEZIEHUNG.....	66
6.4.2. STEREOSELEKTIVE SYNTHESE	69
6.4.3. SELEKTIVITÄT	74
6.4.4. DIE TOXIZITÄTSBESTIMMUNG	76
6.4.5. SCHILD-REGRESSIONS-ANALYSE UND SCHILD-PLOT	78
7. DISKUSSION	82
7.1. EINFLUSS VON ALANIN AN DER POSITION 593 (5.50) AUF DIE TSHR-KONFORMATION	82
7.2. PRIMÄRES SCREENING ZUR IDENTIFIZIERUNG DES TSHR-ANTAGONISTEN	84
7.2.1. FMP SUBSTANZBIBLIOTHEK, CHEMBIONET	85

7.2.2.	HTS: VOR- UND NACHTEILE	86
7.2.3.	AUSWAHL DES ZELLSYSTEMS UND KALIBRIERUNG DES ZELLSASSAYS	87
7.2.4.	IDENTIFIZIERUNG DER HIT-SUBSTANZEN, ALS TSHR-ANTAGONISTEN.....	88
7.3.	CHARAKTERISIERUNG UND OPTIMIERUNG DER HIT-SUBSTANZEN	90
7.3.1.	OPTIMIERUNG DER HIT-SUBSTANZEN ANHAND DER SAR.....	90
7.3.2.	SAR DER KOMMERZIELL ERWORBENEN SUBSTANZEN	90
7.3.3.	SAR DER STEREOSELEKTIV SYNTHETISIERTEN SUBSTANZEN	91
7.3.4.	CHARAKTERISIERUNG DER HIT-SUBSTANZEN UND IHRER DERIVATE.....	91
7.3.5.	SELEKTIVITÄT UND THERAPEUTISCHES FENSTER	92
7.3.6.	SCHILD-REGRESSIONS-ANALYSE UND SCHILD-PLOT ZUR BESTIMMUNG DES ANTAGONISTENTYPS	92
7.3.7.	TOXIZITÄT VON S37	94
7.4.	WERTUNG DER ERGEBNISSE	94
7.4.1.	SUBSTANZ S9.....	95
7.4.2.	SUBSTANZ S38.....	95
7.4.3.	SUBSTANZ S37.....	96
7.4.4.	AUSBLICK AUF FORTFÜHRENDE STUDIEN	96
7.4.5.	PHARMAKOLOGISCHES POTENTIAL DER IDENTIFIZIERTEN SUBSTANZEN	97
8.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>99</u>
9.	<u>ANHANG.....</u>	<u>117</u>
9.1.	DIE AMINOSÄURENSEQUENZ DES HUMANEN TSHR	117
9.2.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	118
9.3.	ABKÜRZUNGEN DER AMINOSÄUREN.....	122
9.4.	PUBLIKATIONEN, VORTRÄGE UND POSTER.....	123
9.4.1.	PUBLIKATIONEN.....	123
9.4.2.	VORTRÄGE UND POSTER	123
9.5.	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	125

1. ZUSAMMENFASSUNG

Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf der Identifizierung von niedermolekularen Antagonisten des Thyreoidea-stimulierenden Hormon Rezeptors (TSHR). Der Hintergrund ist eine bestehende therapeutische Lücke bei der Endokrinen Orbitopathie (EO), einer Autoimmunerkrankung, die im Zusammenhang mit der pathologischen Aktivierung des TSHR durch Autoantikörper steht.

Der TSHR ist ein Vertreter der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Er wird hauptsächlich in der basolateralen Membran der Follikelepithelzellen der Schilddrüse exprimiert und ist an der Regulation vieler metabolischer Prozesse des Körpers beteiligt. Die Rezeptoraktivierung durch Thyreotropin führt zur Produktion von sekundären Botenstoffen, wie dem cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP) oder Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃), die ihrerseits die Iodaufnahme, Thyreoglobulinsynthese, Peroxidase-Aktivität, Iodierung, Endozytose und Proteolyse sowie Hormonausschüttung regulieren. Angeborene und erworbene Mutationen des TSHR haben oft eine Hypothyreose bzw. Hyperthyreose zur Folge. Eine TSHR-abhängige Autoimmunerkrankung ist Morbus Basedow, bei der TSHR durch die Bindung von Autoantikörpern stimuliert wird, so dass eine Hyperthyreose resultiert. Eine besondere Form des Morbus Basedow stellt die EO dar. Die Stimulation des TSHR durch die Autoantikörper führt bei EO zu einer verstärkten Zellproliferation und Zellausdifferenzierung zu Adipozyten. Diese Prozesse haben eine Volumenzunahme des orbitalen Bindegewebes und einen Exophthalmus zur Folge. Die bislang eingesetzten Medikamente bei Morbus Basedow unterbinden die Synthese der Schilddrüsenhormone und haben daher keinen Einfluss auf den Verlauf der EO. Aus diesem Grund ist es von besonderer Bedeutung, kleine Moleküle zu identifizieren, die direkt am TSHR wirken, um darauf basierend ein hochaffines und selektiv wirkendes Medikament zur Behandlung der EO zu entwickeln.

Die Bindungstasche kleiner Moleküle vieler GPCR befindet sich innerhalb des transmembranären Bereiches und wird durch Aminosäuren der angrenzenden Helizes ausgekleidet. Die Optimierung der kleinen Moleküle in ihrer Wirkung setzt die Kenntnis über deren räumliche Orientierung im Rezeptor und damit die der funktionalen Gruppen der umgebenden Aminosäuren voraus. Die Ergebnisse meiner Diplomarbeit zur funktionellen Charakterisierung der Aminosäuren der transmembranären Helizes deuteten auf eine andere Orientierung der Aminosäure L587^{5.44} hin, als ein TSHR-Homologiemodell basierend auf der Rhodopsin-Kristallstruktur vorhersagt. Da es für die transmembranäre Domäne des TSHR momentan noch keine Kristallstruktur gibt, basieren die Homologiemodelle auf Strukturen von bereits kristallisierten GPCR. Die Unterschiede in der Sequenz haben eine Auswirkung auf die Konformation der einzelnen Strukturelemente. Prolin an

der Position 5.50 ist innerhalb der Familie A der GPCR hochkonserviert. Alle Glykoproteinrezeptoren besitzen hingegen an dieser Position ein Alanin.

Der erste Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag daher darauf, den Einfluss der Position 593^{5.50} auf die Konformation der transmembranären Helix (TMH) 5 zu untersuchen. Im Detail sollte die Orientierung der Aminosäuren an der TMH5 geklärt werden, die potentiell die allosterische Bindungstasche für kleine Moleküle beeinflussen. Prolin führt zu einer Aufweitung der regulären helikalen Rückgratstruktur an der TMH5. Die TSHR-Homologiemodelle, die auf Kristallstrukturen mit einem Prolin (Position 593^{5.50}) basieren, wiesen eine andere Seitenkettenorientierung als Modelle mit regulärer α -Helix auf. Zur Klärung der TMH5-Konformation am TSHR wurden Mutanten generiert und biochemisch sowie strukturell charakterisiert. Mittels ortsgerichteter Mutagenesen wurde Alanin gegen Prolin, Glycin und Valin ausgetauscht. Die anschließende funktionelle Charakterisierung dieser TSHR-Mutanten ergab, dass jede der eingeführten Aminosäuren an dieser Position zu einer Veränderung entweder in der TSHR-Expression, -Signalisierung oder in beidem führt. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen auf eine reguläre α -helikale Struktur der TMH5 im TSHR schließen. Daraus resultiert, im Vergleich zu der Prolin enthaltenden Helix, eine abweichende Orientierung der Aminosäuren im N-terminalen Bereich der TMH5 und in der transmembranären Bindungstasche. Die gewonnenen Daten über die strukturelle Konformation der TMH5 wurden für die Optimierung des TSHR-Homologiemodells genutzt, welches für die Docking-Studien kleiner Liganden von besonderer Bedeutung ist.

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte ein zellbasiertes High Throughput Screening (HTS) zur Identifizierung von TSHR-Antagonisten etabliert und erfolgreich durchgeführt werden. Die Auswertung des primären HTS ergab 350 positive Hits. Die anschließende Bestimmung der konzentrationsabhängigen Inhibierung des Rezeptors durch die Substanzen, sowie der Ausschluss falsch positiver Hits führten zu der Identifizierung von zwölf chemischen Verbindungen. Die Durchführung eines Radioimmunassays in HEK293T-TSHR-Zellen verifizierte drei Substanzen. Davon wurden wiederum zwei Verbindungen, die Substanzen S4 und S9, ausgewählt. Von diesen wurden insgesamt 24 Derivate erworben oder synthetisiert und in der Folge mit dem Radioimmunassay getestet. Als Resultat konnte ein an dem TSHR selektiv wirkender Antagonist, die Substanz S37, identifiziert werden. Die anschließende pharmakologische Charakterisierung ergab, dass S37 selektiv in einer konzentrationsabhängigen Weise auf den TSHR wirkt und keine zytotoxische Aktivität zeigt.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit erfolgreich Sequenz-Struktur-Funktionsanalysen zur Klärung der TMH5-Konformation im TSHR und ein HTS zur Identifizierung von TSHR-Antagonisten durchgeführt. Im Zuge dessen konnte eine Substanz mit selektivem antagonistischem Effekt auf den TSHR als Grundlage für weitere Optimierungen

identifiziert werden. Des Weiteren sollte geprüft werden, ob die Substanz S37 die Rezeptoraktivierung durch Antikörper herabsetzt.

2. SUMMARY

This thesis focuses on the identification of small molecules as antagonists of the thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR). The motivation is the therapeutic gap in endocrine orbitopathy (EO), an autoimmune disease associated with the pathological activation of the TSHR by autoantibodies. The first part of the thesis investigates sequence-structure-function relationships of the TSHR concerning a potential allosteric ligand-binding pocket, while the second part focuses on identifying small molecules with an antagonistic effect on TSHR function using High-Throughput Screening (HTS).

The TSHR is a G-protein-coupled receptor (GPCR) and belongs to the subclass of glycoprotein hormone receptors. It is involved in the regulation of many metabolic processes in the human body. Receptor activation by its endogenous ligand – the thyroid-stimulating hormone (TSH, thyrotropin) – leads to production of second messengers such as cyclic adenosine monophosphate (cAMP) or inositol-1,4,5-trisphosphate (IP₃). These in turn regulate the iodine uptake, thyroglobulin synthesis, endocytosis and proteolysis, peroxidase activity, iodination and hormone secretion. TSHR is mainly expressed in follicular epithelial cells of the thyroid gland. The receptor expression has also been detected in non-thyroid tissue, such as orbital fibroblasts (OF), bones, gonads and kidneys. Congenital and somatic mutations of the TSHR often cause hypothyroidism or hyperthyroidism. Uncontrolled receptor activation by autoantibodies directed against the TSHR results in an autoimmune disorder known as Graves' disease. Thyroid-associated endocrine orbitopathy is one of the most typical symptoms of Graves' disease. This ocular manifestation includes tissue inflammation, proptosis, corneal exposure and optic nerve compression. TSHR activation by autoantibodies is considered as a key process of EO and leads to cell proliferation and cell differentiation.

The current therapy for Graves' disease is confined to restricting the synthesis of thyroid hormones and thus has no effect on the course of EO. At the moment, there are no drugs available on the market that target the TSHR directly. The direct suppression of the pathological TSHR activation by low molecular weight (LMW) molecules could be a potential approach for treating Graves' disease or EO.

The first aim of this thesis was to prove if transmembrane helix 5 (TMH5) of the TSHR exhibits a conformation different from that found in most other family-A GPCRs. The biochemical and structural characterization of TSHR mutants was utilized to clarify the conformation of TMH5. Within family-A GPCRs, a highly conserved proline can be found at position 5.50 in TMH5 which causes a twist in the helix structure. In contrast, all glycoprotein hormone receptors have an alanine at this position. The influence of the position 593^{5.50} on the conformation of TMH5 and thus also on ligand-binding was to be examined

in detail. To gain insights into the functionality of this position, alanine was exchanged with proline, glycine and valine using site-directed mutagenesis. The generated TSHR mutants were characterized in terms of cell-surface expression and basal and thyrotropin-induced cAMP accumulation. The functional data of the mutants show changes either in cell-surface expression, in signaling or both. Based on this functional data, the conclusion was drawn that TSHR might have a different conformation from most other family-A GPCRs by a regular α -helix. Consequently, the lack of the proline at position 5.50 in the TSHR leads to a shift of amino acids by one position. In turn, this results in a different orientation of the amino acids in the N-terminal region of the TMH5, and also within the transmembrane binding pocket. The obtained data explained previously reported mutational effects in this region and were used for the optimization of the TSHR homology model, which is of particular importance for docking studies of small ligands.

The second part of the thesis focuses on the establishment and implementation of a cell-based HTS assay to identify a lead structure that provides starting points for the development of a selective antagonist for the TSHR. The completion of the primary screen of 16000 compounds performed in the CHO-K1-TSHR cell line resulted in 350 positive hits. The determination of the dose-dependent inhibition of these compounds, together with the exclusion of false positive hits through testing them in the CHO-K1 cell line without TSHR, led to the identification of 12 compounds. The verification of these 12 compounds was performed in a secondary screen using a HEK293T-TSHR cell line, ultimately leading to the identification of three compounds with antagonistic activity towards the TSHR. Two compounds, S4 and S9, were selected and formed the basis for further structure-function analysis. The experimental testing of 24 derivatives led to the identification of compound S37, a selective TSHR antagonist. S37 is a product of a stereoselective synthesis from compound S4 and is a stereoisomer in *endo*-conformation. The pharmacological characterization revealed that substance S37 is not toxic in a HEK293T-TSHR cell line and inhibits TSHR activation in a dose-dependent manner. The special advantage of substance S37 is that it is strictly TSHR-selective and has no effects on the homologous receptors LHCGR and FSHR.

In summary, sequence-structure-function analysis to clarify the TMH5 conformation of the TSHR as well as a HTS for TSHR antagonists were successfully performed in the course of this thesis' work. The latter resulted in the identification of a compound with selective TSHR antagonistic effect that represents a base for further optimization.

3. EINLEITUNG

3.1. G-PROTEIN-gekoppelte Rezeptoren (GPCR)

3.1.1. STRUKTUR UND REGULATION DER GPCR

Die Klonierung der ersten Monoamin-Rezeptoren führte zu der überraschenden Erkenntnis, dass diese homolog nicht nur zu einander, sondern auch zu dem Rhodopsin-Rezeptor sind¹. Kurz danach wurde klar, dass diese Rezeptoren nur die ersten Mitglieder einer sehr großen und sehr vielfältigen Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) bilden. Die GPCR sind die größte Familie der Membranproteine im menschlichen Genom und werden durch eine Vielzahl von verschiedenen Molekülen aktiviert^{2,3}. Sie sind an der Regulation von diversen physiologischen Prozessen, wie den Sinneswahrnehmungen von Schmerzen, Gerüchen, Geschmack, Muskelkontraktion, Licht, an der endokrinen und exokrinen Sekretion, sowie an Entzündungsreaktionen und Immunität beteiligt. Das breite Spektrum der GPCR-Liganden reicht von biogenen Aminen und Neurotransmittern, über Peptide, Glykoproteine, Lipide und Nukleotide, bis hin zu Ionen und Photonen³.

Allen GPCR gemeinsam sind die sieben heptahelikalen transmembranären Strukturelemente von etwa 25-30 Aminosäuren Länge, die über drei intra- und drei extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind, ein extrazellulärer N-Terminus und ein intrazellulärer C-Terminus^{4,5}. Die größte Ähnlichkeit der GPCR liegt im transmembranären Bereich. Sowohl die Sequenzmotive der Aminosäuren als auch einzelne Aminosäuren sind in bestimmten Unterfamilien der GPCR hochkonserviert⁶. Der größte Unterschied ist im N-Terminus zu finden. So weisen die Monoamin- und Peptidrezeptoren einen relativ kurzen N-Terminus von 10-50 Aminosäuren, die Glykoproteinhormonrezeptoren (GPHR) und Glutamatrezeptoren dagegen eine Sequenz von 350-600 Aminosäuren auf⁷.

Basierend auf der Sequenzähnlichkeit innerhalb der sieben transmembranären Helizes (TMH) werden die GPCR in fünf Familien eingeteilt: Rhodopsin-ähnliche Rezeptoren (Familie A), Adhäsions- und Sekretin-Rezeptoren (Familie B), metabotrope Glutamatrezeptoren (Familie C), Pheromonrezeptoren (Familie D), cAMP-Rezeptoren (Familie E) und *Frizzled- und Smoothed*-Rezeptoren (Familie F)⁸⁻¹⁰. Während die GPCR der Familien A, B, C und F in Säugern vorkommen, sind die GPCR der Familie D und E nur in Wirbellosen vertreten¹¹.

Die strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten der GPCR stehen im Kontrast zur strukturellen Vielfalt der natürlichen GPCR-Liganden. Diese reichen von subatomaren Teilchen (ein Photon) und Ionen (H^+ und Ca^{2+}) über kleine organische Moleküle bis zu Peptiden

und Proteinen. Die Unterschiede in der Größe und physikalisch-chemischen Eigenschaften der Liganden spiegeln sich in den verschiedenen Rezeptorbindungsstellen wider³. Die Liganden binden an ihren jeweiligen Rezeptor der einzelnen Unterfamilien der GPCR unterschiedlich¹². Während Peptidhormone und Proteine an die extrazelluläre Domäne binden, interagieren viele kleine organische Agonisten innerhalb des transmembranären Bereiches.

Die Größe des Liganden allein lässt keine Rückschlüsse auf die Position der Bindungsstelle innerhalb des Rezeptors zu. So binden sowohl die Glykoprotein-hormone als auch Ca^{2+} an relativ große N-terminale Domänen und aktivieren den jeweiligen Rezeptor^{12,13}. Trotz der großen Vielfalt der Liganden wird allgemein angenommen, dass der molekulare Aktivierungsmechanismus allen GPCR gemeinsam ist³. Das Signalisierungsprinzip der GPCR besteht aus drei Komponenten: aus dem GPCR selbst, aus einem G-Protein und dem Effektor¹⁴. Das G-Protein besteht aus je einer α -, β -, und γ -Untereinheit. Die G-Proteine sind durch ihre α -Untereinheit definiert und können anhand ihrer Sequenzhomologie in vier G-Protein-Familien $G\alpha$, G_i , G_q und G_{12} eingeordnet werden¹⁵. Die Untereinheiten werden auf unterschiedlichen Genen kodiert. Es sind 16 Gene für α , sechs für β und zwölf für γ bekannt. Damit ergibt sich eine Anzahl von mehr als 1000 möglichen G-Protein-Varianten. Dazu kommen ca. 100 bekannte unterschiedliche Effektoren. Im Unterschied zu dieser Diversität ist der molekulare Mechanismus innerhalb der Familie hochkonserviert. Nach Bindung eines Agonisten findet ein Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) durch Guanosintriphosphat (GTP) an der α -Untereinheit im $G\alpha$ - β - γ -Komplex statt. Dies führt zu der Dissoziation des $G\alpha$ - β - γ -GTP-Komplexes zu $G\alpha$ -GTP und $G\beta$ - γ . Diese aktivieren jeweils unabhängig voneinander verschiedene membranständige Effektoren. Die GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit hydrolysiert GTP zu GDP, die $G\beta$ - γ -Untereinheit reassoziert mit $G\alpha$ -GDP, wodurch eine Inaktivierung der Signaltransduktion erfolgt¹⁶. Die Fortschritte in der Charakterisierung der GPCR in den letzten drei Jahrzehnten führten zu der Erkenntnis, dass die GPCR-Regulierung und -Signalisierung viel komplexer ist, als ursprünglich vermutet und dass die Rezeptoren auch einen G-Protein-unabhängigen Signalisierungsweg aufweisen^{7,17,18}.

3.1.2. BEDEUTUNG DER GPCR

Aufgrund des universellen Vorkommens in nahezu jeglichem zellulären Gewebe¹⁹ und der funktionellen Diversität stellen die GPCR eine wichtige und vielversprechende pharmakologische Zielgruppe für die Entwicklung neuer therapeutischer Anwendungen dar. Heutzutage sind schätzungsweise mehr als 50% aller verordneten Arzneimittel zur Behandlung von immunologischen, kardiovaskulären und renalen Krankheiten sowie neurodegenerativen und psychischen Störungen gegen einen GPCR gerichtet¹⁹⁻²¹.

Die Sequenzierung des humanen Genoms führte zu der Identifizierung von etwa 1.000 Genen, die für die GPCR kodieren. Es sind mehr als 800 unterschiedliche GPCR bekannt, davon sind schätzungsweise 460 Geruchsrezeptoren⁸. Die physiologische Funktion einiger nicht-olfaktorischen Rezeptoren ist noch unklar. Diese Rezeptoren (ca. 160¹⁹), von denen weder der Ligand noch die Funktion bekannt sind, werden als Orphan-GPCR bezeichnet. Das große Interesse der Pharmaindustrie an der Identifizierung neuer Zielproteine für Medikamente führt zu einem kontinuierlichen Prozess der Identifizierung von Liganden und Funktion der nicht-olfaktorischen GPCR²².

Die Arzneimittel im klassischen Sinne beeinflussen Funktion und Expression von Rezeptoren, Ionenkanälen, Transportmolekülen, Enzymen und anderen Proteinen. Innovativen Strategien zielen auf die DNA und mRNA krankheitsverursachender Gene ab²³. Die Identifizierung von niedermolekularen Wirkmolekülen (*low molecular weight*, LMW) in der pharmazeutischen Forschung nimmt stetig an Bedeutung zu. Diese gezielte Beeinflussung von krankheitsrelevanter Proteine in ihrer Funktion durch LMW bezeichnet man als *molecular targeted therapy*²³.

In den letzten zehn Jahren wurden mehrere LMW-Liganden für GPCR identifiziert. Des Weiteren wurde gezeigt, dass diese LMW-Liganden innerhalb der sieben TMH der GPCR binden. Interessant dabei ist, dass die endogenen Liganden bei einigen dieser Rezeptoren (z. B. dem metabotropen Glutamatrezeptor 1 (mGlu1), dem metabotropen γ-Aminobuttersäurerezeptor (γ-Aminobutyric acid receptor; GABA_B-Rezeptor) und LHCGR) an den extrazellulären Schleifen oder dem N-Terminus binden²⁴⁻²⁷. Diese Tatsache eröffnet neue Möglichkeiten für die Entwicklung innovativer Therapeutika.

3.2. GLYKOPROTEINHORMONE UND IHRE REZEPTOREN

Die GPHR bilden eine Subfamilie innerhalb der Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren der GPCR und haben eine lange Entwicklungsgeschichte²⁸. Die endogenen Liganden der GPHR sind ca. 30 kDA große, heterodimere Glykoproteinhormone. Ähnliche Proteine kommen in weit primitiveren Arten wie Anemonen, Würmern und Fischen vor^{29,30}. Die biologische Aktivität der homologen Hormone niederer Wirbeltiere unterscheidet sich aber oft von denen der Säugetiere³¹. Zu den humanen Glykoproteinhormonen zählen das follikelstimulierende Hormon (FSH), das humane Choriongonadotropin (hCG), das lutelinisierende Hormon (LH) und das Thyreoida-stimulierende Hormon (TSH). Die β-Untereinheiten von Glykoproteinhormonen und die GPHR werden auf paralogenen Genen kodiert³².

3.2.1. GLYKOPROTEINHORMONE: STRUKTUR UND FUNKTION

Die Glykoproteinhormone bestehen aus zwei nicht-kovalent gebundenen Polypeptidketten, die als α - und β -Untereinheit bezeichnet werden. Innerhalb der Spezies ist die α -Untereinheit allen Glykoproteinhormonen gemeinsam. Die β -Untereinheit ist für den jeweiligen Rezeptor spezifisch. Die Sequenzhomologie der β -Untereinheit humaner Glykoproteinhormone liegt für TSH, LH und FSH bei 40% und zwischen den Hormonen LH und CG sogar bei 80%³³. Ein wesentlicher Unterschied zwischen LH und CG besteht in vier potentiellen O-Glykosylierungsstellen der CG- β -Untereinheit und einem verlängerten C-Terminus des CG³⁴. Die Untereinheiten für sich allein besitzen eine geringe oder keine biologische Aktivität³¹.

Im rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) durchlaufen die Hormone verschiedene posttranslationale Modifikationen. Es gibt Hinweise, dass die nicht-kovalente Bindung der α - und β -Untereinheit schon im rauen ER beginnt³⁵⁻³⁷. Weitere Modifikationen, wie die Sulfatierung und alle O-Glykosylierungen finden im Golgi-Apparat statt^{31,38}.

Die Glykoproteinhormone zirkulieren im Blut als eine Mischung von Isoformen. Die Heterogenität basiert auf den variablen Oligosaccharid-Verzweigungen und terminaler Sulfatierung (bei TSH und LH). Mehrere Studien haben gezeigt, dass der glykosylierungsabhängige Polymorphismus der Glykoproteinhormone eine wichtige physiologische Auswirkung hat und verschiedene Glykoformen selektiv unterschiedliche Signalwege aktivieren³⁹. Die Hormone werden in allen Wirbeltieren von der Hirnanhangdrüse sekretiert und kommen außerdem in den Plazentazellen von Primaten und den Vertretern der Familie *Equidae* vor³¹.

Glykoproteinhormone zusammen mit ihren Rezeptoren, dem Follikel-stimulierenden Hormon Rezeptor (FSHR), dem Rezeptor für das Iuteinisierende Hormon und Choriogonadotropin (LHCGR) und dem Thyreoidea-stimulierenden Hormon Rezeptor (TSHR), sind wichtige Regulatoren der Reproduktion und des Metabolismus^{31,39-42}.

Die humanen FSHR und LHCGR sind ein Teil der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse und spielen physiologisch eine essentielle Rolle in der Reproduktion. Während die Follikel-Reifung im Ovar der Frau über FSHR und das Hormon FSH gesteuert wird, ist LHCGR, aktiviert durch LH, für die Progesteronproduktion, Ovulation, Luteinisierung und Bildung des *Corpus luteums* zuständig⁴³. Die Aktivierung von LHCGR durch CG erfolgt nur während der Schwangerschaft und ist durch die Aufrechterhaltung des erhöhten Progesteronspiegels für die Erhaltung der Schwangerschaft verantwortlich. Die LHCGR-Aktivierung durch LH stimuliert beim Mann die Testosteronproduktion und die Spermato-genese. Der negative Rückkopplungsmechanismus wird durch Östrogen bzw. Testosteron vermittelt⁴³.

TSH und TSHR sind Schlüsselproteine in der Regulation der Schilddrüsenaktivität. Die Stimulation des TSHR durch TSH führt zur Synthese und Sekretion der peripheren Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (T_3) und Thyroxin (T_4) und wird durch die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse kontrolliert ⁴⁴. Ein konstanter Hormonspiegel ist durch den negativen Rückkopplungsmechanismus reguliert. Die Hormone T_3 und T_4 wirken hemmend auf die Produktion von TSH ⁴⁵.

3.3. TSHR

TSHR ist ein Mitglied der Subfamilie der GPHR innerhalb der Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren (Familie A) der GPCR. Das Gen des humanen TSHR ist auf dem Chromosom 14q31 lokalisiert und kodiert für ein 764 Aminosäuren großes Protein ^{46,47}. Die Sequenz umfasst zehn Exons und neun Introns. Die große N-terminale Ektodomäne wird durch die ersten neun Exons des Gens kodiert. Exon zehn kodiert für die gesamte transmembranäre Domäne und den C-Terminus ^{48,49}.

3.3.1. DIE TOPOLOGIE UND STRUKTUR DES TSHR

Der TSHR ist ein ca. 87 kDa großes Protein und kann strukturell in eine N-terminale Ektodomäne (Aminosäurereste 1 bis 410), eine transmembranäre Serpentindomäne mit sieben Transmembranhelizes, drei extrazellulären Schleifen und drei intrazellulären Schleifen (Aminosäurereste 411 bis 680) und in eine C-terminale intrazelluläre Domäne (Aminosäurereste 681 bis 764) eingeteilt werden ⁴⁸. Der TSHR durchläuft posttranslationale Modifikationen. Zu den allgemeinen posttranslationalen Modifikationen wie Palmitoylierung, Sulfatierung, Glykosylierung und Phosphorylierung kommt die proteolytische Spaltung der Ektodomäne ⁵⁰. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierung des TSHR eine wichtige Rolle bei der Signalisierung einnimmt ⁵¹.

Der TSHR nimmt eine wichtige physiologische Rolle im menschlichen Körper ein und ist das Zielprotein einer Vielzahl von therapeutischen Ansätzen.

3.3.2. DIE EKTODOMÄNE

Die extrazelluläre Domäne ist charakteristisch für alle GPHR und wird strukturell in die Leucine-Rich Repeat Domäne (LRRD) und die Hinge Region eingeteilt. Die Hinge Region verbindet die LRRD mit der ersten TMH der Serpentine-Domäne (SD) ^{52,53}. Die LRRD besteht aus der Cysteinbox 1 (Cb1) und dem LRR-Motiv, das zehn Wiederholungen mit β -Faltblatt-Stuktur aufweist.

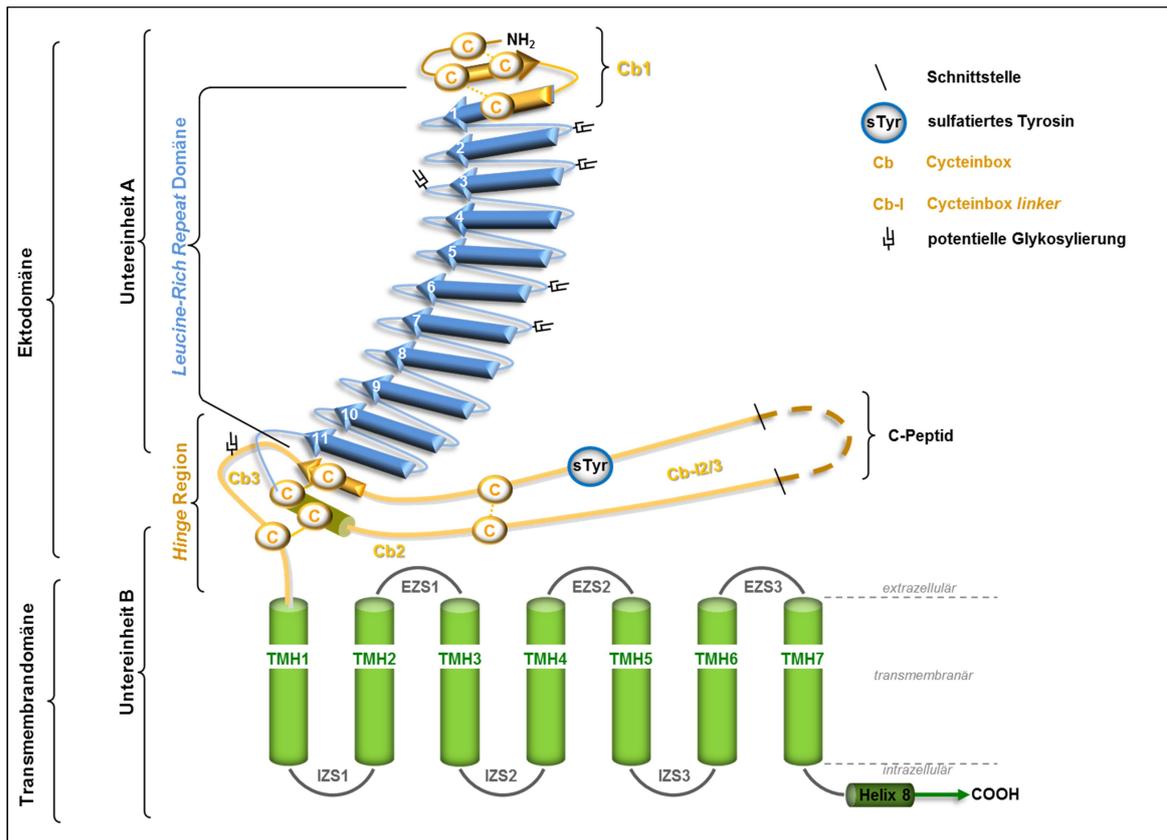


Abbildung 3-1: Strukturschema des TSHR. Die Ektodomäne ist strukturell unterteilt in die Cysteinebox 1, 11 *Leucin-Rich Repeats* und die Hinge Region. Die Hinge Region setzt sich aus Cysteinebox 2, Cysteinebox 3, Cysteinebox linker und dem TSHR-spezifischen, abspaltbarem C-Peptid zusammen. Die Ektodomäne enthält sechs potentielle N-Glykosylierungsstellen und eine Sulfatierung. Die proteolytische Spaltung des C-Peptids teilt den Rezeptor in eine A- und B-Untereinheit, die über die Disulfidbrücken verbunden bleiben. Die Transmembrandomäne besteht aus sieben transmembranären Helizes (TMH 1-7), die über drei extrazelluläre Schleifen (EZS 1-3) und drei intrazelluläre Schleifen (IZS 1-3) miteinander verbunden sind. Eine achte α -Helix liegt intrazellulär parallel zur Membran.

Die *Hinge Region* besteht aus den Cysteineboxen 2 und 3 (Cb2 und Cb3), die über den Cysteinebox linker (Cb-I2/3) miteinander verbunden sind⁵⁴. Zusammen sind die LRRD und die *Hinge Region* für die Liganden-Erkennung, Liganden-Bindung sowie Signalweiterleitung an die TMH verantwortlich⁵⁵⁻⁵⁷.

Die Ektodomäne des TSHRs wird posttranslational modifiziert. Dies umfasst die Bildung von Disulfidbrücken, Glykosylierung, Palmitoylierung und Spaltung des Peptidfragmentes (C-Peptid). Die proteolytische Spaltung des C-Peptids ist TSHR spezifisch und findet im Bereich der Cb2 und Cb3 statt⁵⁰. Dadurch entstehen zwei Untereinheiten des Rezeptors, eine A- und eine B-Untereinheiten. Die beiden Untereinheiten sind über die Disulfidbrücken zwischen den Cb2 und Cb3 verbunden^{58,59}. 30% bis 40% der molekularen Masse der Ektodomäne sind auf die Anfügung von N-Glykosylierungen zurückzuführen. Beim TSHR findet man den komplexen und den mannosereichen Typ der N-gebundenen Oligosaccharide. Es sind sechs potentielle N-Glykosylierungsmotive an den Positionen N77,

N99, N113, N177, N198 und N302 für den TSHR beschrieben. Die Mutagenesestudien haben gezeigt, dass die Glykosylierung an N77 und N113 essentiell für die korrekte Oberflächenexpression und für die Rezeptorfunktion sind⁶⁰. Nagayama *et al.* konnten zeigen, dass die nicht glykosylierte Form des TSHR komplett funktionslos ist⁶¹. Dem Tyrosin an der Position 385 wird ein Sulfatrest angefügt⁶².

Für einen Teil der extrazellulären Domäne ist eine Kristallstruktur verfügbar⁶³. Im Jahre 2007 konnte die Arbeitsgruppe B. R. Smith TSHR im Komplex mit einem aktivierenden Autoimmunantikörper⁶³ kristallisieren und im Jahre 2011 gelang eine TSHR-LRRD-Kristallstruktur im Komplex mit einem blockierenden Autoimmunantikörper⁶⁴. Diese Strukturen zeigen, dass die LRRD eine sensenförmige Struktur mit einem hydrophoben Kern aus aromatischen Aminosäuren einweist⁵³.

Für den nicht kristallisierten Teil der N-terminalen extrazellulären Region (LRRD und Hinge Region) des TSHR greift man auf homologe Computermodelle zurück⁶⁵, die auf der Komplexkristallstruktur der N-terminalen extrazellulären Region des FSHR mit seinem Hormon FSH basieren⁶⁶.

3.3.2.1. DIE TRANSMEMBRANDOMÄNE

Die Transmembrandomäne des TSHR besteht wie bei allen GPCR aus sieben transmembranären Helizes (TMH), die jeweils durch drei extrazelluläre Schleifen (EZS) und drei intrazelluläre Schleifen (IZS) verbunden sind. Die TMH der GPHR weist eine hohe Sequenzhomologie von ca. 70% auf. Die größte Variabilität ist in EZS und IZS zu finden. Die Transmembrandomäne übernimmt zwei wichtige Funktionen. Zum einem ist diese Domäne für die Weiterleitung des extrazellulären Signals und die Aktivierung des G-Proteins verantwortlich, zum anderen ist es eine orthosterische Bindungsstelle vieler GPCR³².

Innerhalb der Familie A der GPCR bilden die GPHR eine Ausnahme, da deren orthosterische Bindungsstelle am großen N-Terminus zu finden ist. Für alle GPHR wurde eine allosterische Bindungstasche innerhalb der Transmembrandomäne beschrieben⁶⁷. Die systematische Charakterisierung der Aminosäuren mittels zielgerichteter Mutagenese innerhalb der transmembranären Bindungstasche des TSHRs führte zu der Identifizierung konstitutiv aktivierender und inaktivierender Aminosäurepositionen^{68–70} (Kapitel 3.3.2.1.1). Die gewonnenen Daten zu den Eigenschaften der allosterischen Bindungstasche bieten einen innovativen therapeutischen Ansatz für die Entwicklung neuer Medikamente (Kapitel 3.6).

Die Bindung des endogenen Hormons, TSH, an die große extrazelluläre orthosterische Bindungsstelle führt zu einer Rezeptoraktivierung durch die Konformationsänderung der

Transmembrandomäne^{52,71}. Die Signalübertragung führt von den EZS auf die TMH und damit zu einer intrazellulären Interaktion mit dem heterotrimeren G-Protein (Kapitel 3.3.3). Eine besondere Rolle während der Aktivierung wird der TMH3, der TMH5 und der TMH6 zugeordnet. Anhand der Kristallstrukturen wurde hier die größte relative räumliche Verschiebung der Helizes zueinander beobachtet⁷².

Die Transmembrandomäne des TSHR weist verschiedene bekannte Sequenzmotive der GPCR auf. Das NPXXY-Motiv (N674^{7,49} beim TSHR) der TMH7 und das [D/E]R[Y/W]-Motiv am Übergang zwischen TMH3 und der IZS2 stehen im Zusammenhang mit dem Rezeptoraktivierungsmechanismus und der Signalübertragung auf die G-Proteine^{73,74}. Das Tryptophan an Position 6.48 ist eine hochkonservierte Aminosäure in GPCR. Dieser Aminosäure wird eine zentrale Bedeutung während der transmembranären Signalweiterleitung zugeschrieben³. Im TSHR, ebenso wie in den anderen GPHR, befindet sich jedoch ein Methionin an dieser Position. Die experimentellen Daten zeigten, dass der Austausch vom Methionin zu einer konstitutiven Aktivierung des TSHR führt⁶⁸. Demnach erfüllt diese Position im TSHR eine vergleichbare Funktion wie Tryptophan in GPCR (Kapitel 3.3.2.1.1).

Die dreidimensionalen Homologiemodelle der transmembranären Domäne des TSHR basieren auf den Strukturen von bovinem Rhodopsin (inaktive Konformation) und Opsin (aktivierte Konformation)⁶⁸⁻⁷⁰ und wurden von Gunnar Kleinau (FMP Berlin) erstellt⁶⁹. Das Homologiemodell stellt ein Hilfsmittel zur Struktur-Funktionsanalyse und für die Aufklärung molekularer Aktivierungsmechanismen dar, und ermöglicht damit die Interpretation und Visualisierung der funktionellen Daten.

3.3.2.1.1. AKTIVIERENDE UND INAKTIVIERENDE MUTATIONEN INNERHALB DER TSHR-TRANSMEMBRANDOMÄNE

Der Fokus meiner Diplomarbeit und der Dissertation von Ann-Karin Hass lag auf der funktionellen Charakterisierung der Aminosäuren, die die TSHR-Bindungstasche auskleiden und das *Interface* zwischen TMH5 und TMH6 bilden. Dabei wurden unterschiedliche Arten von Mutationen identifiziert, die konstitutiv aktivierenden (*constitutively activating mutation*, CAM) und die inaktivierenden Mutationen. Zudem konnte deren räumliche Verteilung innerhalb der Bindungstasche im TSHR eingegrenzt werden^{68,70}. Diese signalisierungssensitiven Positionen stellen potenzielle Interaktionspunkte der allosterischen Liganden dar. Die Wildtyp-Aminosäuren, die bei einem Aminosäureaustausch eine konstitutive Aktivierung zur Folge haben, spielen eine Schlüsselrolle bei der Stabilisierung der basalen Rezeptorkonformation. Diese Mutationen deuten auf potentielle Kontaktpunkte des Rezeptors mit einem Agonisten hin^{68,70}. Die Verteilung der CAM innerhalb der Bindungsregion ist unterschiedlich. So befinden sich die CAM an mehreren Helizes: V421^{1,39}

(TMH1), Y466^{2.56}A (TMH2), T501^{3.32}A (TMH3), L587^{5.44}V (TMH6), M637^{6.48}C (TMH6), M637^{6.48}W (TMH6), S641^{6.52}A (TMH6), Y643^{6.54}F (TMH6), L645^{6.56}V (TMH6) und Y667^{7.42}A (TMH7). Der Austausch des Methionins (M637^{6.48}) gegen Tryptophan in der TMH6 führt zu einem signifikanten Effekt auf die Wechselwirkung des Rezeptors mit dem Agonisten. An dieser Position wurde auch die stärkste konstitutive Aktivierung innerhalb der TMH des TSHR gefunden^{68,75}. Die meisten der GPCR haben ein Tryptophan an dieser Position, für das gezeigt wurde, dass es an der Rezeptoraktivierung direkt beteiligt ist. Anhand dieser Daten kann man annehmen, dass M637^{6.48} sowohl an der Stabilisierung der basalen als auch an der aktiven Konformation des Rezeptors beteiligt ist^{3,68}. Die Wechselwirkung an dieser sensitiven Position hat eine Rezeptoraktivierung zur Folge. Daraus resultiert, dass diese Position einen potentiellen Interaktionspartner des Agonisten darstellt und der Antagonist diese Position meiden sollte.

Des Weiteren führte die Charakterisierung der allosterischen Bindungstasche des TSHR zur Identifizierung von zwei lokalen Ansammlungen (Cluster I und Cluster II) der inaktivierenden Mutationen. Diese Mutationen führen zu der Abnahme der Basalaktivität und sind potentielle Kontaktpunkte des Antagonisten⁶⁹. Cluster I ist zwischen den Aminosäuren V502^{3.33} (TMH3), L552^{4.56} (TMH4), Y582^{5.39} (TMH5) und M572 am EZS2 lokalisiert. Die inaktivierenden Mutationen im EZS2 wurden bereits beschrieben⁷⁶. Die Aminosäuren V424^{1.42} (TMH1), L467^{2.57} (TMH2) und L665^{7.40} (TMH7) bilden den Cluster II aus⁷⁰. Die Ansammlung konstitutiv inaktivierender Mutationen in diesen Bereich des Rezeptors weist auf ihre Bedeutung bei der Aufrechterhaltung des basal aktiven Zustandes hin.

Zusammengenommen stellen alle diese signalisierungssensitiven Aminosäuren (zusammengefasst unter www.SSFA-GPHR.de⁷⁷) potentielle Interaktionspartner dar, an denen ein LMW-Ligand den Rezeptor entweder in eine inaktivere oder eine aktivere Konformation bringen kann. Dabei markieren die CAM-Interaktionspartner für Agonisten und inaktivierende Mutationen markieren die Interaktionspartner für Antagonisten.

Es wurde bereits gezeigt, dass die Einführung nur einer Mutation innerhalb der transmembranären Bindungstasche die Wirkung eines Liganden grundsätzlich ändern kann. So konnte der Austausch einer einzelnen Aminosäure (Y667^{7.42}A) die antagonistische Wirkung von *compound* 52 in einen agonistischen Effekt umwandeln⁷⁸. Die Umschaltung des Effektes von Antagonismus zu Agonismus und umgekehrt ist durch kleine Moleküle selbst oder durch den Austausch der Aminosäuren, die die Bindungstasche auskleiden, möglich. Diese detaillierten Kenntnisse über unterschiedliche Pharmakophore bilden die Grundlage für eine rationale Optimierung neuer hochaffiner Antagonisten, die die pathologische Aktivierung des TSHR beeinflussen⁷⁸.

3.3.2.2. DER INTRAZELLULÄRE C-TERMINUS

Der intrazelluläre C-Terminus des TSHR besteht aus einer 18 Aminosäuren langen intrazellulären Helix 8 (676 bis 694) und weiteren 69 Aminosäuren (695-764), die keine Struktur aufweisen. Die Helix 8 hat ein Palmitoylierungsmotiv am Cystein 699⁷⁹.

Der ungefaltete Abschnitt des C-Terminus weist mehrere potenzielle Phosphorylierungsstellen (Thr₆₀₇-Val-Arg; Lys-Asp-Thr₆₂₀-Lys; Ser₆₉₄-Lys; Lys-Asn-Ser₇₁₆-Thr₇₁₇, Lys-Val-Thr₇₂₅ und Thr₇₄₈-Pro-Lys-Lys) auf. Diese können durch Serin/Threonin-Kinasen sowie Proteinkinase A (PKA) bzw. Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert werden^{80,81}. Die Rezeptor-Phosphorylierung ist ein universeller Mechanismus zur Regelung der stimulusabhängigen Rezeptorfunktion und steht im Zusammenhang mit dem Prozess der Rezeptordesensibilisierung durch die Bindung von β -Arrestin^{1,81,82}. TSHR bindet vorwiegend an β -Arrestin 2, aber auch an β -Arrestin 1 und wird anschließend internalisiert^{83,84}.

3.3.3. AKTIVIERUNG UND SIGNALISIERUNG DES TSHR

Die Bindung des endogenen Liganden (TSH) an die extrazelluläre Domäne des TSHR hat die relative räumliche Verschiebung der Helizes, insbesondere TMH3, TMH5 und TMH6, zueinander zur Folge⁷². Die Aktivierung verursacht eine strukturelle Konformationsänderung innerhalb des Rezeptors. Die Signalweiterleitung erfolgt über die extrazellulären Schleifen und die TMH bis an den intrazellulären Bereich und führt zur Ausbildung einer aktiven Rezeptorstruktur. Die Änderung in der Rezeptorkonformation hat die Aktivierung des G-Proteins zur Folge⁸⁵.

Die Arbeitsgruppe von Basil Rapoport lieferte im Jahre 1990 die ersten Informationen über die Bedeutung der zytoplasmatischen Schleifen des TSHR auf die Signaltransduktion. Mittels Mutagenesestudien wurden die Aminosäuren innerhalb der zytoplasmatischen Schleifen identifiziert, die einen Einfluss auf die TSH-Bindung, die G-Protein-Kopplung und die Signaltransduktion haben (ZS1: 441-450; ZS2: 528-537; ZS3: 617-625)⁸⁶.

Der TSHR interagiert mit den G-Protein-Familien $G\alpha_s$, $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_i$ und $G\alpha_{12/13}$ ⁸⁷. Die Aktivierung von $G\alpha_s$ führt über die Stimulation der Adenylylcyclase zu einer Produktion des intrazellulären cAMP und zur Aktivierung der Proteinkinase A. Die $G\alpha_s$ -Signalkaskade ist an der Regulation der Differenzierung und der Proliferation der folliculären Schilddrüsenzellen beteiligt und wirkt stimulierend auf die Iodaufnahme und Hormonsekretion der Schilddrüsenzellen⁸⁸. Die Stimulation von $G\alpha_{q/11}$ führt zur Aktivierung der Phospholipase C und zur Produktion von Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP₃). Die $G\alpha_{q/11}$ -Signalkaskade ist für die Produktion und Iodierung der Schilddrüsenhormone und des Vorläuferproteins Thyroglobulin verantwortlich^{89,90}. Im Jahr 2008 konnten Büch und Kollegen eine cAMP-unabhängige Aktivierung von $G\alpha_{13}$ der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase-(MAPK)-

Kaskade in humanen Thyreozyten zeigen⁹¹. Jedoch konnte die biologische Bedeutung für die Signalisierungswege über G_{α_i} und $G_{\alpha_{12/13}}$ bis jetzt nicht eindeutig geklärt werden.

Neumann *et al.* konnte 2005 zeigen, dass an der G-Protein-Kopplung beteiligte Aminosäuren in erster Linie zwischen TMH3/IZS2, TMH5/IZS3 und IZS3/TMH6 lokalisiert sind. Darüber hinaus hat die Arbeitsgruppe herausgefunden, dass der C-terminale Bereich der TMH3 (I523^{3,54}-T524^{3,55}) und der zentrale Abschnitt der IZS2 (F525-D530) an der Aktivierung von sowohl G_s - als auch G_q -Protein im TSHR beteiligt ist. Das Methionin an der Position 527 im IZS2 scheint dagegen für eine selektive G-Protein-Aktivierung verantwortlich zu sein. Der Austausch vom Methionin gegen Alanin führt zum Verlust der Aktivierung der G_q -abhängigen Phospholipase C. Die G_s -vermittelte cAMP-Bildung bleibt erhalten⁹².

3.3.4. DIE PHYSIOLOGISCHE ROLLE DES TSH UND DES TSHR

Das TSH und der TSHR sind entscheidend für die Entwicklung, das Wachstum und die Funktion der Schilddrüse. Unter physiologischen Bedingungen steuert der TSH die TSHR-Aktivierung. Der TSHR wird hauptsächlich in der basolateralen Membran der Follikel-epithelzellen exprimiert^{39,89}. TSHR-Expression wurde auch in nicht thyreoidalem Gewebe und Zellen nachgewiesen, z. B. in Lymphozyten, im Thymus, in der Hypophyse, in den Hoden, in den Nieren, im Gehirn, in den Knochen, in Fettzellen und Fibroblasten⁹³. Die physiologische Funktion des TSHR in diesen Geweben ist noch weitgehend ungeklärt.

In Follikel-epithelzellen bewirkt die TSHR-Aktivierung durch TSH eine beschleunigte Teilung der Schilddrüsenzellen, eine vermehrte Iodaufnahme und eine gesteigerte Bildung der iodhaltigen Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 . Im Rahmen des thyreotropen Regelkreises hemmen die Schilddrüsenhormone durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus die Produktion und Ausschüttung von TRH aus dem Hypothalamus und von TSH aus dem Hypophysenvorderlappen. Auf diese Weise werden konstante und bedarfsadaptierte Konzentrationen der Schilddrüsenhormone im Blut erreicht.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass das TSH eine Funktion als Schutzfaktor für die Schilddrüsenzellen vor Apoptose ausübt. Darüber hinaus spielt das TSH eine entscheidende Rolle bei der Ontogenese³⁹.

Mutationen im TSHR führen oft zu einer Störung der Schilddrüsenfunktion. Je nach der Art der Mutation sind schwere physiologische Störungen die Konsequenz.

3.4. MORBUS BASEDOW UND DIE ENDOKRINE ORBITOPATHIE (EO)

Die Prävalenz der Schilddrüsenüberfunktion bzw. -unterfunktion nimmt mit höherem Alter zu und tritt bei Frauen 2-8 mal häufiger als bei Männern auf⁹⁴. Die jährliche Inzidenz be-

trägt 0,4% bei Frauen und 0,1% bei Männern, wobei die altersspezifische Inzidenz variiert.

Bei Morbus Basedow werden Autoantikörper gegen TSHR gebildet. Im Blutserum der Morbus Basedow-Patienten wurde eine Mischung aus aktivierenden und blockierenden Autoantikörpern vorgefunden. Sanders *et al.* konnten zeigen, dass die Autoantikörper die TSH-Bindung am TSHR nachahmen und auf eine vergleichbare Art und Weise den Rezeptor aktivieren. Durch die Bindung der Antikörper wird der TSHR dauerhaft stimuliert. Die dadurch verursachte Hyperthyreose entzieht sich der Hypothalamus-Hypophysen-Kontrolle. Die gesteigerte Schilddrüsenhormonproduktion führt zu einer Vielzahl von Symptomen. Zur Therapie werden Thiourazilderivate eingesetzt, welche die Synthese der Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 senken und auf ein normales Maß regulieren. Diese Substanzen haben keinen Einfluss auf Symptome, welche im extrathyreoidalen Gewebe ausgelöst werden. Ein Beispiel hierfür stellt die EO dar, welche zurzeit nur symptomatisch mit Tränenersatzflüssigkeit, Kortikosteroiden oder durch chirurgische Eingriffe behandelt werden kann. Bis heute ist keine kausale Therapie vorhanden.

Die EO tritt häufig, jedoch nicht ausschließlich, bei Patienten mit Morbus Basedow auf⁹⁵. Nur ca. 30-40% aller Morbus Basedow-Patienten haben eine klinisch manifestierte EO. Zum Zeitpunkt der EO-Diagnose sind ca. 5-10% der Patienten nicht an Morbus Basedow, sondern an anderen Autoimmunthyreopathien erkrankt. Die TSHR-Aktivierung durch die Antikörper in orbitalen Fibroblasten (OF) führt zu einer erhöhten Zellproliferation sowie zur Ausdifferenzierung der OF zu Adipozyten. Dadurch ist ein Umbau und die Volumenzunahme des orbitalen Bindegewebes verbunden, was wiederum einen Exophtalmus zu Folge hat⁹⁶⁻⁹⁸. Diese Merkmale sind charakteristisch für die EO und gehen oft mit einem Elastizitätsverlust der Augenmuskeln, mit Bewegungseinschränkungen und Doppelbildern einher.

3.4.1. TSHR ALS AUTOANTIGEN IN DER EO

Klinische und experimentelle Studien, die in den letzten 20 Jahren durchgeführt wurden, haben zu der Erkenntnis geführt, dass Autoimmunreaktionen gegen den TSHR eine der Hauptursachen der EO darstellen⁹⁹. Der Nachweis der TSHR-Expression (mRNA und Protein) in nicht thyreoidalem Gewebe stützte diese Hypothese^{96,97}. Ende der Neunzigerjahre zeigten Smith und Kollegen, dass eine Subpopulation der OF in der Lage ist, zu Adipozyten auszudifferenzieren⁹⁸. Im Gegensatz dazu wurde keine Ausdifferenzierung bei dermalen und perimysialen Fibroblasten beobachtet. Demnach gibt es aktive Präadipozyten im Orbitalgewebe der EO-Patienten, die in der Lage sind, die Ausdifferenzierung zu Adipozyten zu durchlaufen, was das überschüssige orbitale Fettgewebe in EO-Patienten erklären könnte⁹⁸. Weitere Studien führten zur Erkenntnis, dass die Autoim-

munreaktion in EO in erster Linie gegen OF und nicht gegen Augenmuskelzellen gerichtet ist ¹⁰⁰.

Die Entwicklung allosterischer Liganden, die direkt an der Ursache, also am TSHR, angreifen, könnte als kausaler therapeutischer Ansatz die therapeutische Lücke schließen.

3.5. TRANSMEMBRANÄRE BINDUNGSTASCHE UND ALLOSTERISCHE LIGANDEN

Aufgrund einer gemeinsamen Topologie aller GPCR der Familie A wurde angenommen, dass alle Rezeptoren dieser Superfamilie eine gemeinsame Ligandenbindungsstelle haben. Nachfolgende Analysen haben gezeigt, dass dies nicht der Fall ist und Liganden, abhängig von ihrer Größe und chemischen Natur, an verschiedenen Stellen des Rezeptors binden und als Agonisten bzw. Antagonisten wirken können ^{101,102}.

Die erste hochauflösende Röntgenkristallstruktur des Rhodopsin-Rezeptors der inaktiven Konformation lieferte nicht nur die Bestätigung über die allgemeine Topologie der GPCR, sondern auch detaillierte Erkenntnisse über die Lokalisation des Liganden Retinal innerhalb des TMH-Bündels ^{5,103,104}. So wurde erstmals am Rhodopsin gezeigt, dass die β -Faltblatt-Struktur der EZS2 vollständig über der Liganden-Bindungstasche des Retinals liegt ³. Es ist immer noch unklar, inwieweit EZS2 eine ähnliche Funktion in anderen Rezeptoren übernimmt. Eine weitere wichtige Erkenntnis jedoch war, dass EZS2 durch konservierte Disulfidbrücke kovalent an den N-terminalen Bereich der TMH3 gebunden ist. Die Interaktion des Liganden mit den Cysteinen des EZS2 wurde für weitere GPCR, unter anderem auch für Monoaminrezeptoren, gezeigt ^{105,106}.

Die Forschung in der Strukturbiologie ergab, dass viele kleine Liganden wie Retinal, Katecholamine oder kleine Peptide ihre Bindungsstelle im Inneren der Transmembrandomäne der jeweiligen Rezeptoren haben. Eine Ausnahme bildet beispielsweise die Familie der GPHR ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

Das Verständnis der Funktion von GPCR auf molekularer Ebene war und ist ein wichtiges Ziel der Grundlagenforschung. Die rasante Entwicklung in der Strukturbiologie der GPCR und die Kristallisierung weiterer GPCR eröffneten neue Möglichkeiten zur Charakterisierung der transmembranären Bindungstasche ¹⁰⁹. Die Kristallstrukturen der GPCR fungieren als wichtiges Werkzeug zu Erstellung von Homologiemodellen noch nicht kristallisierter Rezeptoren. Die Kombination aus computergenerierten Modellen vieler GPCR und experimenteller Verifizierung führte zur Identifizierung einer Reihe von Interaktionen zwischen Ligand und Rezeptor. Dieser iterative bidirektionale Ansatz erwies sich als ein sehr leistungsfähiges Konzept. Die computergenerierten Modelle wurden basierend auf experimentellen Ergebnissen verfeinert und verbessert ¹⁰⁷.

Weiteren Aufschluss über die pharmakologische Beziehung zwischen Liganden und Rezeptoren der Familie A der GPCR wurde durch eine detaillierte Analyse aller im Jahr 2009 verfügbaren Kristallstrukturen von Gloriam *et al.* gegeben. Unter Berücksichtigung des evolutionären Einflusses wurden 44 Aminosäurepositionen identifiziert, die an der Ligandenbindung beteiligt sind. Das resultierende Dendrogramm führte zu der Rezeptorgruppierung in Abhängigkeit von der Art der Liganden. Diese Ergebnisse lassen auf ein allgemeines Paradigma für das Verständnis der Liganden-Pharmakologie und dem Liganden-Selektivitätsprofil der Familie A schließen. Diese Erkenntnisse haben ein breites Anwendungsspektrum auf dem Gebiet der Medikamentenentwicklung für GPCR ¹⁰⁹.

Im Gegensatz zu vielen anderen GPCR der Familie binden die endogenen Liganden der GPHR an die große N-terminale Domäne. 2006 haben Jäschke und Kollegen eine Bindungsregion für kleine Moleküle innerhalb der Transmembrandomäne nahe des EZS2 auch für die GPHR abgeleitet ⁶⁷. Es folgte die Identifizierung allosterischer Liganden für FSHR und LHCGR. Dass die kleinen Moleküle an eine andere allosterische Bindungsstelle innerhalb der TMH binden, wurde durch experimentelle Befunde unterstützt. So wurde ein kleines Molekül als Agonist für FSHR identifiziert, der nicht in der Lage war gebundenes FSH zu verdrängen ¹¹⁰. Weiterhin wurde ein Agonist des LHCGR (org41841 bzw. org42599) beschrieben, welcher nicht mit radioaktiv markiertem LH um die orthosterische Bindungsstelle an der Ektodomäne konkurriert ^{111,112}.

3.6. ALLOSTERISCHE LIGANDEN DES TSHR

Die Identifizierung der transmembranären Bindungsregion für GPHR führte zu einer gezielten Suche nach LMW-Liganden für Mitglieder dieser Familie.

Das erste identifizierte allosterisch bindende Molekül für TSHR wurde ursprünglich als ein Agonist für LHCGR entwickelt. Molekulares Modelling und funktionelle Experimente führten zu der Entwicklung des ersten partiellen Agonisten mit geringer TSHR-Affinität (org41841) ⁶⁷ sowie zu einer auf TSHR antagonistisch wirkenden Substanz NIDDK/CEB-52 (*compound* 52, c52). Diese Substanz zeigt keine Aktivität am FSHR, ist aber ein partieller Agonist für LHCGR ²⁶.

2008 wurden in Folge eines Hochdurchsatzverfahrens (*High-Throughput-Screening*, HTS) in der Arbeitsgruppe von C.P. Austin vier potentielle, auf TSHR agonistisch wirkende Substanzen identifiziert ¹¹³. Im Jahre 2009 wurde in der Arbeitsgruppe von M. Gershengorn ein TSHR-Agonist, *compound* 2 (NCGC00161870–01) identifiziert und charakterisiert ⁷⁵. Es handelt sich um einen hochaffinen und selektiven Agonisten, der sowohl *in vitro* als auch *in vivo* TSHR aktiviert. Die Testung der Substanz an einem verkürzten TSHR-Konstrukt (TSHR-KFLR), dem die komplette N-terminale Domäne fehlte, führte zu

einer konzentrationsabhängigen Aktivierung des TSHR. Asparagin (N5.47) in TMH5 wurde als ein Interaktionspartner von *compound 2* identifiziert. Der Austausch des Asparagins durch ein Alanin an dieser Position führt zu einer kompletten Deaktivierung des TSHR. Des Weiteren hat die Stimulation der Thyreozyten (isoliert aus Patienten) mit *compound 2* eine signifikante Zunahme von Thyreozyten-spezifischen Proteinen zur Folge. Diese Daten stützen die Schlussfolgerung, dass *compound 2* in einer Tasche der TSHR-Transmembrandomäne bindet^{75,114}.

Im Jahr 2010 wurde ein inverser Agonist, genannt 1 (NCGC00161856; 2-(3-((2,6-dimethylphenoxy)methyl)-4-methoxyphenyl)-3-(furan-2-ylmethyl)-2,3-dihydroquinazolin-4(1H)-one), für TSHR beschrieben. Dieser Agonist hemmt die basale Signalisierung nicht nur beim wildtypischen TSHR, sondern auch bei vier konstitutiv aktiven (pathologischen) Rezeptormutanten (M453^{2,43}T; F631^{6,42}I; I568T im EZS2; S281N in LRR11)¹¹⁵.

Im Jahre 2011 wurde die Substanz Org274179-0 als nanomolarer Antagonist (*Inhibitory Concentration*; IC₅₀-Wert liegt bei 17nM) für TSHR publiziert¹¹⁶. Diese stereoisomere Substanz zeigt eine inhibitorische Wirkung auch am FSHR und ist somit nicht selektiv. Bei Einsatz einer 50-fach höheren Konzentration, die notwendig ist, um TSHR zu inhibieren, zeigt die Org274179-0 auch bei dem LHCGR eine Kreuzreaktion (*cross reactivity*). Die Substanz weist die Eigenschaften eines Partialagonisten auf und inhibiert auch die IP₃-Signalkaskade¹¹⁶.

3.7. EFFEKT DER ALLOSTERISCHEN LIGANDEN AM TSHR

Die Substanzen org41841 und c52 weisen die gleiche Grundstruktur der Thienopyrimidine auf. Darauf basierende *in silico* Studien und funktionelle Daten führten zur Identifizierung verschiedener TSHR-Liganden^{115,116}.

Die beiden Moleküle unterscheiden sich durch die Verlängerung der Seitenkette am aromatischen Ring des Antagonisten c52¹¹⁷. Auf der Grundlage des 3D-Homologiemodells des TSHR wurde die Lokalisierung beider Substanzen innerhalb der Transmembrandomäne vorhergesagt. Die Lokalisation der beiden Moleküle unterscheidet sich durch ihre unterschiedliche Orientierung innerhalb der Bindungstasche. Der partielle Agonist org41841 ist in seiner Struktur kleiner und bindet tiefer in der Bindungsregion. Seine Position innerhalb der Bindungstasche ermöglicht eine Interaktion mit dem Methionin an der Position 637^{6,48}, wodurch es zur Rezeptoraktivierung kommt. Dies steht im Einklang mit dem Befund, dass M637^{6,48} ein wichtiger Akteur der Aktivierung ist, da an dieser Position die stärkste konstitutiv aktivierende Mutation gefunden wurde⁶⁸. Im Gegensatz dazu zeigt c52 eine leicht verschobene Lokalisierung innerhalb der transmembranären Bindungstasche. Diese Verschiebung vom c52 ist die Folge der Vergrößerung des Substituenten an

der Phenylgruppe. Darüber hinaus erstreckt sich diese verlängerte Seitenkette in dem Bereich, wo mehrere inaktivierende Mutationen gefunden wurden. In dem Homologiemodell des TSHRs sind die Aminosäuren Y667^{7.42} an der TMH7 als ein potentieller Kontaktpartner für c52 erkennbar. Die Interaktion des c52 mit M637^{6.48} wird durch die Interaktion von c52 mit Y667^{7.42} verhindert.

Infolge einer Aminosäuresubstitution innerhalb der Bindungsregion konnte die antagonistische Wirkung von c52 in einen agnostischen Effekt umgekehrt werden. Die Seitenkettenreduktion des Tyrosins (Y667^{7.42}) durch die Einführung des Alanins an diese Position, löst die sonst bestehende Interaktion zwischen Y667^{7.42} und c52 auf. Dadurch bindet c52 tiefer in der Bindungstasche und kann so eine Interaktion mit M637^{6.48} eingehen. M637^{6.48} ist dafür bekannt, eine Schlüsselrolle während der Rezeptoraktivierung einzunehmen⁶⁸. Diese Ergebnisse bestätigen nicht nur die vorhergesagte transmembranäre Bindungsstelle für c52, sondern liefern Informationen über unterschiedliche Bindungsbereiche für Antagonisten und Agonisten innerhalb der Transmembrandomäne.

Des Weiteren wurde ein Interaktionspartner des partiellen Agonisten org41841 identifiziert und experimentell bestätigt. Der Rezeptor wird durch org41841 nicht aktiviert, wenn die Glutaminsäure (E506^{3.37}) in TMH3 durch Alanin ausgetauscht ist, die TSH-induzierte Rezeptoraktivierung wird dabei jedoch nicht beeinflusst⁶⁷.

3.8. PHARMAKOLOGISCHES POTENTIAL DER ALLOSTERISCHEN LIGANDEN

Die gewonnenen Informationen über die komplementären Eigenschaften der allosterischen Bindungsregion und den kleinen Liganden bilden die Basis zur Optimierung der hochaffinen selektiven Substanzen für den TSHR. Störungen in der physiologischen Regulation des TSHR stehen oft in Verbindung mit pathologischen Mutationen als Auslöser verschiedener Erkrankungen^{118,119}. Die spezifische und potente Kontrolle dieses multifunktionalen Rezeptors durch LMW-Liganden könnte wichtige Fortschritte in der Medizin bringen. So könnten TSHR-Agonisten und -Antagonisten zur Diagnose und Behandlung von Schilddrüsenkrebs, Hyperthyreose, Hypothyreose und Morbus Basedow eingesetzt werden^{93,118}.

Ein spezifischer und selektiver TSHR-Agonist könnte anstelle von rekombinantem humanen TSH (rhTSH) bei Patienten mit Schilddrüsenkrebs oder gutartigen, nicht toxischen nodulären Struma eingesetzt werden. Dies würde wichtige Fortschritte in der Nachkontrolle bei einer Schilddrüsenektomie darstellen¹²⁰. Des Weiteren könnte ein TSHR-Agonist ein möglicher therapeutischer Ansatz bei einer Hypothyreose sein.

Ein hochaffiner Antagonist könnte der TSHR-Aktivierung durch Autoimmunantikörper entgegenwirken und wäre somit ein gezielt einsetzbares Mittel bei Patienten mit EO, für die es bis heute keine Therapie gibt, die direkt die Ursache behebt.

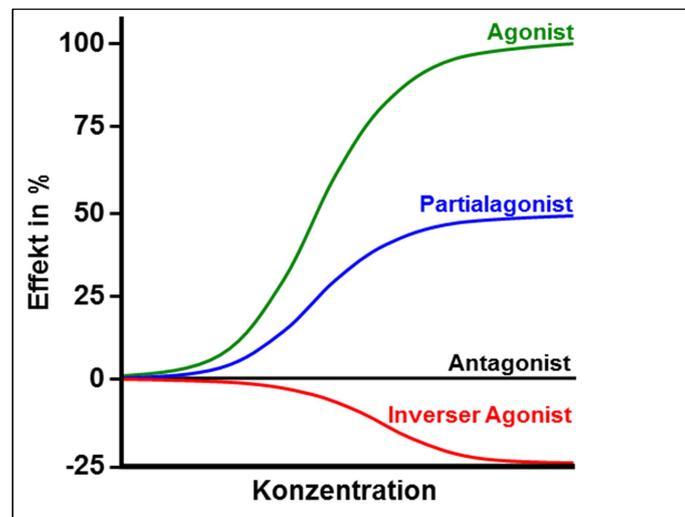


Abbildung 3-2: Konzentrations-Wirkungskurven des Partialagonisten, Antagonisten, inversen Agonisten und vollen Agonisten.

Ein inverser Agonist wäre als therapeutischer Ansatz zur Behandlung einer nicht autoimmun Hyperthyreose, verursacht durch eine konstitutiv aktivierende Mutation in der Keimbahn, denkbar. Des Weiteren könnte ein inverser Agonist als molekularbiologisches Werkzeug zur Klärung der Bedeutung der basalen Aktivität des TSHR genutzt werden. Ferner könnten Patienten mit Schilddrüsenkrebs von einem inversen Agonisten profitieren. Eine kombinierte Therapie erzielt durch Einnahme des inversen Agonisten zusammen mit der TSH-Suppression könnte effektiver sein als die TSH-Suppression allein.

Die kleinen Moleküle könnten die Funktion pharmakologischer *Chaperone* übernehmen¹¹². Der Funktionsverlust des Rezeptors ist oft durch Mutationen verursacht, die zu einer nicht korrekten Rezeptorfaltung führen. Die Fehlfaltung spiegelt sich oft in geringerer Oberflächenexpression und einer damit verbundenen reduzierten Aktivierung wider. Es wurde für den LHCGR bereits ein kleines Molekül beschrieben (Org42599), welches in der Lage ist, die geringe Oberflächenexpression der LHCGR-Mutanten (S616^{7.46}Y und A593^{6.59}P) zu beheben¹¹².

4. MOTIVATION UND ZIELSTELLUNG DER ARBEIT

Im Fokus dieser Arbeit steht Thyreoidea-stimulierender Hormon Rezeptor (TSHR). TSHR gehört zu der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und kontrolliert zusammen mit seinem natürlichen Liganden, dem Thyreoidea-stimulierenden Hormon (TSH), die Schilddrüsenaktivität. Beide Proteine nehmen eine wichtige physiologische Rolle in der Regulation von Wachstum und Stoffwechsel im menschlichen Körper ein. Mutationen am Rezeptor sind oft mit einer krankheitsverursachenden Fehlfunktion der Schilddrüse verbunden. Eine pathologische Aktivierung des Rezeptors durch Autoantikörper führt zu einer unkontrollierten Produktion von Schilddrüsenhormonen, bekannt als Morbus Basedow. Die Endokrine Orbitopathie (EO) stellt eine besondere Form des Morbus Basedow dar. Die Aktivierung des Rezeptors in orbitalen Fibroblasten (OF) durch die Autoantikörper hat eine Ausdifferenzierung der Fibroblasten zu Adipozyten zur Folge und führt zu entzündlichen Prozessen in der Augenhöhle. Seit 2006 ist bekannt, dass niedermolekulare Liganden im Inneren der Transmembrandomäne des TSHR binden können und dort aktivierend oder deaktivierend auf den Rezeptor wirken. In Hinblick auf eine potentielle therapeutische Anwendung allosterischer Liganden in der EO ist die Entwicklung eines TSHR-spezifischen Antagonisten von großem Interesse.

In dieser Arbeit sollen zum einem die Zusammenhänge zwischen Sequenz, Struktur und Funktion des TSHR untersucht werden, zum anderem sollen pharmakologisch relevante Substanzen mit antagonistischem Effekt auf den TSHR identifiziert werden.

Der Ausgangspunkt für den ersten Teil dieser Arbeit waren experimentelle Daten insbesondere an transmembranären Helix (TMH) 5, die in meiner Diplomarbeit erhoben werden. Die Mutation an der Position L587^{5.44} führte zu einer konstitutiven Aktivierung des TSHR. Dieses Ergebnis deutet auf eine andere Orientierung der Aminosäure L587^{5.44} hin als ein TSHR-Homologiemodell basierend auf der Rhodopsin-Kristallstruktur vorschlägt. Zur Klärung dieses Widerspruchs wurde gezielt nach Unterschieden zwischen den hochkonservierten Sequenzbereichen der Glykoproteinhormonrezeptoren (GPHR) und GPCR gesucht. Diese Analyse führte zur Identifizierung eines Prolins an der Position 5.50 in der TMH5. Innerhalb der Familie A der GPCR ist dieses Prolin^{5.50} hochkonserviert. Hingegen ist in allen GPHR an dieser Position ein Alanin anstelle des Prolins zu finden. Dieses Prolin verursacht in den GPCR eine Aufweitung der helikalen Rückgratstruktur an der TMH5. Damit hat Prolin^{5.50} nicht nur einen Einfluss auf die Orientierung der Aminosäuren im N-terminalen Bereich der TMH5 zu den benachbarten Helizes, sondern auch auf die Orientierung der Aminosäuren in der transmembranären Bindungstasche.

Ziel im ersten Teil der Arbeit ist es, durch ortsgerichtete Mutagenese den Einfluss des Alanins bzw. Prolins (Position 593^{5.50}) auf die TSHR-Signalisierung und -Struktur aufzuklä-

ren. Zum einen soll damit die strukturelle Konformation der TMH5 charakterisiert werden. Zum anderen soll Aufschluss über die Orientierung der Aminosäuren an der TMH5 gewonnen werden. Die erzielten Ergebnisse können zur Optimierung des vorhandenen TSHR-Homologiemodells genutzt werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung pharmakologisch relevanter Substanzen als Leitstrukturen mit antagonistischem Effekt am TSHR. Die Motivation für die Suche nach TSHR-Antagonisten ist die bestehende therapeutische Lücke bei schweren klinischen Fällen der EO. Die EO ist eine organspezifische Autoimmunerkrankung der Augenhöhle und tritt oft zusammen mit einer Schilddrüsenfehlfunktion auf. Die Aktivierung von TSHR durch Autoimmunantikörper in den OF führt zu einer Gewebeexpansion, verursacht durch die Ausdifferenzierung der Fibroblasten zu Adipozyten. Damit gehen entzündliche Prozessen in der Augenhöhle einher. Diese äußern sich in einer großen Anzahl schwerer Leidenssymptome wie trockene Augen, Lichtscheue, Ödeme der periorbitalen Gewebe und Bindehäute und haben Exophthalmus zur Konsequenz. Eine ursachenbehebende (kausale) Therapie ist bislang jedoch nicht vorhanden. Die Entwicklung eines TSHR-spezifischen Antagonisten, der direkt am Rezeptor bindet und die Aktivierung des TSHR durch agonistisch wirkende Autoimmunantikörper auf ein Basalwertniveau herabsetzt, ist von großem Interesse.

Im Rahmen dieser Arbeit soll mittels Hochdurchsatzverfahrens die Substanzbibliotheken des FMP nach niedermolekularen Liganden durchgesucht werden, die die TSHR-Aktivierung blockieren. Darüber hinaus sollen die identifizierten Substanzen funktionell und pharmakologisch charakterisiert werden. Das Projekt baut auf der Struktur-Funktionsanalyse der transmembranären allosterischen Bindungstasche des TSHR auf, die in der Dissertation von Ann-Karin Haas beschrieben wurde und als Grundlage für die Optimierung der Liganden genutzt werden kann.

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1. GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN

Tabelle 5-1: Geräte und Verbrauchsmaterialien.

Name	Herkunft	
Blotkammern	BioRad, München, D	
Brutschränke	Binder, Camarillo, USA CellSafe Integra Biosciences, CH Heraeus, Osterode, D	
Clean-Bench	BDK, Luft- und Reinraumtechnik GmbH, D	
Dispensor EL406	BioTek, Bad Friedrichshall, D	
Durchflusszytometer FACSCanto II	Becton Dickinson, Heidelberg, D	
Elektrophoresekammer	peqlab, Erlangen, D	
Elektroporationsgerät	GenePulser Xcell Elektroporation System, BioRad, München, D	
Feinwaage	Mettler Toledo, CH	
Freedom EVO®-Worktable	Tecan, Männedorf, CH	
Gefrierschränke	-80 °C -20 °C	New Brunswick Sciences, Nürtingen, D Liebherr, Biberach an der Riß, D
Geldokumentationssysteme	Quantity One, BioRad, Milano, I Odyssey 2.1, LI-COR® Biosciences, Bad Homburg, D	
Glaswaren (Kolben, Pipetten, etc.)	Schott AG, Mainz, D	
Hamiltonpipette	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, CH	
Heizplatte	Kiko Werke, Staufen, D	
Horizontalschüttler	Edmund Bühler, Hechingen, D	
Kryogefäße	Nunc, Roskilde, DK	
Kühlschränke	Liebherr, Biberach an der Riß, D	
Laser Scanning-Mikroskop (LSM) und additive Komponenten	ConfoCor3, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D LSM 510 META, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D	
Magnetrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen, D	
Mikroskop	Carl Zeiss, Göttingen, D	
Mikrowelle	AEG, Berlin, D	
Molecular Imager Gel Doc XR System	Bio-Rad, München, D	
Multishaker Rotator RS-24	BioSan, Warren, USA	
Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schuell, Dassel, D	
Parafilm	Laboratory Film, Chicago, USA	
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Eppendorf, Hamburg, D	
pH-Messgerät	Knick® Portamess®, Berlin, D	
Photometer GeneQuant II	Pharmacia Biotech, Cambridge, UK	
Pipetten	Gilson, Columbus, USA	
Pipetten (5, 10, 25 ml)	TPP, Zürich, CH	
Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, D	
Pipettierhilfe	Pipettboy, Integra Biosciences, Fernwald, D	
Pipettierroboter Plato	Zinsser Analytics, Frankfurt am Main, D	
Reaktionsgefäße	CoTech, Berlin, D	
Reinstwasseranlage	Typ MilliQ plus, Fa. Millipore, Schwalbach, D	
Spannungsgeräte	Hoefer, Pharmacia Biotech, San Francisco, USA	
Tecan Safire II Reader	Tecan, Männedorf, CH	

Thermocycler	Biometra, Göttingen, D
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifugen: MiniSpin plus	Eppendorf, Hamburg, D
Vakuumpzentrifugen	Christ Alpha, Osterode, D Savarant, Minnesota, USA
Vortexer	Janke & Kunkel, Staufen, D
Waagen	Sartorius, Göttingen, D
Wasserbad	GFL, Burgwedel, D
Zellkultur Testplatten (6-, 12-, 24-Well)	TPP, Zürich, CH
Zellkulturflaschen	TPP, Zürich, CH
Zellkulturschalen (10 cm)	Greiner bio-one, Frickenhause, D
Zellzählgerät	Casy®TTC, Roche Innovatis AG, Reutlingen, D

5.2. CHEMIKALIEN

Tabelle 5-2: Chemikalien.

Name	Herkunft
β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
125J-cAMP-Tyrosylester	IBL, Hamburg, D
Acrylamid 30% (Acrylamid-Bisacrylamid 37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe, D
Agarose	Peqlab, Erlangen, D
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ampicillin-Na-Salz	Carl Roth, Karlsruhe, D
BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Biotin	Pierce, Rockford, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Bovines Thyreoidea-stimulierendes Hormon (bTSH)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Bromphenolblau-Na-Salz	Carl Roth, Karlsruhe, D
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Casyton (isotonische Kochsalzlösung)	CASY@ton, Innovatis AG, Reutlingen, D
Chlorwasserstoffsäure (HCl)	VWR BDH Prolabo, Leuven, B
D-(+)-Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe, D
dNTP-Mix	Fermentas, St.Leon-Rot, D
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Essigsäureanhydrid (C ₄ H ₆ O ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ethanol	J.T.Baker, Deventer, NL
Ethidiumbromid	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, D

Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, D
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe, D
IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Isopropanol	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, D
Methanol	VWR International GmbH, Darmstadt, D
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumazid (NaN ₃)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumchlorid (NaCl)	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg, D
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Natriumhydroxid (NaOH)	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Pepton	AppliChem, Darmstadt, D
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Fluka, Basel, CH
Poly-L-Lysinhydrobromid	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
ProteinA-Sepharose	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
RedSafe	iNtRON Biotechnology,
RotiLoad, 4fach konzentriert	Carl Roth, Karlsruhe, D
Sac-Cel anti-Kaninchen	IBL, Hamburg, D
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Triethylamin (C ₆ H ₁₅ N)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Trifluoressigsäure (C ₂ HF ₃ O ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, D
TritonX-100	Carl Roth, Karlsruhe, D
Trypton	AppliChem, Darmstadt, D
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe, D

Tabelle 5-3: Kits.

Name	Herkunft
Glykosidasen: Endo H, PNGase F	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am
HitHunter cAMP XS+	Birmingham, UK
Lipofectamin2000™ Reagent	Invitrogen, Karlsruhe, D
Nucleobond Xtra Midi/Maxi-Kit	Machery & Nagel, Düren, D
NucleoSpin Extract II	Machery & Nagel, Düren, D
NucleoSpin Plasmid Quick Pure	Machery & Nagel, Düren, D
QuickChange™ Side-directed Mutagenesis Kit	Stratagene Europe, Amsterdam, NL

Tabelle 5-4: Antikörper.

Spezifität	Typ	Herkunft
Ziege-anti-Maus IgG1 Isotypkontrolle	Polyklonal, AP-konjugiert	Dianova, Hamburg, D
Kaninchen-anti-cAMP-Succinimidyl-Protein-Konjugat	Polyklonal	Sigma-Aldrich, Steinheim, Eigenherstellung des Instituts
Maus-Anti-Human TSHR	Monoklonal, MCA 1281	AbD Serotec, Düsseldorf, D
Maus-Anti-Human TSHR	Monoklonal, MCA 1571	AbD Serotec, Düsseldorf, D
Ziege-anti-Maus-D488 IgG	Polyklonal, Dylight® 488	AbD Serotec, Düsseldorf, D

Tabelle 5-5: Marker.

Name	Herkunft
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot, D
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot, D

Tabelle 5-6: Plasmide.

Plasmid	Vektor	Funktionelle Bereiche	Herkunft
pcDNA3	pcDNA3	Amp ^R	Invitrogen GmbH, Karlsruhe,
hTSHR.pcDNA3	pcDNA3	Wildtypischer hTSHR, Amp ^R	AG Schülein FMP Berlin, D
pEGFP-N1	pEGFP-N1	EGFP, Kan ^R	Clontech, Heidelberg, D

Tabelle 5-7: Enzyme.

Name	Herkunft
Bgl II	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D
BstE II	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D
Dpn I	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D
Endo H	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D
PNGase F	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D
Sca I	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D
T4 DNA Ligase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe, D

5.2.1. PUFFER UND LÖSUNGEN

Die Puffer und Lösungen für den routinemäßigen Gebrauch wurden nach Sambrook *et al.* hergestellt¹²¹. Die hierfür benötigten Chemikalien wurden in tridest Wasser gelöst, welches mit dem Milli-Q Plus Wasseraufbereitungssystem von organischen und ionischen Bestandteilen gereinigt wurde und eine Leitfähigkeit von höchstens 0,056-0,1 µS/cm bei Raumtemperatur besaß. Die Autoklavierung der Puffer, Lösungen und des Wassers erfolgte nach Bedarf.

5.2.2. OLIGONUKLEOTIDE

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der BioTEZ Berlin-Buch GmbH bezogen.

Tabelle 5-8: Oligonukleotide zur Sequenzierung der TSHR-Konstrukte.

Name	Sequenz 5' → 3'
CMVF_pcDNA3	CAA CGG GAC TTT CCA AAA TG
hTSHR_2a	CTC ATC ACT GTT AGC
hTSHR_3a-jw	AAG CTG GAT GCT GTT TAC C
hTSHR_7a-jw	AAC CAT GCC ATC GAC TGG C
hTSHR_8a-jw	ACA CCG AGA CCC CTC TTG C
pEGFPNrev	CTG GTC GAG CTG GAC GGC GAC G
pEGFP_C_R	GTT CAG GGG GAG GTG TG

Tabelle 5-9: Oligonukleotide zur Herstellung von TSHR-Konstrukten. Dargestellt sind die Sequenzen der Forward-Primer (A) und Reverse-Primer (B).

Name	Sequenz 5' → 3'
TSHR-A593G-(A)	G CTC AAC ATA GTT GGC TTC GTC ATC GTC TG
TSHR-A593G-(B)	CA GAC GAT GAC GAA GCC AAC TAT GTT GAG C
TSHR-A593P-(A)	G CTC AAC ATA GTT CCC TTC GTC ATC GTC TG
TSHR-A593P-(B)	CA GAC GAT GAC GAA GGG AAC TAT GTT GAG C
TSHR-A593V-(A)	G CTC AAC ATA GTT GTC TTC GTC ATC GTC TG
TSHR-A593V-(B)	CA GAC GAT GAC GAA GAC AAC TAT GTT GAG C

5.2.3. BAKTERIENSTÄMME

In dieser Arbeit wurde mit dem *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stamm DH5 α (Stratagene Europa) gearbeitet.

Tabelle 5-10: Nährmedien für Kultivierung von *E. coli*.

Name	Zusammensetzung
GYT-Puffer	10% Glycerin 100 g/l Hefeextrakt 2,5 g/l Trypton/Pepton
LB Medium	10 g/l Trypton/Pepton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl → pH 7,5
LB Agarplatte	500 ml LB Medium 5 g Agar

Tabelle 5-11: Flüssigmedien zur Kultivierung und Ablösung eukaryotischer Zelllinien.

Name	Zusammensetzung
DMEM-Medium	2 g/l NaHCO ₃ DMEM-Pulver → ad H ₂ O, pH 7,2
Trypsin-EDTA-Lösung	0,25% Trypsin 3 mM EDTA → in PBS, pH 7,2
PBS	137 mM NaCl 27 mM KCl 15 mM KH ₂ PO ₄ 81 mM Na ₂ HPO ₄ → pH 7,4

5.2.4. EUKARYOTISCHE ZELLINIEN

Tabelle 5-12: Zelllinien und Kulturmedien.

Zelllinie	Kulturmedium	Herkunft
CHO-K1 (ATCC® CCL-61™) (Chinese Hamster Ovary) Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamster (<i>Cricetulus griseus</i>)	F12 Nutrien Mixture (HAM) 10% (v/v) fetales Kälberserum 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin 800 µg/ml Geneticin (G418)	Wesel, D LGC Standards GmbH
CHO-K1-TSHR (NM_000369.2) Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamster Stabil exprimierend TSHR	F12 Nutrien Mixture (HAM) 10% (v/v) fetales Kälberserum 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin 800 µg/ml Geneticin (G418)	Birmingham, UK Discover _x
HEK293T (Human Embryonic Kidney) Humane embryonale Nierenzellen	DMEM-Medium 10% fetales Kälberserum 1% Penicillin/Streptomycin (100U/ml bzw. 100µg/ml)	Braunschweig, D DSMZ GmbH
HEK293T-FSHR Humane embryonale Nierenzellen Stabil exprimierend FSHR	DMEM 10% (v/v) fetales Kälberserum 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin 2% (v/v) Glucose 50x 0,5% (v/v) Hygromycin B	Leipzig, D AG Ralf Paschke
HEK293T-LHCGR Humane embryonale Nierenzellen Stabil exprimierend LHCGR	DMEM-Medium 10% (v/v) fetales Kälberserum 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin 2% (v/v) Glucose 50x 0,5% (v/v) Hygromycin B	Leipzig, D AG Ralf Paschke
HEK293T-TSHR Humane embryonale Nierenzellen Stabil exprimierend TSHR	DMEM-Medium 10% (v/v) fetales Kälberserum 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin 2% (v/v) Glucose 50x 0,5% (v/v) Hygromycin B	Leipzig, D AG Ralf Paschke

5.2.5. SOFTWARE

In dieser Arbeit wurden folgende Programme verwendet: CellQuest Pro; FCSExpress V3; FACSDiva Version 6.1.1; GraphPad Prism Version 5.04; Clone Manager 5.0 für Windows; Excel Microsoft Office 2003; LSM-Software Release Version 3.2; LSM ZEN 2007; Chem-Bio Office Ultra 12.0.

5.3. METHODEN

5.3.1. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

5.3.1.1. ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mittels NucleoSpin Plasmid Quick Pure-Kit oder Nucleobond Xtra Midi bzw. Maxi-Kit (Machery&Nagel). Die Durchführung erfolgte nach den Instruktionen des Herstellers. Die DNA wurde in 30 µl (Mini-Präparation) bzw. 100 µl (Midi-Präparation) Wasser eluiert und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Die gewünschte Bakterienkolonie wurde als Glycerinkultur bei -80 °C gelagert.

5.3.1.2. PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DER DNA-KONZENTRATION

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch (GeneQuantII-Photometer; PharmaciaBioTech) bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Es wurde die Absorption der wasserverdünnten DNA-Proben gegen einen Leerwert (Wasser) gemessen. Der Quotient der optischen Dichte (OD_{260}/OD_{280}) erlaubt eine qualitative Aussage über die DNA-Reinheit und liegt bei 1,8 für reine DNA¹²².

5.3.1.3. RESTRIKTIONSVERDAU VON DNA

Der Restriktionsverdau der DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen Typ II durchgeführt. Diese Enzyme spalten die DNA an genau definierbaren Basenabfolgen. Die entstehenden DNA-Fragmente können durch den Vergleich mit einem Größenstandard (Marker) zugeordnet werden. Pro Ansatz wurden 10 U Restriktionsenzym je 1 µg DNA eingesetzt. Um die maximale Aktivität der Restriktionsendonukleasen zu gewährleisten, wurden die vom Hersteller empfohlenen Angaben (Puffer, Temperatur, Zugabe von BSA) eingehalten. Die Reaktion wurde mittels DNA-Ladepuffer gestoppt und über eine Agarosegelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt.

Tabelle 5-13: Der Standardansatz für die DNA-Restriktionsanalyse.

DNA-Template	≤ 1 µg
10x-Restriktionspuffer	2 µl
ggf. 10x-BSA	2 µl
Restriktionsendonuklease	1 U/µg DNA
H ₂ O	ad 20 µl

5.3.1.4. AGAROSEGELELEKTROPHORESE

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe erfolgte in Agarosegelen (1-2% w/v Agarose in Elektrophorese-Puffer). Zur Visualisierung der aufgetrennten DNA-Fragmente im UV-Licht (254-366 nm) wurde dem Agarosegel der Farbstoff Ethidiumbromid (0,2 µg/ml; Fluka Chemie) oder RedSafe (1:20000; iNtRON Biotechnolo-

gy) zugesetzt. Als Größenstandard wurde Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas) verwendet. Die Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und anschließend in Elektrophorese-Puffer bei einer konstanten Spannung von 7 V/cm für 45-60 Min. aufgetrennt. Die gefärbten DNA-Fragmente wurden durch UV-Bestrahlung im Geldokumentationssystem (Molecular Imager Gel Doc XR System, Bio-Rad) visualisiert, dokumentiert und ausgewertet.

Die Isolierung der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel erfolgte mittels NucleoSpin® Extract II Kit (Macherey&Nagel) entsprechend den Angaben des Herstellers.

Tabelle 5-14: Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese.

Name	Zusammensetzung
Elektrophorese-Puffer	1,6 M Tris 22,8 ml/l Essigsäure 74,4 g/l EDTA 250 mg Bromphenolblau 250 mg Xylen Cyanol
DNA-Ladepuffer	33 ml 150 mM Tris → pH 7,6 60 ml Glycerin 7 ml H ₂ O

5.3.1.5. GERICHTETE MUTAGENESE

Die gerichtete Mutagenese ermöglicht einen gezielten Austausch, Deletion oder Einführung einzelner Basen in Gene. Die gewünschten Punktmutationen wurden mit Hilfe des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene Europe) und entsprechenden Oligonukleotiden (BIOTEZ) durchgeführt. Die Standardreaktionsansätze und die Durchführung der gerichteten Mutagenesen sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst.

Tabelle 5-15: Das Standardprogramm der Mutagenese-PCR.

Mutagenese-PCR-Programm		
95 °C	30 s	16x
95 °C	30 s	
55 °C	1 Min.	
68 °C	16 Min. (2 Min./1kb)	
68 °C	16 Min.	
4 °C	∞	

Tabelle 5-16: Ansatz der Mutagenese-PCR. Primer 1 und Primer 2 bezeichnen das komplementäre Mutagenese-Primerpaar.

Reagenz	Konzentration
pcDNA3.1-hTSHR	50 ng
Primer 1	10 µM
Primer 2	10 µM
PCR-Puffer	10-fach
dNTP-Lösung	2,5 mM
PfuTurbo® DNA-Polymerase	0,75 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Die methylierte bzw. hemimethylierte wildtypische DNA wurde mittels eines zweistündigen Verdauens mit der Endonuclease *Dpn* I (NEB) bei 37 °C aus dem Reaktionsansatz entfernt. Anschließend wurden 4 µl des Mutageneseansatzes in *E. coli* (DH5α-Stamm) mittels Elektroporation transformiert.

5.3.1.6. HERSTELLUNG ELEKTROKOMPETENTER ZELLEN, *E. COLI* DH5α

Zur Herstellung elektrokompeterer Bakterien wurde aus einer Glycerinkultur eine Vorkultur in 3 ml LB-Medium (Tabelle 5-10) angeimpft und inkubiert (37 °C, 180 rpm). Aus dieser Vorkultur wurde eine Über-Nacht-Kultur (200 µl der Vorkultur in 60 ml LB-Medien) angesetzt (37 °C, 180 rpm). 25 ml der Über-Nacht-Kultur wurden in 500 ml LB-Medium überführt und bei 37 °C und 180 rpm bis zum Erreichen der OD₆₀₀ von 0,35-0,4 angezogen.

Die Zellen wurden in vorgekühlte Zentrifugationsbecher überführt, für 20 Min. auf Eis abgekühlt und durch Zentrifugation (2500 xg, 15 Min., 4 °C) pelletiert. Das Pellet wurde nacheinander mit kaltem Wasser und kalter, 10%iger Glycerin-Lösung gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in GYT-Medium (Tabelle 5-10) aufgenommen und als Aliquot (40 µl) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Bakteriensuspension wurde bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert.

5.3.1.7. KLONIERUNG VON TSHR-GFP-KONSTRUKTEN

Eine Klonierung ist die Integration eines DNA-Fragments (Insert) in einen Vektor (oder Plasmid). Zur Klonierung der A593P-TSHR-GFP- und TSHR-GFP-Konstrukte wurden der GFP-Vektor und A593^{5.50}P-TSHR- bzw. TSHR-Konstrukte mit den *Sca* I und *BstE* II Restriktionsendonukleasen (Tabelle 5-7) verdaut und über eine Gelelektrophorese (Kapitel 5.3.1.4) aufgetrennt. Die aufgetrennten Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten, mit Hilfe des kommerziell erhältlichen NucleoSpin Extract Kits (Macherey-Nagel) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt und in 25 µl H₂O eluiert. Die Insertion von DNA-Fragment (A593P-TSHR bzw. TSHR) in den pEGFP-N1-Vektor erfolgte durch Ligation. Hierfür wurden die aufgereinigten DNA-Fragmente (A593P-TSHR und GFP-Vektor) mittels der *T4*-Ligas (Tabelle 5-7) zu einem vollständigen Plasmid ligiert. Die Ligationsreaktion wurde laut Herstellerprotokoll in einem 20 µl Ansatz durchgeführt und über Nacht bei 16 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation in *E. coli* (Kapitel 5.3.1.8).

Tabelle 5-17: Der Standardansatz für die Ligationsreaktion.

Insert (A593 ^{5.50} P-TSHR)	6,0 µl
Vektor (pEGFP-N1-Vektor)	1,0 µl
<i>T4</i> -Ligase	1,0 µl
Ligationspuffer 10x	2,0 µl
H ₂ O	10,0 µl

5.3.1.8. TRANSFORMATION DURCH ELEKTROPORATION

Die Methode der Transformation ermöglicht das Einbringen von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen. Zur Klonierung, Mutagenese und Vermehrung von Plasmid-DNA wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α (Stratagene) verwendet. Die Elektroporation der Zellen erfolgte bei einer Spannung von 1250 V im GenePulser Xcell Electroporation System (Bio-Rad Laboratories GmbH). Die elektrokompetenten Zellen (40 μ l) wurden langsam auf Eis aufgetaut. Nach der Zugabe von DNA (2 μ l bei Retransformation bzw. 4 μ l bei Mutagenesen) wurden die Zellen kurz auf Eis inkubiert, in eine vorgekühlte Küvette (1 mm Dicke) überführt und elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium aufgenommen, eine Stunde bei 37 °C inkubiert und auf selektiven LB-Agarplatten (Tabelle 5-10) mit Zusatz von Ampicillin (Amp, 100 μ g/ μ l) ausplattiert. Nach Inkubation der Platten bei 37 °C über Nacht wurden einzelne Kolonien gepickt und aus diesen Plasmide isoliert (Kapitel 5.3.1.1). Anschließend erfolgte die Sequenzierung der hergestellten Konstrukte durch die Firma Source BioScience LifeSciences mit den firmeneigenen oder entsprechend mitgeschickten Sequenzierungsprimern (Tabelle 5-8).

5.3.2. ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

5.3.2.1. KULTIVIERUNG VON ZELLEN

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in entsprechendem Medium (Tabelle 5-12). Zur Vereinzelnung und Umsetzung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mittels Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst (Tabelle 5-11).

In Abhängigkeit des anstehenden Experiments wurden definierte Zellzahlen in den entsprechenden Zellkulturflaschen/-schalen oder Multiwellplatten ausgesät und bei 37 °C im Brutschrank mit 5% Kohlendioxid und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert.

5.3.2.2. ZELLZÄHLUNG

Zur Zellzählung wurden die abgelösten Zellen in 10 ml Kulturmedium aufgenommen. 25 µl Zellsuspension wurden in 10 ml Casyton-Lösung verdünnt und die Zellzahl mit Hilfe des Zellzählgerätes (Roche Innovatis AG) bestimmt.

5.3.2.3. BESCHICHTUNG DER ZELLKULTURSCHALEN/DECKGLÄSCHEN MIT POLY-L-LYSIN

Zur besseren Haftung der kultivierten Zelllinien wurden die Zellkulturplatten mit Poly-L-Lysin (Sigma) beschichtet. Aufgrund der elektrostatischen Anziehungskräfte haftet die negativ geladene Zellmembran an der positiv geladenen Poly-L-Lysin-beschichteten Oberfläche. Zur Beschichtung wurden jeweils 300 µl Poly-L-Lysin-Lösung (0,025 mg/ 1ml Wasser) in die Vertiefungen einer 24-Wellplatte pipettiert. Die Lösung wurde nach 45 Min. abgesaugt und die Oberfläche für 1h bei Raumtemperatur (RT) getrocknet.

5.3.2.4. TRANSIENTE TRANSFEKTION

Die transiente Transfektion der Konstrukte erfolgte mittels Lipofectamin2000TM Reagent. Lipofectamin2000TM Reagent besteht aus kationischen und neutralen Lipiden und vermittelt die DNA-Einschleusung in die Zellen über liposomenartige Komplexe. Die benötigte Menge Lipofectamin2000TM Reagent wurde in serumfreiem Medium verdünnt und 10 Min. bei RT inkubiert (Lipofectamin-Ansatz). Die DNA wurde zu dem Lipofectamin-Ansatz zugefügt, gemischt und für 20 Min. bei RT inkubiert und anschließend zu den Zellen pipettiert. Das Verhältnis von Lipofectamin2000TM Reagent zu Plasmid-DNA betrug 2:1 (4 µl/ 2 µg DNA). Nach der Transfektion wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung im Brutschrank für 24h bzw. 48h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

5.3.3. PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

Die Charakterisierung der Proteine erfolgte mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie (Kapitel 5.3.3.1), konfokaler *Laser Scanning Microscopy* (LSM; Kapitel 5.3.6.1) und Immunopräzipitation (IP; Kapitel 5.3.3.2.2). Die Durchflusszytometrie und LSM wurden zur Ermittlung der Oberflächenexpression verwendet. Die IP diente zur Bestimmung des Glykosylierungsstatus (Kapitel 5.3.3.2) der untersuchten TSHR-Konstrukte.

5.3.3.1. FLUORESZENZBASIERTE DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die Oberflächenexpression der TSHR-Mutanten wurde im Verhältnis zum wildtypischen Rezeptor durchflusszytometrisch bestimmt. Hierfür wurden die Rezeptoren an der Zelloberfläche mit spezifischen Antikörpern markiert. Die Detektion erfolgte über fluorophorgekoppelte Sekundärantikörper. Das dabei entstehende Fluoreszenzsignal wird vom Detektor gemessen, ausgewertet und als mittlere Fluoreszenzintensität jeder einzelnen analysierten Zelle angegeben.

Zur Bestimmung der Oberflächenexpression der TSHR-Konstrukte wurden HEK293T-Zellen in 6-Wellplatten ausgesät ($3,0 \times 10^5$ Zellen/Well) und nach 24h transient mit entsprechenden DNA-Konstrukten transfiziert. Die Messung erfolgte 48h nach der Transfektion. Die Zellen wurden einmal mit FACS-Puffer (PBS mit 0,5% w/v BSA) und einmal mit FACS-Waschpuffer (PBS; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA) gewaschen, in 2 ml FACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Durch die Zentrifugation (300 xg, 5 Min., 4 °C) wurden die Zellen pelletiert und zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend mit dem Primärantikörper (Maus-anti-Human TSHR IgG, 1:200, 30 Min., 4 °C) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, durch Zentrifugation pelletiert und für 30 Min. mit sekundärem Antikörper (Ziege-anti-Maus-D488 IgG; 1:400) bei 4 °C im Dunklen inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert (300 xg, 5 Min., 4 °C) und für die Analyse in 250 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Messung des Fluoreszenzsignals der Zellen erfolgte am FACSCalibur. Für die Auswertung wurde die Software CellQuest Pro und FCSExpress V3 verwendet.

5.3.3.2. UNTERSUCHUNG DES GLYKOSYLIERUNGSSTATUS DER TSHR-KONSTRUKTE

Im Laufe des intrazellulären Transports wird die Glykosylierung von Rezeptoren fortlaufend modifiziert. Zunächst erfolgt die Anknüpfung einer mannosereichen N-Glykosylierung, die charakteristisch für unreife Rezeptoren im ER und im frühem Golgi-Apparat ist. Die mannosereiche Glykosylierung wird im medialen Golgi-Apparat durch komplexe Glykane (komplexe Glykosylierung) ersetzt. Die komplex-glykosylierten Rezep-

toren findet man im Verlauf des sekretorischen Proteintransports ab dem medialen Golgi-Apparat.

Der Glykosylierungsstatus der Proteine kann durch enzymatischen Verdau bestimmt werden. Die Endoglykosidase H (EndoH) kann die mannosereiche Glykosylierungen spalten. Die Peptid-Endoglykosidase F (PNGase F) ist in der Lage, sowohl mannosereiche als auch komplexe Glykosylierung zu spalten.

Hierfür wurden HEK293T-Zellen in 100 mm Schalen (8×10^6 Zellen/Schale) ausgesät und 24h nach Aussaat mit den entsprechenden TSHR-Konstrukten transfiziert. Anschließend erfolgten die IP der TSHR-Konstrukte, der Verdau mit Glykosidasen, die Auftrennung der Proteine über die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE; Kapitel 5.3.3.2.4) und Western Blot (Kapitel 5.3.3.2.5).

5.3.3.2.1. VORBEREITUNG DER PROTEIN A-SEPHAROSE

Die Protein A-Sepharose wurde in PBS aufgenommen (3,5 mg/ml) und für ca. 15 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Protein A-Sepharose zweimal in Puffer-A gewaschen und abzentrifugiert (700 xg, 2 Min., RT). Das Pellet wurde in 1 ml Puffer-A aufgenommen und mit Maus-anti-Human TSHR IgG (1:200, MCA 1571, Serotec.) über Nacht rotierend im Kühlraum zur Kopplung inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Protein A-Sepharose pelletiert (700 xg, 2 Min.), einmal mit Puffer A gewaschen und abzentrifugiert (700 xg, 2 Min.).

5.3.3.2.2. IMMUNPRÄZIPITATION

Die IP der TSHR-Konstrukte erfolgte 24h nach Transfektion. Alle hierfür notwendigen Arbeitsschritte wurden im Kühlraum oder auf Eis durchgeführt. Das Wachstumsmedium wurde durch zweifaches Waschen der Zellen mit PBS-CM entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit Lysispuffer (800 µl/ Schale) für 1h bei 180 rpm auf dem Schüttler bei 4 °C inkubiert. Die Zelllysate wurden abzentrifugiert (30 Min. bei 12000 xg) und der Überstand auf das mit Antikörper beladene Protein A-Sepharose-Pellet gegeben. Die Kopplung der TSHR-Konstrukte an Protein A-Sepharose erfolgte über Nacht rotierend bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Protein A-Sepharose pelletiert (700 xg, 2 Min.), einmal mit Waschpuffer I und zweimal mit Waschpuffer II gewaschen und abzentrifugiert (700 xg, 2 Min.). Nach dem letzten Waschschrift wurde die Flüssigkeit vollständig abgesaugt, um das Sepharose-Pellet zu trocknen. Die Proben wurden entweder in 100 µl 1x Rotiload (Roth) Probenpuffer aufgenommen oder einem Glykosidasen-Verdau (Kapitel 5.3.3.2.3) unterzogen. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe über SDS-PAGE.

Tabelle 5-18: Puffer und Lösung für die Durchführung der IP.

Name	Zusammensetzung
Lysispuffer	10 ml Puffer-A 125 µl PMSF 80 µl Protease-Inhibitor-Mix
PBS-CM	PBS 1 mM MgCl ₂ x 6H ₂ O 0,1 mM CaCl ₂ x 2H ₂ O →pH 7,4
PMSF-Lösung	40 mM PMSF in Ethanol
Protease-Inhibitor-Mix	0,4 mg/ml Trypsin Inhibitor Typ IS Soybean 0,25 mg/ml Apotinin 9,8 mg/ml Benzamidin
Puffer-A	50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 150 mM NaCl 1 mM EDTA →pH 8,0 1% Triton X-100 (v/v) 0,1% SDS (w/v)
Waschpuffer I	50 mM Tris-HCl →pH 8,0 500 mM NaCl 1 mM EDTA →pH 8,0 0,5% Triton X-100 (v/v) 0,1% SDS (w/v)
Waschpuffer II	50 mM Tris-HCl →pH 7,4 1 mM EDTA →pH 8,0 0,5% Triton X-100 (v/v) 0,1% SDS (w/v)

5.3.3.2.3. PROTEINVERDAU MIT GLYKOSYDASEN

Die immunpräzipitierten Proteine (im trockenen Sepharose-Pellet) wurden dem Glykosidase-Verdau unterzogen. Ein Schema des sich anschließenden Endo H- bzw. PNGase F-Verdau der immobilisierten Proteine ist der nachstehenden Tabelle zu entnehmen. Nach dem Verdau wurden die Proben über SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt.

Tabelle 5-19: Der Standardansatz und Durchführung der Proteinverdau mit Glykosydasen.

Endo H-Verdau	PNGase F-Verdau
59 µl PBS + 1 µl Proteaseinhibitormix	54 µl PBS + 1 µl Proteaseinhibitormix
6 µl 10x Denaturierungspuffer	5,5 µl 10x Denaturierungspuffer
Inkubation der Proben (8 Min., 95 °C); Zentrifugation (1 Min., 15000 xg, RT)	
Überstand kurz auf Eis	
6,6 µl G5-Puffer	6,05 µl NP40
---	6,05 µl G7-Puffer
1,5 µl Endo H (1000 U/µl)	1 µl PNGase F (500 U/µl)
Verdau: 1h, 37 °C, 350 rpm	
25,9 µl 4x Rotiload	25,4 µl 4x Rotiload
3 Min., 95 °C; Zentrifugation 13000 rpm, 5 Min., Überstand auf das Gel auftragen	

5.3.3.2.4. SDS-PAGE

SDS-PAGE ist eine analytische Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe in einem elektrischen Feld.

Zur Herstellung eines Gels wurde zunächst das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde der Alkohol vollständig entfernt, das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und Taschen zum Auftrag der Proben durch einen geeigneten Elektrophoresekamm geschaffen.

Tabelle 5-20: Zusammensetzung der verwendeter Trenn- und Sammelgele.

Name	Zusammensetzung
Acrylamid-Lösung (19:1)	38% Acrylamid (w/v) 2% Bisacrylamid (w/v)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Lösung	10% APS in Wasser, frisch herstellen;
Trennpuffer	0,7 M Tris-HCl → pH 8,8
Sammelpuffer	0,62 M Tris-HCl → pH 6,8 19 mM Glycin
Laufpuffer	0,1% SDS (w/v) 25 mM Tris-HCl → pH 7,3

Tabelle 5-21: Zusammensetzung der verwendeter Trenn- und Sammelgele.

Reagenz	Trenngel (8%)	Sammelpuffer (5%)
Trenngelpuffer	7,5 ml	-
Sammelpuffer	-	2,5 ml
Acrylamid (30%)	10,0 ml	3,3 ml
H ₂ O	11,9 ml	13,7 ml
SDS (20% w/v)	300 µl	200 µl
APS-Lösung (0,1 g/ml)	120 µl	120 µl
TEMED	40 µl	40 µl

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 0,25 mA/ cm² (20 mA/ Gel) für 60-80 Min. in Laufpuffer. Die Auftrennung der Proteine wurde mit Hilfe eines *Prestained*-Markers verfolgt.

5.3.3.2.5. WESTERN BLOT

Für den spezifischen Nachweis der Proteine im Western Blot wurden die aufgetrennten Proteine aus dem Gel mittels Tankblotverfahren (Bio-Rad Laboratories GmbH) auf die Nitrozellulosemembran überführt. Der Transfer erfolgte bei 2 mA/ cm² (90 mA je Gel) für 60-80 Min.

Zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran wurde diese für 1h in Blockpuffer auf einem Horizontalschüttler bei RT inkubiert. Der Nachweis erfolgte durch

den spezifischen Primärantikörper und einem an Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelten Sekundärantikörper.

Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Maus-anti-Human TSHR MCA 1284, 1:200; Serotec) erfolgte über Nacht bei 4 °C in Blockpuffer. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran dreimal für 5 Min. mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus AP-konjugiert; 1:1000; Dianova) erfolgte in Blockpuffer 1h lang bei RT. Danach wurde die Membran erneut dreimal für 5 Min. mit TBS-T gewaschen.

Die Entwicklung des Western Blots erfolgte durch die Zugabe von BCIP-NBT-Lösung.

Tabelle 5-22: Puffer und Lösung zur Durchführung des Western Blots.

Name	Zusammensetzung
Blockpuffer	TBS-T 2% BSA
Blotpuffer 10x	112,6 g/l Glycin 24 g/l Tris → pH 8,3 zum Gebrauch: 20% Methanol 0,015% SDS
10x TBS	500 mM Tris 150 mM NaCl → pH 7,4
10x TBS-T	500 mM Tris 150 mM NaCl 0,5% Tween 20 → pH 7,4
BCIP-NBT-Lösung	0,2 mg/ml BCIP 0,5 mg/ml NBT 10 mM Tris-HCl → pH 9,5

5.3.4. PHARMAKOLOGISCHE METHODEN

5.3.4.1. BESTIMMUNG DER INTRAZELLULÄREN cAMP-AKKUMULATION DURCH RADIOIMMUNOASSAY (RIA)

Die funktionelle Charakterisierung der TSHR-Mutanten sowie der Einfluss der Substanzen auf $G_{\alpha s}$ -abhängige Signalisierung erfolgten durch die Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration mittels Radioimmunoassay (RIA). Der Assay basiert auf der Kompetition von endogenem und radioaktiv markiertem cAMP um die Bindungsstellen am Antikörper. Die Konzentration an intrazellulär gebildetem cAMP wird mittels einer mitgeführten Standardkurve bestimmt.

Tabelle 5-23: Puffer und Lösung für die Durchführung des RIA.

Name	Zusammensetzung
Acetylierungsreagenz	1 ml Essigsäureanhydrid 2 ml Triethylamin
Extraktionsmedium	0,1% v/v Trifluoressigsäure 0,005% v/v Triton X-100
RIA-Grundpuffer	100 mM Natriumacetatpuffer, pH → 6,0
RIA-Vollpuffer	RIA-Grundpuffer 0,1% w/v BSA 0,1% v/v Triton X-100
Stimulationsmedium	DMEM 10 mM HEPES 0,5% w/v BSA 0,25 mM 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)

Der Assay wurde in mit Poly-L-Lysin beschichteten 24-Wellplatten durchgeführt. Je nach Versuch wurden HEK293T-, HEK293T-TSHR-, CHO-K1- oder CHO-K1-TSHR-Zellen mit entsprechender Zellzahl verwendet. Für jede Zelllinie wurde die optimale Zellzahl ermittelt. Bei Bedarf wurden die Zellen transient mit entsprechenden Konstrukten transfiziert. Die Transfektion erfolgte 24h nach Aussaat. 48h bzw. 72h nach Aussaat wurden die Zellen mit Stimulationsmedium gewaschen und für 60 Min. bei 37 °C mit dem Agonist (für bTSH wurde ein Konzentrationsbereich von 100 mIU/ml bis 0,1 µIU/ml und für *compound* 2 von 0,1 nM bis 1 µM eingesetzt) und/oder der Substanz (10-50 µM) inkubiert. Die Zugabe der Substanz und die Stimulation mit bTSH oder Liganden erfolgten simultan. Der Phosphodiesterase-Inhibitor (IBMX) verhindert während der Stimulation die Lyse des gebildeten cAMP. Nach Entfernung des Stimulationsmediums wurden die Zellen für 30 Min. mit Extraktionsmedium bei 4 °C lysiert. Das Lysat wurde für zehn Minuten auf 90 °C erhitzt und mit Hilfe einer Rotations-Vakuum-Zentrifuge (α -RVC, Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH) über Nacht getrocknet. Zur Bestimmung der cAMP-Konzentration mittels RIA wurden die getrockneten Pellets in 750 µl RIA-Puffer resuspendiert, 20 Min. bei 4 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert (23000 xg, 15 Min., 4 °C). Die Überstände der Proben wurden entsprechend verdünnt. Die Sensitivität der Bestimmung wurde

durch die Acetylierung der Proben und der cAMP-Standard-Lösungen (0,1–146 fmol pro Inkubat) bei RT erhöht (30 µl Probe/Standard, 470 µl RIA-Puffer, 20 µl Acetylierungsreagenz (Mischung von Acetanhydrid/Triethylamin im Volumenverhältnis 1:2)). Acetylierte Proben und Standards wurden mit [¹²⁵I]-cAMP-Tyrosylmethylester (10000 cpm, spezifische Aktivität 81,4 TBq/mmol) und polyklonalem Kaninchen-anti-cAMP-Succinimidyl-Protein-Konjugat (Endverdünnung 1:160000; Endinkubationsvolumen 400 µl) 24h bei 4 °C inkubiert. Die Trennung von antikörpergebundenem und freiem cAMP erfolgte über die Doppel-Antikörper-Festphasenmethode. Dazu wurden zum Inkubationsansatz 50 µl zellulose-konjugierter Schaf-anti-Kaninchen-Antikörper (Tabelle 5-4) gegeben, 40 Min. bei 4 °C inkubiert und nach Zugabe von 1 ml BSA-freiem RIA-Puffer zentrifugiert (4200 xg, 40 Min.). Die Radioaktivität der gebundenen Fraktion im Sediment wurde mit einem γ-Counter (Wallac 1470 Wizard, USA) gemessen. Die Konzentration des cAMP wurde mittels einer Standardkurve ermittelt.

Die Daten wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 5.04 verarbeitet und die EC₅₀-Werte wurden mittels nicht linearer Regression berechnet.

5.3.4.2. SCHILD-PLOT UND SCHILD-REGRESSIONS-ANALYSE

Die Quantifizierung der Wechselwirkungen des Liganden mit seinem Rezeptor ist von fundamentaler Bedeutung in der Pharmakologie und spielt eine zentrale Rolle bei der Entwicklung von neuen Medikamenten. Dabei stehen die Ermittlung der IC₅₀-Werte und die Aussage über die Art des Antagonismus im Vordergrund. Der IC₅₀ Wert (*Inhibitory Concentration*, IC) ist eine Konzentration des Antagonisten, die benötigt wird, um ein durch den Agonisten induziertes Signal um 50% zu senken, und wird durch die Erstellung von Konzentrations-Inhibitionskurven ermittelt. Dabei ist zu beachten, dass der IC₅₀-Wert von der Konzentration des Agonisten abhängig ist und nichts über die Art des Antagonismus aussagt¹²³.

Die Schild-Regressions-Analyse und der Schild-Plot erlauben eine Aussage über die die Art des Antagonisten. Dabei wird zwischen kompetitiven und nicht kompetitiven Antagonisten unterschieden. Der Schild-Plot stellt ein graphisches Verfahren zur Ermittlung der pharmakologischen Wirkpotenz (pA₂-Wert) eines Antagonisten dar und beschreibt den linearen Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der molaren Antagonistenkonzentration und der Hemmwirkung des Antagonisten (Formel 5-1). Die Ermittlung des pA₂-wertes erfolgt durch die Erstellung der Konzentrations-Wirkungskurven für den Agonisten bei gleichzeitiger Zugabe einer festen Antagonistenkonzentration. Aus erstellten Konzentrations-Wirkungskurven lässt sich eine mittlere effektive Agonistenkonzentration (EC₅₀-Wert, *Effective Concentration*) ermitteln, bei der ein halbmaximaler Effekt beobachtet werden kann. Das Verhältnis aus EC₅₀-Wert in Anwesenheit eines Antagonisten und EC₅₀-Wert in

Abwesenheit eines Antagonisten wird als das Konzentrationsverhältnis (*concentration ratio*) r bezeichnet (Formel 5-1). Das Konzentrationsverhältnis r wird als $\log(r-1)$ gegen den Logarithmus der eingesetzten Konzentration des Antagonisten im Schild-Plot eingetragen und dient zur Ermittlung des pA_2 -Wertes (Formel 5-1). Die Steigung und Linearität der Ausgleichsfunktion liefern Aussagen über die Art des Antagonismus.

A	B
$pA_2 = -\log[\text{Antagonist}] + \log(r - 1)$	$r = \frac{EC_{50}(+\text{Antagonist})}{EC_{50}(-\text{Antagonist})}$

Formel 5-1: Gleichungen zur Ermittlung der antagonistischen Potenz (pA_2 -Wert; A) und des Konzentrationsverhältnisses (r ; B) der EC_{50} -Werte. A) $[\text{Antagonist}]$ ist die eingesetzte Antagonistenkonzentration. B) Das Konzentrationsverhältnis der EC_{50} -Werte bei Anwesenheit bzw. Abwesenheit eines Antagonisten ist r . Die Anwesenheit des Antagonisten ist als Plus (+Antagonist) dargestellt, die Abwesenheit als Minus (-Antagonist).

Ein kompetitiver Antagonist liegt vor, wenn die steigenden Antagonistenkonzentrationen zu einer Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurven und zu einer Abnahme des EC_{50} -Wertes des Agonisten beim gleichzeitigen Erreichen der maximalen Agonistenwirkung führen. Der lineare Verlauf der Ausgleichsfunktion und eine Steigung von $m=1$ sind weitere Hinweise auf das Vorliegen eines kompetitiven Antagonismus.

Eine Minderung des Maximalwertes der Agonistenwirkung und gleichbleibende EC_{50} -Werte des Agonisten sind Hinweise auf einen nicht kompetitiven Antagonisten zum eingesetzten Agonisten.

Der Schild-Plot wurde in HEK293T-TSHR-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden 100000 Zellen/Well in Poly-L-Lysin beschichtete 24-Wellplatten ausgesät. Die Stimulation der Zellen mit ansteigender Konzentration bTSH oder Agonisten (*compound 2*) bzw. die Behandlung der Zellen mit Substanzen (9 μM -52,2 μM) erfolgte 48h nach Aussaat. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die intrazelluläre cAMP-Konzentration mittels RIA bestimmt (Kapitel 5.3.4.1). Die Zugabe der Substanz und die Stimulation mit bTSH bzw. *compound 2* erfolgten simultan.

5.3.4.3. ALAMARBLUE-ASSAY

Der *AlamarBlue*-Assay ist eine Methode zur Bestimmung der Viabilität von Zellen. Dieser Assay gestattet die quantitative Messung der Zellproliferation oder der zytotoxischen Eigenschaften von Substanzen.

Die Methode basiert auf der Fähigkeit, von metabolisch aktiven Zellen den pH-abhängigen, wasserlöslichen, nicht-toxischen REDOX-Indikator irreversibel zu reduzieren. Die oxidierte Form (Resazurin) ist blau und fluoresziert nicht, die reduzierte Form (Resorufin) ist rot und fluoresziert. Die zytotoxischen Stoffe senken die metabolische Aktivität und das Redoxpotential der Zelle, was zum Verlangsamen oder Beenden der Reduktion des blauen Farbstoffes Resazurins führt¹²⁴. Der Farbumschlag kann photometrisch gemessen werden.

Die Durchführung des Versuches erfolgte in HEK293T-TSHR-Zellen in 96-Wellplatten. Hierfür wurden 80000 Zellen/Well ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80-90% kultiviert. Nach 48h erfolgte die Inkubation der Zellen mit steigender Substanzkonzentration für 18h. Anschließend wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und REDOX-Indikator (Verdünnung 1:10) zu den Zellen pipettiert. Die photometrische Bestimmung erfolgte nach einer einstündigen Inkubation der Zellen bei 37°C und CO₂-Begasung. Als Excitationswellenlänge wurden 530 nm und als Emissionswellenlänge 600 nm festgelegt. Alle Proben wurden als Triplikate ausgeführt. Die unbehandelten Zellen wurden als positive Kontrolle mitgeführt, die negativen Kontrollen stellen durch Austrocknung abgestorbene Zellen dar. Die behandelten Zellen wurden in Relation zu den Unbehandelten gesetzt.

5.3.5. HTS

Für die Identifizierung des TSHR-Antagonisten wurde ein HTS durchgeführt. Hierfür wurde die Enzyme Fragment Complementation (EFC)-Technologie (DiscoverX) verwendet. Die EFC-Technologie ist ein kompetitiver Assay, der eine schnelle Bestimmung des zellulären cAMP in 384-Wellplatten Format ermöglicht.

5.3.5.1. EFC-TECHNOLOGIE

Der EFC-Methode liegt die enzymatische Aktivität der β -Galaktosidase, isoliert aus *E. coli*, zugrunde. Das Enzym β -Galaktosidase ist in zwei Fragmente separiert, in ein großes Fragment, dem Enzym-Akzeptor (EA), und ein kleines Enzymfragment, dem Enzym-Donor (ED). Das ED-Fragment ist an ein synthetisches cAMP (ED-cAMP) gekoppelt und konkurriert mit dem zellulären cAMP um eine cAMP-Antikörper-Bindestelle. Die einzelnen Enzymfragmente sind nicht funktionell, aber in der Lösung bilden sie ein aktives Enzym. Ungebundenes ED-cAMP ist frei und bildet zusammen mit EA ein aktives Enzym. Das aktive Enzym ist in der Lage, ein Substrat zu spalten. Die Substrathydrolyse führt zu einem Lumineszenzsignal. Die Signalintensität ist proportional zur Menge an cAMP im Zellysate^{125–127}.

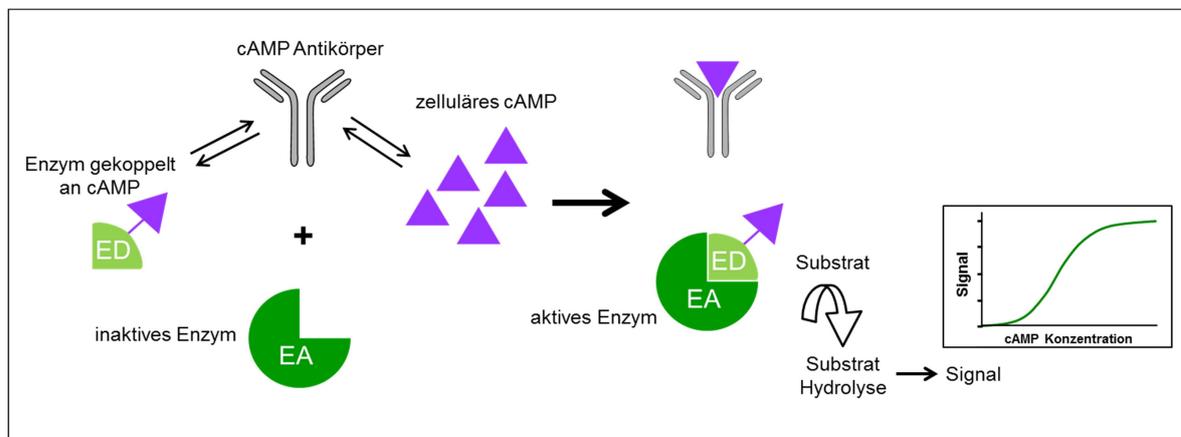


Abbildung 5-1: Schematische Darstellung des Prinzips der EFC-Technologie.

5.3.5.1.1. DURCHFÜHRUNG UND ALLGEMEINER ASSAY-ABLAUF

Die Durchführung des HTS, des *Pilot-Screening* sowie alle für die HTS-Optimierung durchgeführten Tests, erfolgten in CHO-K1-TSHR-Zellen. Puffer und Lösungen des EFC-Assays wurden nach Instruktionen des Herstellers behandelt und eingesetzt (Tabelle 5-24). Die Zellaussaat und die durchgeführten Waschschrte wurden mithilfe von EL406 Dispensor (BioTek) durchgeführt. Die Zugabe und Transfer von Puffer, Lösungen und Substanzen erfolgte durch EL406-Dispensor oder Freedom EVO[®]-Worktable (Tecan). Das Lumineszenzsignal wurde mittels Tecan Safire II Reader detektiert.

Insgesamt wurden 16544 Substanzen aus der ChembioNet Substanzbibliothek des Leibniz-Instituts für Molekulare Pharmakologie (FMP) auf deren antagonistische Wirkung auf TSHR getestet, dies entspricht 47x384 Wellplatten. Die Reihe 23 jeder Platte stellt die Negativkontrolle dar, die Reihe 24 jeder Platte stellt die Positivkontrolle dar. Jede getestete Substanz im HTS wurde als *Single-Point* gemessen. Alle getesteten Substanzen lagen als Lösung in DMSO vor.

Die entsprechende Zellzahl von CHO-K1-TSHR-Zellen (2000-20000 Zellen/Well) wurde in 384 Wellplatten mit Hilfe des EL406-Dispensor ausgesät und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Der Assay wurde 24h nach der Zellaussaat durchgeführt. Mit Hilfe des EL406-Dispensor wurde das das Wachstumsmedium von den Zellen entfernt. Anschließend erfolgte die Zugabe von *Antibody working solution* und den entsprechenden Substanzen (0,2 µl/ Well, mit der Endkonzentration von 50 µM/ Well). Die Zellen wurden 1h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit bTSH (EC_{80} -Wert $9,8 \times 10^3$ IU/ l) stimuliert und für 1h bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgten die Zugabe von *ED/Lysis/CLSubstrate working solution* und eine Inkubation für 1h bei RT. Als letzter Schritt wurde das *EA Reagent* zugegeben und über Nacht bei RT im Dunklen inkubiert. Das Lumineszenzsignal wurde mittels Tecan Safire II Reader detektiert.

Tabelle 5-24: Puffer und Lösungen für die Durchführung des ECF-Assays.

Name	Zusammensetzung
Antibody working solution	2xZellassaypuffer 1xAntibody Reagent stabil für 24h bei RT
ED/Lysis/CL Substrate working solution	1xGalacton-Star 5xEmerald-II 19xLysis Puffer gründlich und vorsichtig mischen stabil für 5 Tage bei 4 °C 25x ED Reagent (1x cAMPXS/ED Reagent und 1x CL Substrat) stabil für 24h bei RT
EA Reagent	–
Zellassaypuffer	1xHBSS 10mM Hapes in H ₂ O

5.3.5.1.2. ETABLIERUNG UND OPTIMIERUNG DES ECF

Vor der Durchführung des HTS wurde die optimale Zellzahl bestimmt und die optionalen Waschschrte getestet. Des Weiteren wurden Z-Faktor und Z'-Faktor zur Beurteilung des Messfensters und der Assay-Qualität ermittelt.

5.3.5.1.3. BESTIMMUNG DER OPTIMALEN ZELLZAHL

Die Bestimmung der optimalen Zellzahl wurde anhand der Konzentrations-Wirkungskurven erstellt. Hierfür wurden unterschiedliche Zellzahlen der CHO-K1-TSHR-Zellen (2500; 5000; 10000 und 20000 Zellen/Well) ausgesät und über Nacht bei 37 °C kultiviert. 24h danach wurden die Zellen mit steigenden bTSH-Konzentrationen stimuliert und zelluläres cAMP mit dem EFC-Assay bestimmt (Kapitel 5.3.5.1.1). Es erfolgte keine Substanzzugabe. Das Signal wurde im Lumineszenzdetektor gemessen und ausgewertet. Die Signalstabilität wurde überprüft, indem die Messung zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgte, nach einer 3-stündigen Inkubationszeit und nach einer Inkubation über Nacht.

5.3.5.1.4. OPTIMIERUNG DER WASCHSCHRITTE

Um die komplette Entfernung des Wachstumsmediums von den Zellen zu gewährleisten, wurde ein optionaler Waschschrift getestet. Hierfür wurden 4x384 Wellplatten (2x10000 und 2x20000 Zellen/Well) mit CHO-K1-TSHR-Zellen ausgesät und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Nach Entfernung des Wachstumsmediums von den Zellen wurden diese vor der Zugabe des *Antibody working solution* einmal mit PBS gewaschen. Die Entfernung von Medium und die PBS-Zugabe erfolgten mittels EL406-Dispensor. Es erfolgte keine Substanzzugabe. Der anschließende Assay wurde nach dem oben beschriebenen Protokoll (Kapitel 5.3.5.1.1) durchgeführt.

5.3.5.1.5. Z-FAKTOR UND Z'-FAKTOR

Der Z'-Faktor ist ein statistischer Parameter zur Beurteilung der Assay-Qualität und wird anhand der Positiv- und Negativkontrollen ermittelt. Ein Assay ist geeignet, wenn der Z'-Faktor im Bereich von 0,5 bis 1 liegt¹²⁸. Der Z-Faktor stellt ein Kontrollmaß für die Signaltrennung auf einer Platte dar, ermöglicht aber auch den Vergleich zwischen den Platten in Bezug auf die Signalisierung. Der Z-Faktor ergibt sich aus dem ein Verhältnis der dreifachen Standardabweichung zu Mittelwerten der Probe und der Kontrolle (Formel 5-2; A)¹²⁹. Ein Z-Faktor von 1 gilt als ideal¹²⁸.

<p>A</p> $Z = 1 - \frac{3 * (\sigma_p + \sigma_k)}{ \mu_p - \mu_k }$	<p>B</p> $Z' = 1 - \frac{3 * (\sigma_{k+} + \sigma_{k-})}{ \mu_{k+} - \mu_{k-} }$
--	---

Formel 5-2: Gleichung zur Ermittlung des Z-Faktors (A) bzw. Z'-Faktors (B). σ ist die Standardabweichung, μ ist der der Mittelwert, p=Probe; k=Kontrolle; + steht für positive Kontrolle; -für negative Kontrolle.

Für die Bestimmung der beiden Parameter wurden 4x384-Wellplatten mit CHO-K1-TSHR-Zellen (15000 Zellen/Well) ausgesät und nach Protokoll (Kapitel 5.3.5.1.1) behandelt. Das Signal wurde im Lumineszenzdetektor gemessen und ausgewertet. Die Ermittlung des Z-Faktors bzw. Z'-Faktors erfolgte anhand der Formel 5-2:.

5.3.5.1.6. PRIMÄRES SCREENING

Die Durchführung des primären Screenings erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll (Kapitel 5.3.5.1.1). Es wurden 15000 Zellen/Well eingesetzt und ein Waschritt vor der Zugabe der Substanzen durchgeführt.

5.3.5.2. HIT-VALIDIERUNG

Die Hit-Validierung erfolgte anhand der Konzentrations-Wirkungskurven. Hierfür wurden CHO-K1-TSHR-Zellen (15000 Zellen/Well) ausgesät und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Der Assay wurde 24h nach der Zellaussaat nach oben beschriebenen Protokoll (Kapitel 5.3.5.1.1) durchgeführt. Für die Bestimmung der konzentrationsabhängigen Inhibierung der Substanzen wurde ein Konzentrationsbereich von 0,196 µM bis 50 µM eingesetzt.

Die Auswahl der Substanzen erfolgte anhand der IC_{50} -Werten, der Standardabweichung vom IC_{50} -Wert und der Differenz der relativen Aktivität. Der IC_{50} -Wert ist die Konzentration eines Inhibitors, bei der eine halbmaximale Inhibition beobachtet wird. Die Standardabweichung vom IC_{50} -Wert sollte dabei kleiner sein als der IC_{50} -Wert selbst.

Des Weiteren wurde die Differenz der relativen Aktivität der extrapolierten Start-Asymptote des IC_{50} -Fits (niedrigste eingesetzte Substanzkonzentration) und der relativen Aktivität der extrapolierten End-Asymptote (höchste eingesetzte Substanzkonzentration) des IC_{50} -Fits bestimmt. Dieser Wert sollte theoretisch 100% betragen. Bei den Reaktionen, die auch beim Einsetzen hoher Substanzkonzentrationen nicht komplett inaktiviert werden, kann dieser Wert unter 100% liegen (z. B. 85%). Oft ist es möglich, einen Fit in eine Serie von Punkten zu legen um einen IC_{50} -Wert zu bestimmen, obwohl keine signifikante Reduktion der Aktivität zu beobachten ist. Aus diesem Grund sollte für eine IC_{50} -Wert-Bestimmung die Differenz der relativen Aktivitäten mindestens 25% betragen.

5.3.5.3. AUSSCHLUSS FALSCH POSITIVER HITS

Der Ausschluss falsch positiver Hits wurde in TSHR-freien CHO-K1-Zellen durchgeführt. Die Stimulation der Zellen erfolgte durch Forskolin, was eine direkte Aktivierung der Adenylylzyklase zu Folge hat. Als erstes wurde eine Konzentrations-Wirkungskurve für Forskolin erstellt und der EC_{80} -Wert (23,4µM/L) bestimmt. Alle weiteren Schritte wurden nach Protokoll (Kapitel 5.3.5.1.1) durchgeführt.

5.3.6. MIKROSKOPISCHE METHODEN AN LEBENDEN ZELLEN

5.3.6.1. LASER SCANNING MIKROSKOPIE (LSM)

Die konfokale LSM ist eine mikroskopische Analyse, die Untersuchungen an lebenden Zellen ermöglicht, und erlaubt Messungen mit bis zu drei unterschiedlichen Fluoreszenzen.

In dieser Arbeit wurde mittels LSM die Verteilung der der TSHR-Konstrukte in der Zelle ermittelt. Hierfür wurden HEK293T-Zellen in 6-Wellplatten, bestückt mit 32 mm Deckgläschen, ausgesät (2×10^5 Zellen/Well) und nach 24h mit entsprechenden TSHR-Konstrukten transient transfiziert. Alle verwendeten Konstrukte sind N-terminal mit GFP fusioniert. Der Plasmamembranmarker Trypanblau markiert die Zellmembran. Die Visualisierung erfolgte 24h nach der Transfektion. Es wurde ein Zwei-Kanal-Bild der GFP-markierten Rezeptoren und der Fluoreszenz des Plasmamembranmarkers Trypanblau mittels LSM 510 META (Zeiss) erstellt. Alle mikroskopischen Arbeiten erfolgten bei RT, die Aufnahmen wurden mit einem 100x /1,3-Objektiv (mit Öl) bei $\leq 0,9 \mu\text{m}$ (Optische Schichtdicke) erzeugt. Die GFP-Konstrukte wurden mittels Argon-Laser (λ_{exc} : 488 nm; 500–530 nm Bandfilter), der Plasmamembranmarker Trypanblau mittels Helium-Neon-Laser (λ_{exc} : 543 nm; 560 nm Bandfilter) angeregt und visualisiert. Die Bildaufnahmen wurden mit der ZEN 2012-Software analysiert.

5.3.7. SPEZIFISCHE BASALE AKTIVITÄT

Zwischen der basalen Aktivität des Rezeptors und dessen Oberflächenexpression besteht ein linearer Zusammenhang. Die spezifische basale Aktivität (SBA) beschreibt die basale cAMP-Akkumulation nach einer Normalisierung der Basalwerte der einzelnen Konstrukte an deren Zelloberflächenexpression und setzt damit Kenntnisse über die Oberflächenexpression und Basalaktivität des jeweiligen Konstruktes voraus. Die Bestimmung der SBA ermöglicht einen Vergleich der Signalisierung zwischen TSHR-Wildtyp (WT) und TSHR-Mutanten^{57,130,131}.

Die SBA wurde wie folgt berechnet¹³¹:

$$\text{SBA} = \frac{(\text{cAMP Mutante-cAMP Vektor})/(\text{Ex(FI) Mutante-Ex(FI) Vektor})}{(\text{cAMP WT-cAMP Vektor})/(\text{Ex(FI) WT-Ex(FI) Vektor})}$$

Formel 5-3: Gleichung zur Ermittlung der SBA. cAMP – hier basale cAMP-Konzentration; Ex(FI) – mittlere Fluoreszenzintensität pro Zelle als Maß der Oberflächenexpression des Rezeptors.

5.3.8. HOMOLOGE MOLEKÜLMODELLE DES TSHR

Die in dieser Arbeit verwendeten TSHR 3D-Homologiemodelle wurden von Dr. Gunnar Kleinau generiert⁶⁹. Das Homologiemodell der inaktiven Struktur der TSHR-Transmembrandomäne basiert auf der Kristallstruktur von Rhodopsin (Proteindatenbank-Zugangscode: 1F88, 2I35, 2J4Y). Das Modell des aktiven Zustandes beruht auf der Kristallstruktur von Opsin (Proteindatenbank-Zugangscode: 3CAP). Die intra- und extrazellulären Schleifen wurden anhand von bekannten Peptidstrukturen modelliert (PDB 3D-Datenbank; Brookhaven National Laboratory; Brookhaven; USA). Lücken in der Schleifenstruktur wurden mit dem in Sybyl 8.1 integrierten Programm „Loop search“ (Tripos Inc., St. Louis, USA) geschlossen. Basierend auf Sequenzvergleichen, welche mit Hilfe des Programms SeqLab (Wisconsin Package, Version 10.2, Accelrys Inc., San Diego, USA) durchgeführt wurden, konnten einige TSHR-spezifische Korrekturen vorgenommen werden⁶⁹. In Rhodopsin und Opsin interagieren zwei aufeinanderfolgende Threoninseitenketten mit dem Helixrückgrat vorangegangener Aminosäurereste, was zu einer Wölbung der TMH2 führt. Im TSHR gibt es diese beiden aufeinanderfolgenden Threoninreste nicht, daher ist eine reguläre α -helikale Struktur der TMH2 naheliegend, die sich bis zur Position 2.71 fortsetzt. Anschließend wurden die Aminosäureseitenketten und die Schleifen der Homologiemodelle mittels Energiedynamiksimulation im Amber 8.0 Kraftfeld auf eine minimale Energieänderung von $\Delta E < 0,05 \text{ kcal}/(\text{mol} \cdot \text{\AA})$ optimiert¹³². Die Qualität und Stabilität der Modelle konnte mit Procheck bestätigt werden¹³³.

Um den Vergleich mit anderen GPCR zu ermöglichen, wurde sowohl das Aminosäurenummerierungsschema des gesamten TSHR mit seinem Signalpeptid, als auch die Ballesteros-Weinstein-Nomenklatur für die Familie A der GPCR verwendet¹³⁴.

Die Bilder der Homologiemodelle wurden mit dem Grafikprogramm PyMol erstellt (Version 0,99; Schrödinger, LLC).

5.3.9. BALLESTEROS-WEINSTEIN-NOMENKLATUR

Die Ballesteros-Weinstein-Nomenklatur dient der Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen unterschiedliches GPCR im α -helikalen transmembranären Bereich¹³⁵. Die Zahl vor dem Punkt gibt die Nummer der α -Helix an. Die Zahl nach dem Punkt ist die Position der jeweiligen Aminosäure innerhalb der Helix. Diese Angabe erfolgt in Korrelation zu einer hochkonservierten Aminosäureposition in jeweiliger Helix, welche willkürlich als 50 definiert ist^{134,135}.

6. ERGEBNISSE

6.1. KLÄRUNG DES EINFLUSSES VON ALANIN AN DER POSITION 593 (5.50) AUF DIE TSHR-KONFORMATION

Innerhalb der Familie A der GPCR ist das Prolin an Position 593 (Position^{5.50} nach der Ballesteros-Weinstein-Nomenklatur) in der TMH5 eine hochkonservierte Aminosäure¹³⁶. Das ursprünglich benutzte Homologiemodell des TSHR basierte auf der Kristallstruktur des Rhodopsin-Rezeptors, welcher an dieser Position ein Prolin enthält und eine Aufweitung der helikalen Rückgratstruktur aufweist. Mutationseffekte für einige Reste an der TMH5 stimmten jedoch nicht mit diesem Modell überein. Bei den Glykoproteinrezeptoren befindet sich an der Position 5.50 ein Alanin. Es ist allgemein bekannt, dass Prolin einen Einfluss auf die Strukturfaltung von Proteinen hat. Diese Aminosäure kann sowohl die reguläre Struktur von α -Helizes als auch die von β -Faltblätter unterbrechen¹³⁷.

Alanin hingegen stört die regulären alphahelikalen Strukturen nicht. Um zu klären, welchen funktionalen Einfluss die Position A^{5.50} an der TMH5 des TSHR besitzt, wurden Aminosäuresubstitutionen an Position 593^{5.50} durchgeführt und funktionell charakterisiert. Die Ergebnisse wurden zur Überarbeitung und Korrektur des TSHR-Homologiemodells (bearbeitet von G. Kleinau) genutzt.

6.1.1. DIE FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER TSHR-MUTANTEN

Der Austausch des Alanins 593 gegen Prolin, Glycin und Valin erfolgte mittels zielgerichteter Mutagenese (QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kits). Die Punktmutationen wurden durch Sequenzierung nachgewiesen und damit gleichzeitig sichergestellt, dass keine zusätzlichen Sequenzveränderungen in der TSHR-Sequenz vorhanden waren. Anschließend wurden die TSHR-Mutanten charakterisiert.

Die Basalaktivität des Rezeptors und dessen Oberflächenexpression stehen in linearem Zusammenhang¹³⁵. Um die Signalisierungsergebnisse zwischen dem wildtypischen TSHR und den TSHR-Mutanten vergleichen zu können, wurde zuerst die Oberflächenexpression der Rezeptoren bestimmt. Diese sollte Aufschluss über den Einfluss der eingeführten Mutationen auf die Rezeptorfaltung und den Rezeptortransport an die Zelloberfläche geben.

6.1.1.1. BESTIMMUNG DER OBERFLÄCHENEXPRESSION DER TSHR-MUTANTEN

Die Analyse der Oberflächenexpression der Mutanten wurde mithilfe von fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Visualisierung der an der Plasmamembran

exprimierten Rezeptoren erfolgte nach transienter Transfektion der TSHR-Konstrukte in HEK293T-Zellen durch Antikörpermarkierung.

Gemessen wurde die mittlere Fluoreszenz jeder einzelnen Zelle als Maß für die Oberflächenexpression des Rezeptors. Die Fluoreszenzintensität korreliert mit der Anzahl der exprimierten Rezeptoren an der Plasmamembran. Die Auswertung wurde mit FCSEXPRESS V3 durchgeführt und die Graphen in GraphPrism Version 5.04 erstellt.

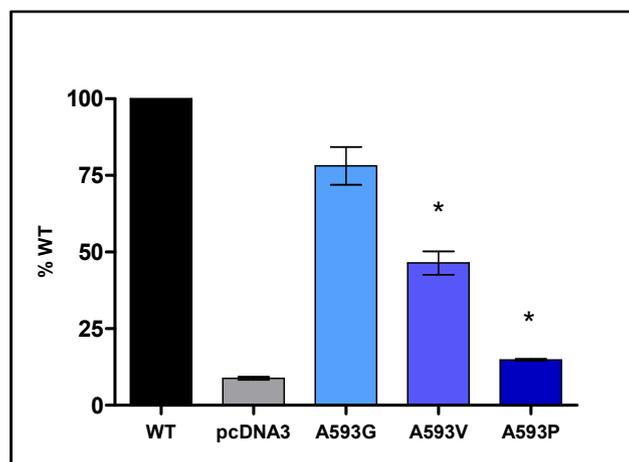


Abbildung 6-1: Durchflusszytometrische Analyse zur Bestimmung der Oberflächenexpression des wildtypischen TSHR und der TSHR-Mutanten in transient transfizierten HEK293T-Zellen. Die Markierung der Rezeptoren an der Zelloberfläche erfolgte mittels eines primären monoklonalen TSHR-spezifischen Antikörpers (Maus-anti-hTSHR, MCA 1281, AbD Serotec), als Sekundärantikörper diente ein DyLight488-konjugierter Ziege-anti-Maus IgG (AbD Serotec). Gemessen wurde die mittlere (relative) Fluoreszenzintensität je Zelle. Die Werte des mitgeführten WT wurden mit 100% gleichgesetzt und die Ergebnisse der Mutanten wurden dementsprechend normiert. Jeder Datenpunkt wurde als Doppelwert in zwei voneinander unabhängigen Experimenten bestimmt. Angegeben ist der jeweilige arithmetische Mittelwert \pm SD. Die Ergebnisse mit einem Signifikanzniveau $p < 0,05$ sind durch * gekennzeichnet.

Die Oberflächenexpression der Mutante A593G ist mit dem WT vergleichbar. Die Mutanten A593V und A593P zeigen hingegen ein signifikant verringertes Expressionsniveau im Vergleich zum wildtypischen TSHR. Insbesondere die A593P-Mutante führt zu einer 20-fachen Abnahme der Rezeptoren an der Oberfläche im Vergleich zum TSHR-WT.

6.1.1.2. BESTIMMUNG DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION DER TSHR-MUTANTEN

Die Analyse der Oberflächenexpression lässt darauf schließen, dass der Austausch von Alanin gegen Prolin zu einer Rezeptorfehlfaltung führt. Die fehlgefalteten Rezeptoren werden durch die Qualitätskontrolle der Zelle erkannt und durch die ER-assoziierte Proteolyse abgebaut. Die konfokale LSM erlaubt eine Analyse der subzellulären Lokalisation der Rezeptoren.

Hierfür wurden die Konstrukte TSHR-WT und TSHR-A593P N-terminal mit GFP fusioniert und transient in HEK293T-Zellen exprimiert. Die Markierung der Zellmembran mit dem Plasmamembranmarker Trypanblau erlaubt Kolokalisationsstudien der GFP-markierten

Rezeptoren mit der Zellplasmamembran. 24h nach der Transfektion wurde ein Zwei-Kanal-Bild der Rezeptorfluoreszenz und der Fluoreszenz des Plasmamembranmarkers Trypanblau (Abbildung 6-2) mittels LSM detektiert.

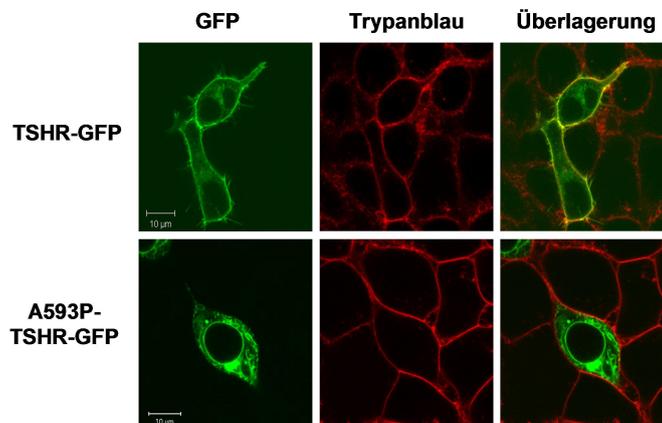


Abbildung 6-2: Mikroskopische Untersuchung der subzellulären Lokalisation der GFP-fusionierten TSHR in transient transfizierten HEK293T-Zellen. Die GFP-Fluoreszenzsignale der Rezeptoren sind in grün, die Signale des Plasmamembranmarkers Trypanblau sind in rot visualisiert. Die Kolorisation der Rezeptoren mit der Plasmamembran ist durch die gelbe Färbung in der Überlagerung der beiden Kanäle angezeigt. Die Bilder zeigen repräsentative Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. (Größenmaßstab = 10 µm).

TSHR-GFP zeigt eine deutliche Kolorisation (Abbildung 6-2, Überlagerung) mit der Plasmamembran. Im Gegensatz zum WT ist die TSHR-Mutante A593P-GFP nur im intrazellulären Bereich detektierbar. Dieses Ergebnis der LSM-Analyse stimmt mit den Ergebnissen der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Oberflächenexpression überein.

6.1.1.3. UNTERSUCHUNG DES GLYKOSYLIERUNGSSTATUS DER TSHR-MUTANTEN

Der Glykosylierungsstatus eines Proteins kann Aufschluss über die korrekte Faltung, Transport und Lokalisation innerhalb des sekretorischen Weges geben.

Die experimentellen Daten der Durchflusszytometrie und der konfokalen LSM lassen vermuten, dass die A593P-Mutante nicht korrekt gefaltet ist und nicht transportiert werden kann. Aus diesem Grund wurde der Glykosylierungsstatus dieser Mutante im Vergleich zum WT bestimmt.

Der TSHR besitzt sechs potentielle N-Glykosylierungsstellen⁶¹. Im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und im frühen Golgi-Apparat werden mannosereiche Glykosylierungen angefügt, und im medialen Golgi-Apparat werden diese zu einer komplex-glykosylierten Form umgebaut.

Der Glykosylierungsstatus wurde mittels Glykosidaseverdau bestimmt. Endoglykosidase H (Endo H) spaltet nur mannosereiche Glykosylierungen. Die Peptid-Endoglykosidase F

(PNGase F) ist in der Lage, sowohl die mannosereiche als auch komplexe Glykosylierungen abzuspalten.

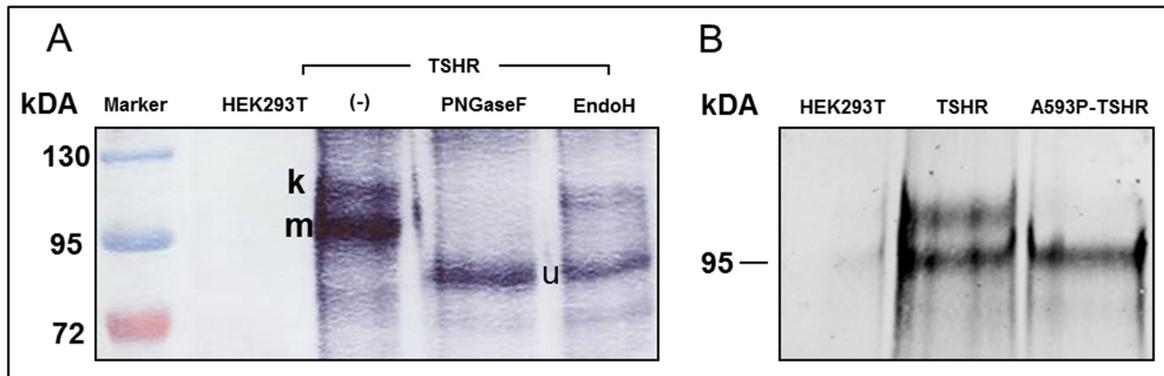


Abbildung 6-3: Zuordnung der Proteinbanden im Western Blot nach Deglykosylierung; HEK293T-Zellen wurden transient mit TSHR-Konstrukten transfiziert, die Zelllysate wurden über Immunpräzipitation gereinigt und die Immunpräzipitate einem Glykosidaseverdau mit den Glykosidasen PNGase F und Endo H unterzogen. Die Rezeptoren wurden mit Antikörpern gegen die N-terminale Domäne und einem AP-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. A) Glykosylierungsstatus des wildtypischen TSHRs, vor und nach Glykosidaseverdau; B) Vergleich des Glykosylierungsstatus zwischen wildtypischem TSHR und der Mutante A593P; k – komplex glykosylierte Form des TSHRs, m – mannosereiche Form des TSHRs, u – unglykosylierte Form des TSHRs.

Der Western Blot zeigt drei unterschiedlich große Proteinbanden für den wildtypischen TSHR. Die 100 kDa große Bande (Abbildung 6-3 A) entspricht der mannosereichen Form des Rezeptors. Nach Endo H-Verdau ist eine 84 kDa große Proteinbande detektierbar (Abbildung 6-3 A). Diese stellt die unglykosylierte Form des TSHR dar.

Nach PNGase F-Verdau ist nur die unmodifizierte Form nachweisbar (84 kDa; Abbildung 6-3 A). Die 120 kDa große Proteinbande entspricht der komplex-glykosylierten Form des TSHR.

Die Analyse des Glykosylierungsstatus der A593P-Mutante ergab nur eine Proteinbande von 100 kDa. Diese Proteinbande entspricht der mannosereichen Glykosylierungsform des Rezeptors, die charakteristisch für unreife Rezeptoren im ER und frühen Golgi-Apparat ist.

Zusammenfassend zeigen die Daten der Durchflusszytometrie, der LSM und die Ergebnisse der Analyse des Glykosylierungsstatus, dass die Einführung eines Prolins an der Position A593 zu einer stark verringerten Oberflächenexpression führt.

6.1.1.4. MESSUNG DER cAMP-AKKUMULATION DER TSHR-MUTANTEN

Um herauszufinden, ob der Austausch von Alanin an der Position 593 durch Glycin, Valin und Prolin einen Einfluss auf die Signaltransduktion (biologische Aktivität) des TSHR hat, wurde die Konzentration des sekundären Botenstoffes cAMP bestimmt. Nach Stimulation des Rezeptors durch Bindung des Agonisten kommt es zu einer Änderung der Rezeptor-

konformation und zur Aktivierung der membranständigen Adenylylcyclase, die ATP in cAMP umwandelt. Die cAMP-Konzentration wurde mit Hilfe eines cAMP-Radioimmunoassays (cAMP-RIA) bestimmt. Der TSHR besitzt eine erhöhte basale Aktivität¹³⁸, d.h. auch ohne Ligandenstimulation kommt es zu einer G_s-vermittelten cAMP-Produktion. Es wurden die basale und maximale cAMP-Bildung und die TSH-Konzentration bei halbmaximaler Rezeptorstimulation (EC₅₀) gemessen (Tabelle 6-1).

6.1.1.4.1. KONZENTRATIONS-WIRKUNGSKURVEN DER TSHR-MUTANTEN

Für jede TSHR-Mutante und den TSHR-WT wurden Konzentrations-Wirkungskurven ermittelt. Die Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration erfolgte nach einer Stimulation mit ansteigenden Konzentrationen an bTSH in transient transfizierten HEK293T-Zellen.

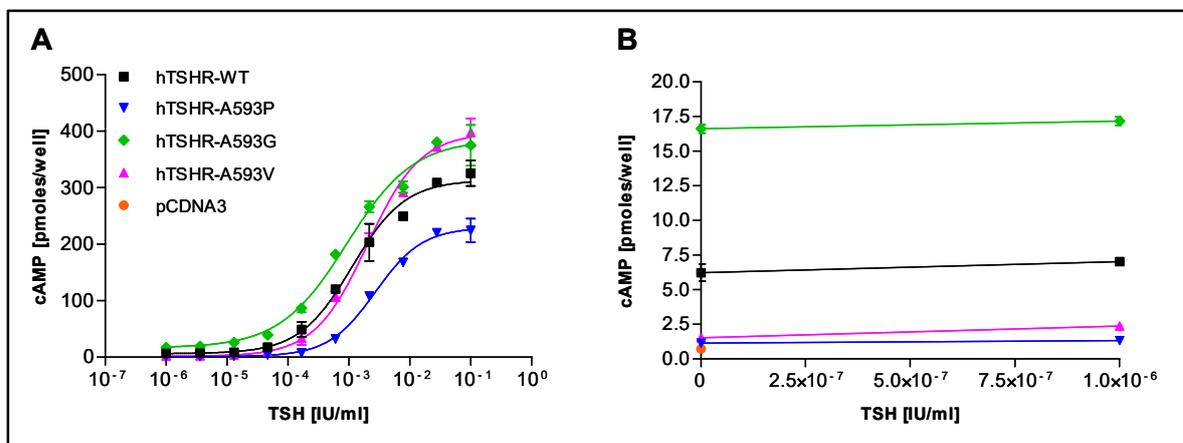


Abbildung 6-4: Radioimmunologische Analyse zur Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration mit und ohne Stimulation durch bTSH in transient transfizierten HEK293T-Zellen. A) Konzentrations-Wirkungskurven des wildtypischen TSHR (schwarz) und der TSHR-Mutanten in Abhängigkeit von der bTSH-Konzentration. B) cAMP-Basalwerte ohne bTSH-Stimulation. Jeder Datenpunkt wurde als Doppelwert bestimmt. Angegeben ist der jeweilige arithmetische Mittelwert \pm Standardabweichung.

Die Mutanten A593V und A593G erreichen nach Stimulation mit bTSH ein maximales Aktivitätsniveau, das mit dem WT vergleichbar ist (Tabelle 6-1). Die maximale Aktivität des WT konnte von der A593P-Mutante nicht erreicht werden. Die jeweils ermittelten EC₅₀-Werte der drei Mutanten sind mit dem des WT vergleichbar (Tabelle 6-1). Die Mutanten A593V und A593P zeigen eine fünffach niedrigere Basalaktivität als der WT. Hingegen ist bei der Mutante A593G verglichen mit dem WT der Basalwert zweifach höher. Unter der Berücksichtigung des linearen Zusammenhangs zwischen Basalaktivität und Zelloberflächenexpression wurde die spezifische basale Aktivität (SBA) für jede Mutante ermittelt. Die Mutanten A593P (SBA 3,17) und A593G (SBA 2,8) sind konstitutiv aktiv. Die Mutante A593V (SBA 0,8) ist mit dem wildtypischen Rezeptor vergleichbar.

Tabelle 6-1: Zusammenfassung der funktionellen Daten. HEK293T-Zellen wurden transient mit dem TSHR-WT oder einer Mutante transfiziert. Die Messung der Rezeptormenge an der Zelloberfläche erfolgte mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie. Die intrazelluläre cAMP-Konzentration nach Stimulation mit bTSH wurde mittels Radioimmunoassay gemessen. Die spezifische basale Aktivität (SBA) beschreibt die basale cAMP-Akkumulation nach Normalisierung der Zelloberflächenexpression. Die Werte für die Oberflächenexpression und maximale Aktivität wurden für den mitgeführten WT mit 100% gleichgesetzt und die Ergebnisse der Mutanten wurden dementsprechend als Prozentsatz des WT angegeben. Die Werte für die basale Aktivität und EC_{50} -Werte wurden für den mitgeführten WT mit 1 gleichgesetzt und die Ergebnisse der Mutanten wurden dementsprechend als das n-fache des WT angegeben. Gezeigt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die EC_{50} -Werte sind als geometrische Mittelwerte mit dem 95%igen Konfidenzintervall angegeben.

	Oberflächen- expression	cAMP-Akkumulation			
		FACS (% von TSHR WT)	basal (n-fach WT)	EC_{50} (n-fach WT)	TSH-Stimulation (% von TSHR WT)
WT	100	1	1	100	1
A593G	76,1 \pm 9,4	2,13 \pm 0,12	0,72 (0,63 – 0,82)	99 \pm 7	2,80
A593V	41,3 \pm 5,4	0,33 \pm 0,10	1,54 (1,32 – 1,80)	103 \pm 14	0,80
A593P	6,6 \pm 0,2	0,19 \pm 0,06	1,87 (0,56 – 2,43)	24 \pm 11	3,17

6.1.2. HOMOLOGIEMODELL DES TSHR

Zu Anfang wurde ein TSHR-Homologiemodell generiert, das auf der Kristallstruktur von inaktivem bovinen Rhodopsin basierte (Gunnar Kleinau). Da im Rhodopsin das Prolin an dieser Position eine Aufweitung bzw. Unterbrechung der regulären α -Helix-Struktur zur Folge hat, wurde diese Rückgrat-Konformation auch auf das ursprüngliche TSHR-Homologiemodell übertragen (Abbildung 6-5, Modell 1 cyan).

In einem überarbeiteten Modell wurde anschließend eine reguläre α -helikale Konformation der TMH5 generiert, die durch das Alanin an dieser Position ermöglicht wird (Abbildung 6-5, Modell 2 orange).

Liegen beide Modelle übereinander, zeigen sich deutlich die unterschiedlichen räumlichen Orientierungen der Seitenketten. Es kommt an der TMH5 zur Verschiebung des Wechselwirkungsregisters. Leucin L587^{5,44} ist im ursprünglichen TSHR-Modell 1 in Richtung der Membran orientiert, im überarbeiteten TSHR-Modell 2 zeigt dieses Leucin L587 zur TMH6 hin und interagiert dort mit L645^{6,56} ⁶⁹. Diese Wechselwirkung in Modell 2 wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Mutationen an beiden Stellen jeweils zur konstitutiven Aktivierung des TSH Rezeptors führen ⁶⁸. Dabei wird sehr wahrscheinlich die Interaktion zwischen TMH5 und TMH6 gestört und es kommt zur konstitutiven Aktivierung des TSHR.

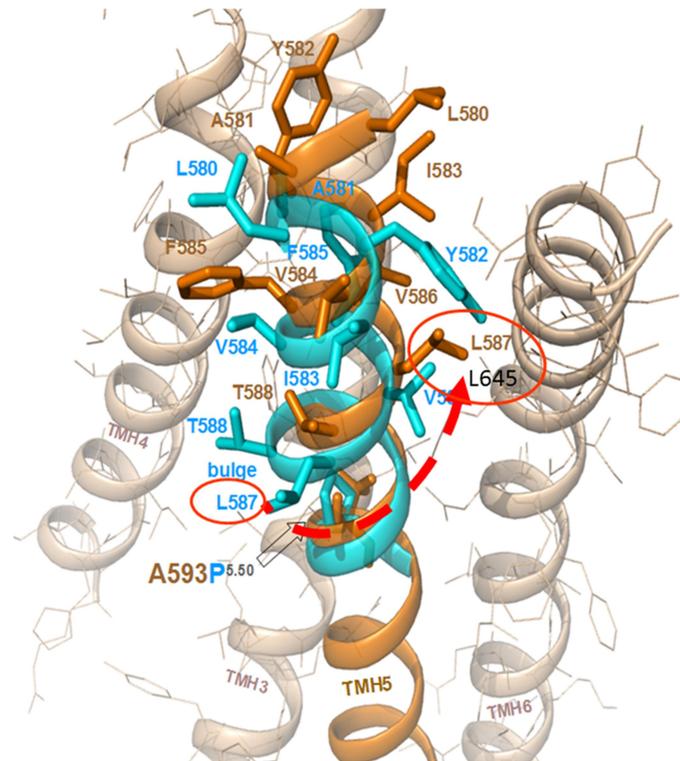


Abbildung 6-5: Homologe Modelle des TSHR. Dargestellt sind zwei übereinander gelagerte potenziell mögliche Konformationen der TMH5 in Abhängigkeit von der Sequenzspezifität an Position 5.50. TSHR-Modell 1 (TMH5 in cyan), basierend auf der Struktur von inaktivem bovinem Rhodopsin, stellt eine Konformation mit Prolin an der Position 593 (5.50 in cyan) dar, die eine Aufweitung der Rückgratstruktur (*bulge*) verursacht. TSHR-Modell 2 (TMH5 in braun) stellt eine reguläre α -Helix-Konformation mit Alanin an der gleichen Position 593 (5.50 in braun A593) dar. Rot eingekreist ist die Aminosäure L587, deren Mutation eine konstitutive TSHR-Aktivierung aufweist. Der rote Pfeil zeigt die unterschiedliche räumliche Orientierung von L587 in Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz.

Alle in diesem Abschnitt erzielten Ergebnisse zeigen, dass das Prolin an Position 593 (5.50) im TSHR strukturell nicht toleriert wird. Dadurch wird die Hypothese unterstützt, dass die TMH5 im TSHR im Gegensatz zu vielen anderen GPCR der Familie A keine strukturelle Aufweitung aufweist, sondern sehr wahrscheinlich als reguläre α -Helix vorliegt.

6.2. IDENTIFIZIERUNG DES TSHR-ANTAGONISTEN

Eine Möglichkeit, der pathologischen Aktivierung des TSHR entgegenzuwirken ist dessen Beeinflussung mittels kleiner Moleküle mit antagonistischer Wirkung. Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Identifizierung eines TSHR-Antagonisten. Hierfür wurde die Substanzbibliothek der Screening Unit des FMP nach neuen TSHR-Antagonisten in einem HTS durchsucht. Die erfolgreichen Hits wurden in einem sekundären Assay validiert. Die ersten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen ausgewählter Hit-Substanzen wurden durch die Charakterisierung ihrer verfügbaren Derivate abgeleitet. Hierfür wurden zum einem ähnliche Substanzen kommerziell erworben, zum anderem wurden durch stereoselektive Synthesen (Kooperation Edgar Specker, FMP Berlin) gezielte Modifizierungen der Hit-Substanzen durchgeführt.

Die Identifizierung des TSHR-Antagonisten erfolgte mittels HTS unter Verwendung der EFC-Technologie (Kapitel 5.3.5.1) ^{125–127}. Dieser kompetitive Assay wurde in CHO-K1-Zellen, die stabil hTSHR exprimierten, im 384-Wellplatten-Format durchgeführt. Zelluläres cAMP wurde nach einer Stimulation der Zellen mit bTSH (EC₈₀-Wert, 2,14 IU/ml) und anschließender Behandlung mit Substanzen aus der Bibliothek (50 µM) ermittelt. Die getesteten Substanzen lagen in DMSO gelöst vor und wurden als *Single-Point* gemessen.

Für die Identifizierung aktiver Verbindungen ist ein hoher Grad an Genauigkeit und Empfindlichkeit des Assays entscheidend. Aus diesem Grund wurden vor der Durchführung des HTS optionale Waschschrte getestet. Ferner wurden die optimale Zellzahl sowie aussagekräftige statistische Qualitäts- und Stabilitätsparameter für den EFC-Assay bestimmt. Die durchgeführte Kalibrierung ermöglichte es, das optimale Messfenster für den antagonistischen Effekt zu ermitteln.

6.2.1. ETABLIERUNG UND OPTIMIERUNG DES ECF-ASSAY

6.2.1.1. STATISTISCHE PARAMETER FÜR HTS

Das ultimative Ziel des HTS ist es, aus einer großen Anzahl getesteter Substanzen die wenigen Verbindungen mit signifikanter biologischer Aktivität für das Zielprotein schnell und präzise zu erkennen. Dieses Ziel stellt gleichzeitig eine Herausforderung dar, da alle getesteten Substanzen im HTS als *Single-Point* gemessen werden. Dadurch sind die Qualität und das Messfenster des HTS für die Identifizierung der aktiven Verbindungen entscheidend. Die beiden Parameter lassen sich mithilfe des Z-Faktors und Z'-Faktors beurteilen ¹²⁹.

6.2.1.2. Z-FAKTOR

Der Z-Faktor, auch als *screening window coefficient* bezeichnet, ist als Verhältnis der dreifachen Standardabweichung zu den Mittelwerten der Probe und Kontrolle definiert. Der Z-Faktor sagt aus, ob das Messfenster des Assays unter definierten Bedingungen groß genug ist, um aktive Verbindungen von inaktiven Verbindungen unterscheiden zu können und ist damit ein Kontrollmaß für die Signaltrennung auf einer Platte ¹²⁹.

Der Z'-Faktor ist ein statistischer Parameter zur Beurteilung der Assay-Qualität. Seine Ermittlung erfolgt anhand positiver und negativer Kontrollen und ist von der Einwirkung der eingesetzten Substanzen unabhängig ¹²⁹.

Die Einschätzung der Eignung des EFC-Assays für die Durchführung des HTS erfolgte in einem *Pilot-Screening*. Hierfür wurden 4x 384-Wellplatten mit CHO-K1-TSHR-Zellen (15000 Zellen/Well) ausgesät und nach Protokoll behandelt (Kapitel 5.3.5.1.1). Die Auswertung ergab, dass sowohl der Z-Faktor als auch der Z'-Faktor im optimalen Bereich lagen. Der Bereich des Z-Faktors lag zwischen 0,62-0,9; für den Z'-Faktor bei 0,89 (Formel 5-2:).

6.2.1.3. SIGNAL-RAUSCH-VERHÄLTNIS

Es wurde überprüft, ob eine der für den Assay erforderlichen Reagenzien die Signalstärke beeinflusst. Dafür wurde nacheinander jedes im Assay verwendete Reagenz durch Zell-Assay-Puffer ersetzt und die Signalstärke gemessen. Das Ergebnis zeigte, dass keine der Reagenzien die Signalstärke beeinflusst. Die Auswertung erfolgte in der Screening Unit.

6.2.1.4. BESTIMMUNG DER OPTIMALEN ZELLDICHTE

Für die Bestimmung der optimalen Zellzahl wurden Konzentrations-Wirkungskurven mit unterschiedlichen Zellzahlen (2500; 5000; 10000 und 20000 Zellen/Well) erstellt. Hierfür wurde die entsprechende Zellzahl ausgesät, mit steigenden bTSH-Konzentrationen stimuliert und zelluläres cAMP mit dem EFC-Assay bestimmt (Kapitel 5.3.5.1.1). Das Signal wurde im Lumineszenzdetektor gemessen und ausgewertet. Die Signalstabilität wurde überprüft, indem die Messung zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgte, nach einer dreistündigen Inkubationszeit und nach einer Inkubation über Nacht.

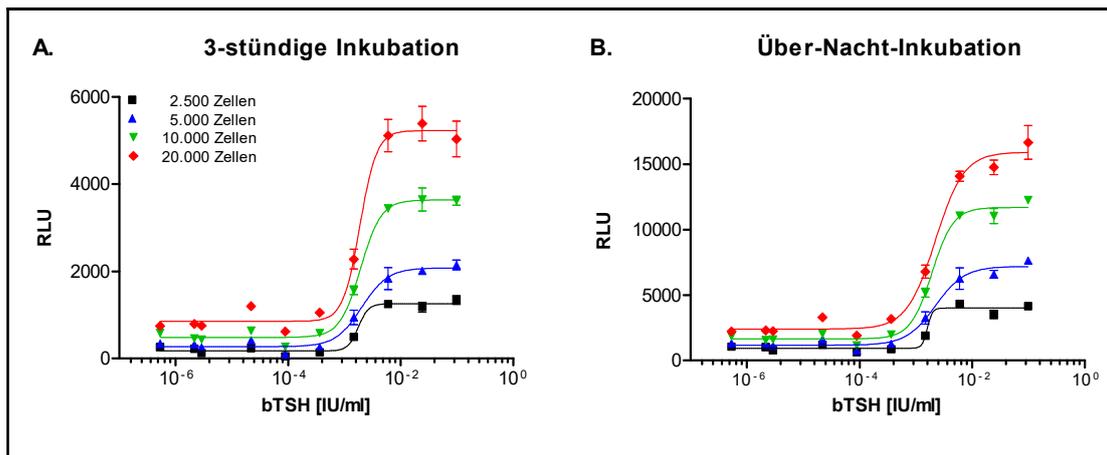


Abbildung 6-6: Konzentrations-Wirkungskurven des wildtypischen TSHR zur Ermittlung der optimalen Zellzahl. Die Bestimmung der cAMP-Konzentration erfolgte in CHO-K1-TSHR-Zellen nach Stimulation mit ansteigenden Konzentrationen an bTSH. A) Signalmessung nach dreistündiger Inkubation. B) Signalmessung nach einer Über-Nacht-Inkubation.

Die Konzentrations-Wirkungskurven aus Abbildung 6-6 zeigen, dass das Signal nach einer Über-Nacht-Inkubation stabil und hoch ist. Das Optimum der Zellzahl liegt zwischen 10000 und 20000 Zellen pro Well. Basierend auf diesem Ergebnis wurden alle weiteren Versuche mit 15000 Zellen pro Well durchgeführt. Das Signal wurde nach einer Über-Nacht-Inkubation mit Lumineszenzdetektor gemessen und ausgewertet.

Gleichzeitig ermöglichen die Konzentrations-Wirkungskurven eine Bestimmung des EC_{80} -Wertes für bTSH. Um die antagonistische Aktivität der Substanzen zu testen, sollte eine bTSH-Konzentration gewählt werden, die zum einen den Rezeptor stark genug stimuliert, um gut messbare Werte zu erhalten, und die zum anderen einen möglichst großen Bereich der Hemmung bietet, um die antagonistische Aktivität der Substanzen differenzieren zu können. Es wurde der EC_{80} -Wert (bTSH-Konzentration 2,14 IU/ml) am oberen Abschluss des linearen Bereiches der Konzentrations-Wirkungskurve genommen.

6.2.1.5. OPTIMIERUNG DER WASCHSCHRITTE

Das Wachstumsmedium kann zu einem verfälschten Signal führen oder die Messung stören. Aus diesem Grund wurde getestet, ob ein zusätzlicher optionaler Waschschritt der Zellen mit PBS erforderlich ist.

Um das Wachstumsmedium komplett von den Zellen zu entfernen, wurden diese vor dem Assay-Beginn einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der Assay durchgeführt (5.3.5.1.1). Das Zelllysat wurde über Nacht bei RT im Dunklen inkubiert und das Lumineszenzsignal am nächsten Tag detektiert.

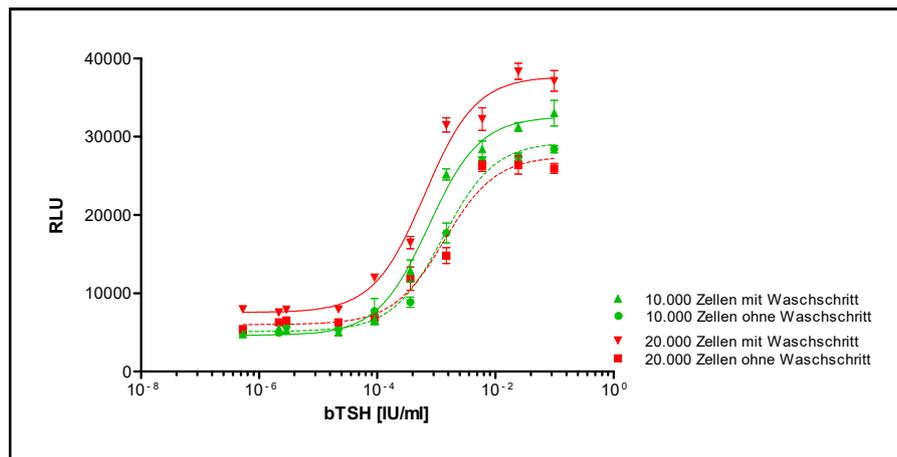


Abbildung 6-7: Konzentrations-Wirkungskurven des wildtypischen TSHRs zur Testung eines optionalen Waschschrilles mit PBS. Die Bestimmung der cAMP-Konzentration erfolgte in CHO-K1-TSHR-Zellen, die mit ansteigenden Konzentrationen an bTSH stimuliert wurden. Die Signalmessung erfolgte nach einer Über-Nacht-Inkubation. Die Zelldichte mit 20000 Zellen pro Well ist rot dargestellt, die Zelldichte mit 10000 Zellen pro Well grün. Die gestrichelten Kurven stellen die jeweilige Messung ohne den Waschschrift mit PBS dar, die durchgehende Kurven die messung mit einem PBS-Waschschrift.

Aus dem Ergebnis (Abbildung 6-7) geht eindeutig hervor, dass ein optionaler Waschschrift vor dem Assay-Beginn zusätzlich das Signal erhöht. Die Durchführung des HTS erfolgte deshalb mit einem zusätzlichen Waschschrift. Dieser wurde vor der Zugabe der Substanzen und der Reagenzien durchgeführt.

6.2.1.6. ERSTELLUNG DER cAMP-STANDARDKURVE

Die Umrechnung der cAMP-Konzentrationen aus dem gemessenen Lumineszenzsignal, angegeben in *relative light units* (RLU), in die Einheit pmol erfolgte anhand einer cAMP-Standardkurve. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe mit definierten Konzentrationen ($2,53 \mu\text{M}$ - $1,28 \times 10^{-4} \mu\text{M}$, empfohlene Angaben des Herstellers, Discover_X) aus synthetischem cAMP erstellt und mittels EFC quantifiziert. Der Assay erfolgte in einem zellfreien System und der Ablauf entsprach den vorher ermittelten Assay-Bedingungen (Kapitel 5.3.5.1.1). Das Lumineszenzsignal wurde zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten, nach einer dreistündigen und nach einer Über-Nacht-Inkubation, gemessen.

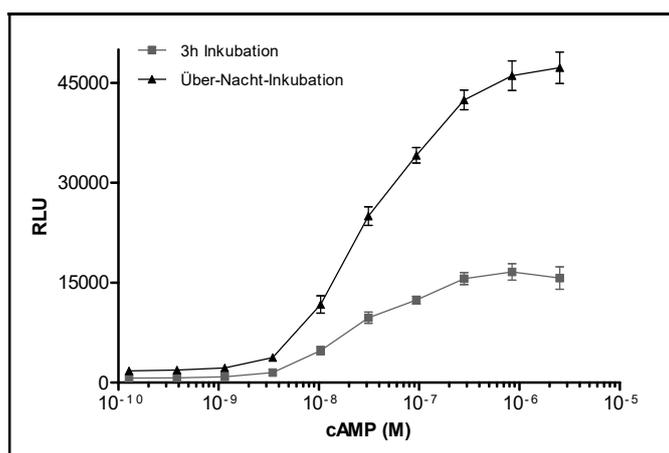


Abbildung 6-8: cAMP Standardkurve. Das Lumineszenzsignal wurde nach einer dreistündigen Inkubation (grau) und nach einer Über-Nacht-Inkubation (schwarz) gemessen. Jeder Datenpunkt wurde als Dreifach-Wert bestimmt. Angegeben ist der jeweilige arithmetische Mittelwert \pm Standardabweichung.

In Abbildung 6-8 sind zwei cAMP-Standardkurven dargestellt, die nach einer unterschiedlich langen Inkubationszeit ermittelt wurden. Das Lumineszenzsignal ist nach einer Über-Nacht-Inkubation (schwarze Kurve) stabil und deutlich höher als nach einer dreistündigen Inkubation (graue Kurve). Dieses Ergebnis bestätigt die im Zellassay ermittelten Daten. Alle Messungen für das HTS wurden nach einer Über-Nacht-Inkubation gemessen.

6.2.1.7. EINFLUSS VON DMSO

Alle im HTS verwendeten Substanzen lagen in DMSO gelöst vor. Der Einfluss von DMSO auf die Signalstärke wurde getestet, indem Zellen ohne Zugabe von DMSO und Zellen mit Zugabe von 1% DMSO Endkonzentration gegeneinander getestet wurden.

Die Auswertung ergab, dass die 1%-ige DMSO-Konzentration in der Zelllösung keinen Einfluss auf die Signalstärke hatte.

6.2.2. PRIMÄRES SCREENING

Es wurden 16544 Substanzen aus der ChembioNet Substanzbibliothek der Screening Unit getestet. Die Durchführung erfolgte nach den oben beschriebenen und ermittelten Voraussetzungen. Es wurden 47 Platten im 384-Wellplatten-Format untersucht. Die Auswertung des primären Screenings erfolgte durch Dr. Martin Neuenschwander (Screening Unit) mit dem *Pipeline Pilot* Programm¹³⁹, welches das gemessene Lumineszenzsignal in eine farbkodierte graphische 2D-Darstellung umwandelt und auswertet (Abbildung 6-9).

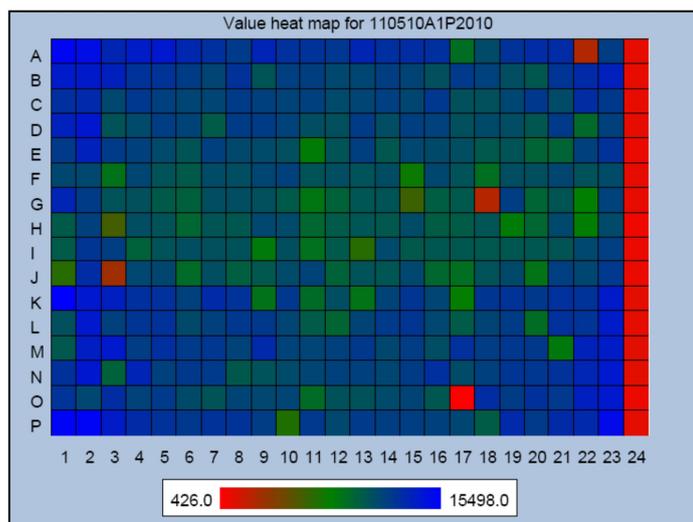


Abbildung 6-9: Dargestellt ist eine 384-Wellplatte aus dem primären Screening (exemplarisch für insgesamt 47 getestete Platten). Die gemessenen Rohdaten sind als 2D-farbkodierte Darstellung präsentiert. Die Farbskalierung zeigt in Richtung Minimalwert (rot) und Maximalwert (blau) der gemessenen cAMP-Konzentration in einem Well. Die Reihe 23 enthält die Negativkontrollen (CHO-K1-TSHR stimuliert mit bTSH, ohne Zugabe von Substanz (blau)). In Reihe 24 sind die positiven Kontrollen zu sehen, (Zellen ohne Stimulation und ohne Substanzzugabe (rot)). Jedes Well stellt eine Einzelpunktmessung (*Single-Point*) für eine getestete Substanz dar.

Der HTS führte zur Identifizierung von 350 Substanzen, die eine antagonistische Wirkung auf den TSHR zeigten. Das gesamte primäre Screening erfolgte als eine *Single-Point*-Messung.

6.2.3. HIT-VALIDIERUNG

Zur Hit-Validierung wurden Konzentrations-Wirkungskurven mit neuen unterschiedlichen Konzentrationen (0,196 μM ; 0,390625 μM ; 0,78125 μM ; 1,5625 μM ; 3,125 μM ; 6,25 μM ; 12,5 μM ; 25 μM ; 50 μM) für die 350 positiv-getesteten Substanzen mit dem EFC-Assay generiert. Es wurden der IC_{50} -Wert, die Standardabweichung vom IC_{50} -Wert und die relative Aktivität bestimmt. Bei der Auswahl der Hits wurden diese Parameter berücksichtigt, dabei sollte die Standardabweichung des IC_{50} -wertes kleiner sein als der IC_{50} -wert selbst und die relative Aktivität sollte mindestens eine 25%-ige Änderung aufweisen.

In Abbildung 6-10 sind exemplarisch Beispiele für eine konzentrationsabhängige Hemmung (Abbildung 6-10 A) und eine konzentrationsunabhängige Hemmung (Abbildung 6-10 B) der cAMP-Produktion dargestellt. Insgesamt zeigten 263 von 350 Substanzen eine konzentrationsabhängige antagonistische Wirkung auf den TSHR.

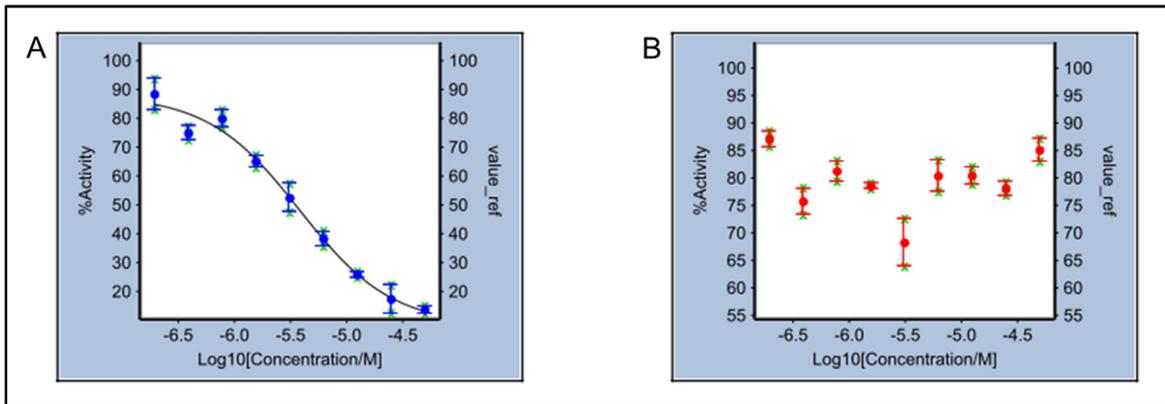


Abbildung 6-10 Konzentrations-Wirkungskurven (exemplarisch dargestellt für insgesamt 350 getestete Substanzen) des wildtypischen TSHRs stimuliert mit bTSH (EC_{80} -Wert) und behandelt mit ansteigenden Konzentrationen an Substanz. Die Signalmessung erfolgte nach einer Über-Nacht-Inkubation. A) Konzentrations-Wirkungskurve der Substanz 4. B) Konzentrations-Wirkungskurve der Substanz 207902.

6.2.4. AUSSCHLUSS FALSCH POSITIVER HITS

Das Ziel ist es eine Substanz zu identifizieren, die direkt am TSHR wirkt. Demnach wurde der Ausschluss falsch positiver Hits in TSHR-freien CHO-K1-Zellen durchgeführt. Die Stimulation der Zellen erfolgte durch Forskolin, einem direkten Aktivator der Adenylylzyklase. Die Ermittlung des EC_{80} -Wertes von Forskolin erfolgte durch die Erstellung einer Konzentrations-Wirkungskurve. Der EC_{80} -Wert betrug 23,4 μ M/L. Die anschließende Durchführung erfolgte nach dem gleichen Schema wie im primären Screening. Es wurden 263 Substanzen getestet und eine Substanz-Konzentration von 50 μ M eingesetzt.

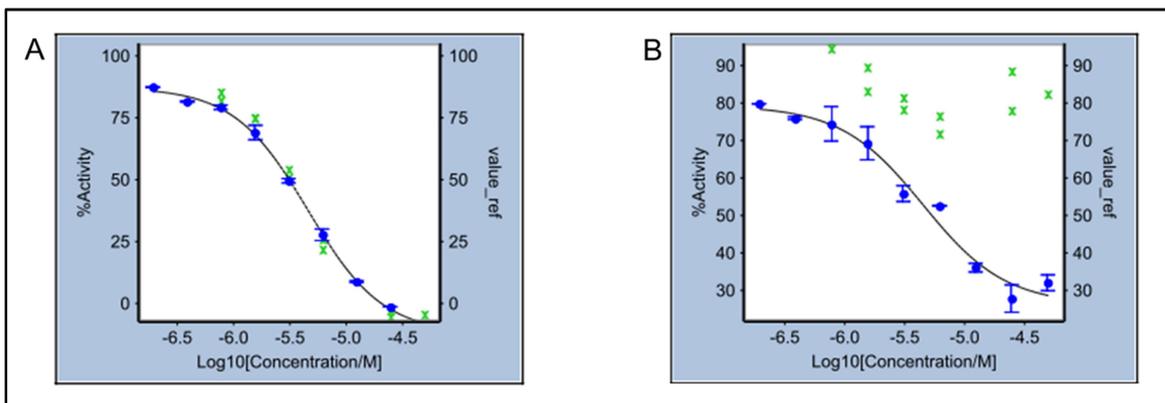


Abbildung 6-11: Konzentrations-Wirkungskurven (exemplarisch dargestellt für insgesamt 263 getestete Substanzen) durchgeführt in CHO-K1-Zellen ohne TSHR, stimuliert mit Forskolin (EC_{80} -Wert) und behandelt mit ansteigenden Konzentrationen an Substanz. Die Signalmessung erfolgte nach einer Über-Nacht-Inkubation. A) Konzentrations-Wirkungskurve der Substanz 212318. B) Konzentrations-Wirkungskurve der Substanz 208499 (S5).

In der Abbildung 6-11 sind exemplarisch Beispiele für eine rezeptorunabhängige Hemmung (Abbildung 6-11 A) und eine rezeptorabhängige Hemmung (Abbildung 6-11 B) der cAMP-Produktion dargestellt.

Zwölf der 263 Substanzen zeigten keine Forskolin-abhängige Inhibition der cAMP-Produktion in CHO-K1-Zellen ohne TSHR. Somit wurden zwölf Substanzen mit neun unterschiedlichen chemischen Grundgerüsten als positive Hits im primären Screening identifiziert.

Tabelle 6-2: Übersicht der im primären Screening identifizierten Substanzen.

Struktur	ID_FMP_IH	Summenformel	Molare Masse	IC ₅₀ bestimmt in HTS	Antagonistische Wirkung in % bestimmt im RIA	Agonistische Wirkung n-fach über Basalwert
	S1	C ₂₁ H ₁₅ N ₃ O ₂	341,36	1,08 µM	keine	keine
	S2	C ₂₂ H ₁₀ F ₂ N ₆ O ₄ S	502,49	35,77 µM	keine	keine
	S3	C ₂₈ H ₁₈ N ₂ O ₅	438,43	13,96 µM	27	keine
	S4	C ₂₆ H ₂₂ N ₂ O ₂ S ₂	474,59	3,82 µM	63	2,7
	S5	C ₂₀ H ₂₁ NO ₄	339,39	4,51 µM	keine	keine
	S6	C ₂₄ H ₂₆ N ₆ O ₅ S	510,57	n.b.	keine	keine
	S7	C ₂₈ H ₂₈ N ₆ O ₄ S	544,62	n.b.	23	keine
	S8	C ₂₄ H ₁₉ FO ₃	374,40	n.b.	52	2,8
	S9	C ₂₆ H ₂₃ F ₃ N ₄ O ₄	512,48	3,19 µM	75	keine
	S10	C ₁₃ H ₇ N ₅ O ₆	329,22	2,35 µM	41	keine
	S11	C ₁₅ H ₂₁ Cl ₃ N ₂ O	351,70	2,71 µM	21	keine
	S12	C ₂₆ H ₂₁ ClN ₄ O ₅ S ₂	569,05	n.b.	keine	keine

6.3. SEKUNDÄRER ASSAY, RIA

Die im primären Screening identifizierte Substanzen mit antagonistischer Wirkung am TSHR wurden mit einem sekundären Assay validiert. Die cAMP-Produktion wurde mittels RIA bestimmt (Kapitel 5.3.4.1).

6.3.1. BESTIMMUNG DER OPTIMALEN ZELLDICHTE UND DES ZELLSYSTEMS

Zuerst wurden ein geeignetes Zellsystem und die optimale Zellzahl für die Durchführung der RIA ermittelt. Es wurden zwei Zelllinien getestet, CHO-K1 und HEK293T (*Human Embryonic Kidney*). Beide exprimierten stabil den TSHR. Die Erstellung der Konzentrations-Wirkungskurven für beide Zelllinien (Abbildung 6-12) erfolgte mit zwei unterschiedlichen Zelldichten (75000 und 100000 Zellen/Well). Die Durchführung der RIA wurde im 24-Wellplatten-Format realisiert. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit GraphPrism 5.04.

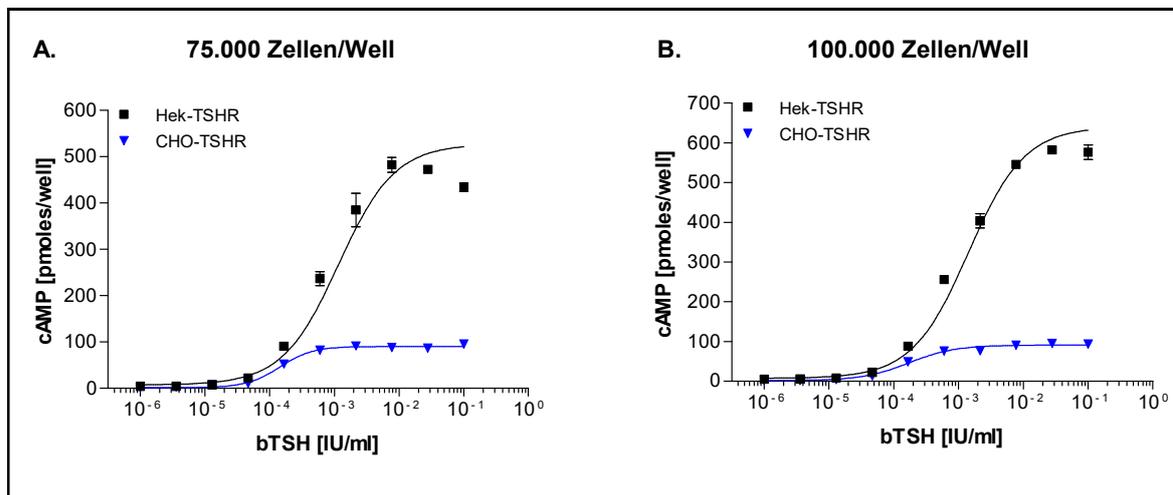


Abbildung 6-12: Radioimmunologische Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration zur Ermittlung des Zellsystems für die Durchführung des sekundären Screenings, durchgeführt in HEK293T-TSHR (schwarz) und CHO-K1-TSHR (blau). Die cAMP-Akkumulation wurde nach Stimulation mit ansteigenden Konzentrationen mit bTSH gemessen. A) Aussaat 75.000 Zellen pro Well. B) Aussaat 100.000 Zellen pro Well. Jeder Datenpunkt wurde als Doppelwert bestimmt. Angegeben ist der jeweilige arithmetische Mittelwert \pm Standardabweichung.

In Abbildung 6-12 sind die Konzentrations-Wirkungskurven für die getesteten Zelllinien dargestellt. Die CHO-K1-TSHR-Zellen zeigen ein deutlich niedrigeres cAMP-Niveau, bestimmt mittels RIA, im Vergleich zu HEK293T-TSHR.

Die Überprüfung der Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie (Kapitel 5.3.3.1) hat gezeigt, dass CHO-K1-TSHR-Zellen im Vergleich zu HEK293T-TSHR nur ca. 25% des Rezeptors an der Membranoberfläche aufweisen (Abbildung 6-13).

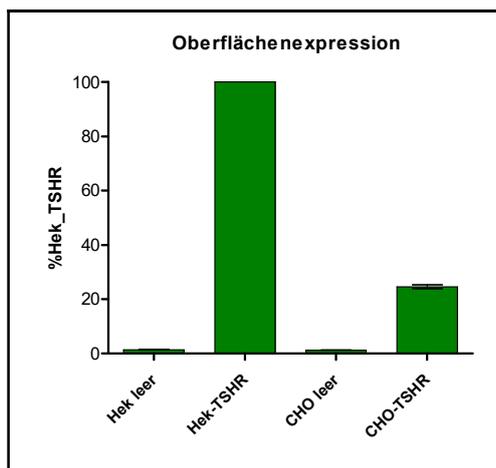


Abbildung 6-13: Durchflusszytometrische Analyse zur Bestimmung der Oberflächenexpression des TSHR in stabil transfizierten HEK293T- bzw. CHO-K1-Zelllinien. Die Markierung der Rezeptoren an der Zelloberfläche erfolgte mittels eines primären monoklonalen TSHR-spezifischen Antikörpers (Maus-anti-hTSHR, MCA 1281, AbD Serotec), als Sekundärantikörper diente ein DyLight488-konjugierter Ziege-anti-Maus IgG (AbD Serotec). Gemessen wurde die mittlere (relative) Fluoreszenzintensität je Zelle. Die Werte der HEK293T-TSHR-Zellen wurden mit 100% gleichgesetzt und die Ergebnisse der CHO-K1-TSHR-zellen dementsprechend normiert. Jeder Datenpunkt wurde als Doppelwert in zwei unabhängigen Experimenten bestimmt.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle weiteren Analysen des sekundären Screenings in HEK293T-TSHR-Zellen durchgeführt. Es wurde sowohl die antagonistische als auch die agonistische Wirkung der Substanzen auf den TSHR überprüft. Zu diesem Zweck wurden die Zellen zum einem mit der Substanz (50 μM) und bTSH (EC_{80} -Wert, 2,14 IU/ml), zum anderen nur mit der Substanz (50 μM) für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die cAMP-Konzentration bestimmt (Kapitel 5.3.4.1). Die Zugabe von bTSH und Substanz erfolgte simultan.

In der radioimmunologischen cAMP-Bestimmung, durchgeführt in einem HEK293T-TSHR-Zellen, konnten vier der zwölf im HTS identifizierten Substanzen in ihrer antagonistischen Wirkung auf den TSHR verifiziert werden. Es handelt sich dabei um die Substanzen S4, S8, S9 und S10 (Abbildung 6-14 A), die jeweils ein unterschiedliches chemisches Grundgerüst aufweisen (Tabelle 6-2). Die Messung der cAMP-Produktion nach alleiniger Substanzzugabe verdeutlicht, dass S4 und S8 auch agonistisch auf den TSHR wirken (Abbildung 6-14 B).

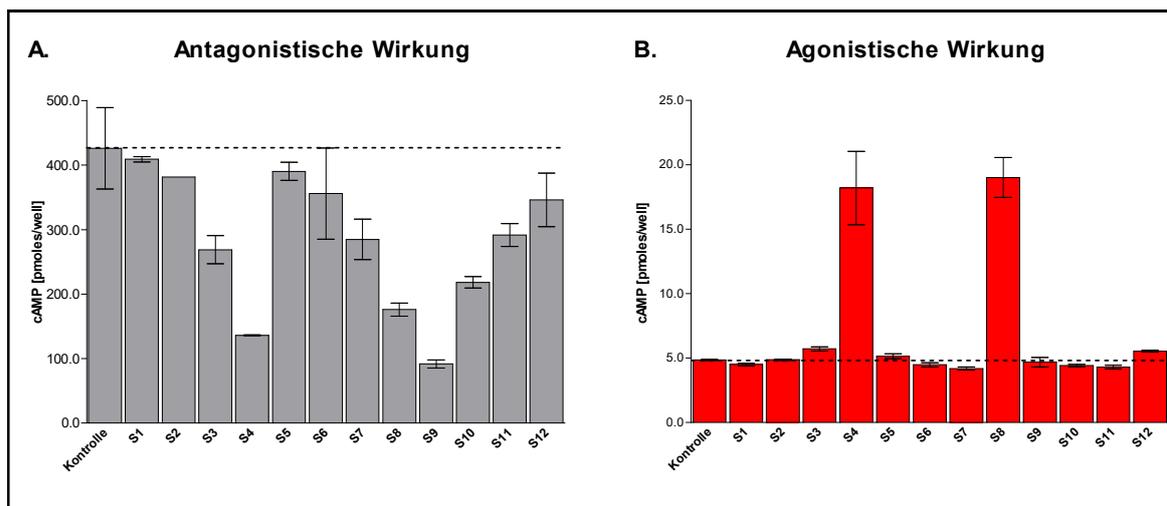


Abbildung 6-14: Radioimmunologische Analyse zur Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration durchgeführt in HEK293T-Zellen, die den TSHR stabil exprimieren. A) cAMP-Bestimmung nach einer simultanen Zugabe von Substanz (50 μ M) und bTSH (2,14IU/ml). B) cAMP-Bestimmung nach einer Zugabe von Substanz (50 μ M). Jeder Datenpunkt wurde als Doppelwert bestimmt. Angegeben sind der jeweilige arithmetische Mittelwert \pm Standardabweichung.

A.

$$\text{Agonistische Aktivität} = \frac{((\text{cAMP}(\text{pmol/well}) \text{ der Probe (Substanz)}))}{\text{cAMP}(\text{pmol/well}) \text{ der Kontrolle}} - 1$$

B.

$$\text{Antagonistische Aktivität} = \frac{(\text{cAMP}(\text{pmol/well}) \text{ der Probe (TSH + Substanz)}) * 100}{(\text{cAMP}(\text{pmol/well}) \text{ der Probe (TSH)}} - 100$$

Formel 6-1: Gleichungen zur Ermittlung der agonistischen (A) bzw. antagonistischen (B) Wirkungsstärke der Substanzen im Vergleich zu Kontrolle.

Mit der Berechnung der antagonistischen bzw. agonistischen Wirkungsstärke der Substanzen kristallisierten sich drei potentielle Antagonisten für den TSHR heraus (Abbildung 6-15). Die Substanzen S4, S8 und S9 zeigen mit über 50% den stärksten Antagonismus (Abbildung 6-15 A) am TSHR im Vergleich zur Kontrolle. Dabei lösen S4 und S8 gleichzeitig eine dreifache agonistische Aktivität am Rezeptor im Vergleich zu Kontrolle aus (Abbildung 6-15 B). Somit sind S4 und S8 Partialagonisten des TSHR. Anhand dieser Ergebnisse wurden drei Hit-Substanzen, die Substanzen S4, S8 und S9, für weiterführende experimentelle Studien ausgewählt.

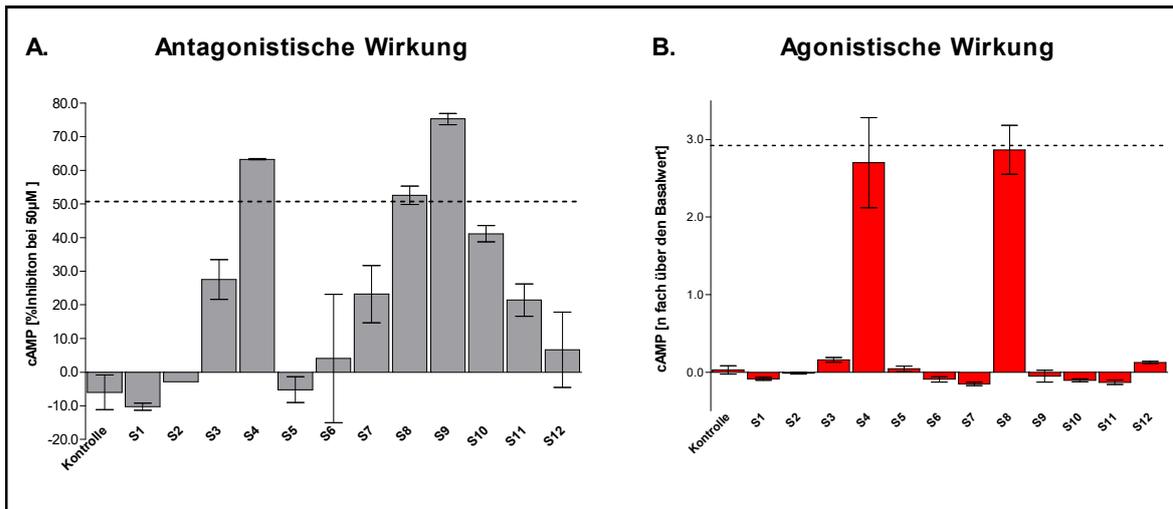


Abbildung 6-15: Dargestellt sind die ermittelte antagonistische Wirkung (Formel Abb. 1-12) der Substanzen auf den TSHR in Prozent und die agonistische Wirkung als n-faches der Basalaktivität im Vergleich zur Kontrolle.

6.3.2. PRÄINKUBATION UND INITIALE INHIBITIONSKURVEN

Es sollte überprüft werden, ob die einstündige Präinkubation der Zellen mit der Substanz (Zugabe der Substanz vor Zugabe des bTSH) deren inhibitorische Wirkung auf den TSHR beeinflusst. Es wurden die drei Substanzen S4, S8 und S9 analysiert. Hierfür wurden die Zellen zum einen mit den Substanzen für 60 Min. präinkubiert und anschließend mit bTSH stimuliert. Zum anderen erfolgte die Zugabe der Substanzen und bTSH simultan. Es wurde eine Drei-Punkt-Messung durchgeführt. Die Substanzen wurden in den Konzentrationen von 5 µM, 15 µM und 50 µM eingesetzt. Die Stimulation der Zellen mit bTSH erfolgte mit dem vorher ermittelten EC_{80} -Wert von 2,14 IU/ml.

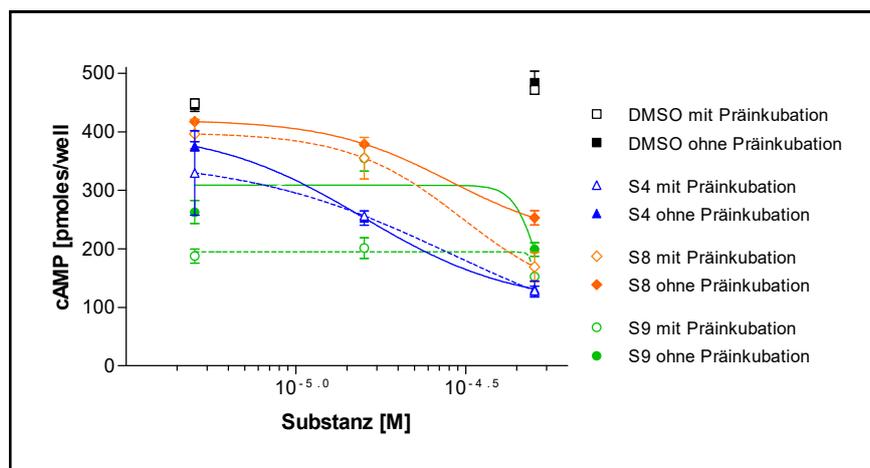


Abbildung 6-16: Einfluss der Präinkubation auf die inhibitorische Wirkung der Substanzen. Die intrazelluläre cAMP-Produktion wurde nach einer simultanen Zugabe der entsprechenden Substanz und bTSH (2,14 IU/ml) (durchgehende Linien) und nach einer Präinkubation der Zellen mit der Substanz für 1h und anschließender bTSH-Stimulation (gestrichelte Linien) radioimmunologisch bestimmt. Jeder Datenpunkt wurde als Doppelwert bestimmt. Angegeben ist der jeweilige arithmetische Mittelwert \pm Standardabweichung.

Die Drei-Punkte-Messungen für die jeweiligen Substanzen stellen gleichzeitig die initialen Inhibitionskurven dar. Aus der Abbildung 6-16 wird einmal die konzentrationsabhängige Inhibierung der cAMP-Produktion durch die eingesetzten Substanzen deutlich. Zum anderem lässt sich eine Erhöhung des inhibitorischen Effekts der Substanz S8 und S9 bei einer Präinkubation erkennen.

S9 zeigt bei 5 μM und 15 μM einen etwas besseren Effekt bei einer Präinkubation. Die Wirkung von S9 bei einer Konzentration von 50 μM ist in beiden Versuchen vergleichbar. Interessant ist, dass die Wirkung von S9 bei 5 μM und 15 μM keinen Unterschied erkennen lässt. Beide Konzentrationen lösen einen identischen Effekt aus, und zwar sowohl bei den Präinkubationsversuchen als auch bei simultaner Zugabe von S9 und bTSH.

Die Substanz S4 hingegen zeigt keinen signifikanten Unterschied in der cAMP-Produktion in beiden Versuchen.

6.4. CHARAKTERISIERUNG UND OPTIMIERUNG DER HIT-SUBSTANZEN

Die Optimierung von Hit-Substanzen ist ein sich wiederholender Prozess aus computer-unterstütztem molekularem Modeling, chemischer Synthese neuer Substanzen und deren funktionaler Analyse. Ziel ist es, die im HTS identifizierten Hit-Substanzen zu einem selektiven und hochaffinen Antagonisten für den TSHR zu optimieren¹⁴⁰.

6.4.1. STRUKTUR-AKTIVITÄTSBEZIEHUNG

Der Begriff Struktur-Aktivitätsbeziehung (engl. *structure activity relationship*; SAR) bezeichnet Untersuchungen, bei denen die chemische Struktur eines Moleküls mit seinen biologischen, physikalisch-chemischen und pharmakologischen Eigenschaften in Verbindung gebracht wird. Ausgehend von der Struktur einer Hit-Substanz werden Strukturderivate synthetisiert und im Hinblick auf ihre Eigenschaften analysiert. In der Wirkstoffentwicklung wird das SAR-Verfahren eingesetzt, um pharmazeutisch relevante Stoffe mit hoher Aktivität und Affinität zu entwickeln¹⁴¹.

Für weitere SAR wurden in der Datenbank des FMP (AG R. Kühne; 9,1 Millionen Verbindungen, 39 Anbieter; Stand Mai 2013) nach kommerziell erhältlichen Substanzen gesucht. Dies geschah mit dem Ziel, Derivate der Substanzen S4 bzw. S9 für die SAR zu erhalten. Anhand des Tanimoto-Koeffizientes (> 0.6 ;) ¹⁴² konnten 106 bzw. 26 strukturell ähnliche Substanzen identifiziert werden. Daraus wurde eine Auswahl getroffen, sieben Substanzen ähneln S4 (Tabelle 6-3) und vier Substanzen ähneln S9 (Tabelle 6-4). Diese wurden kommerziell erworben und im Hinblick auf ihren antagonistischen Effekt charakterisiert.

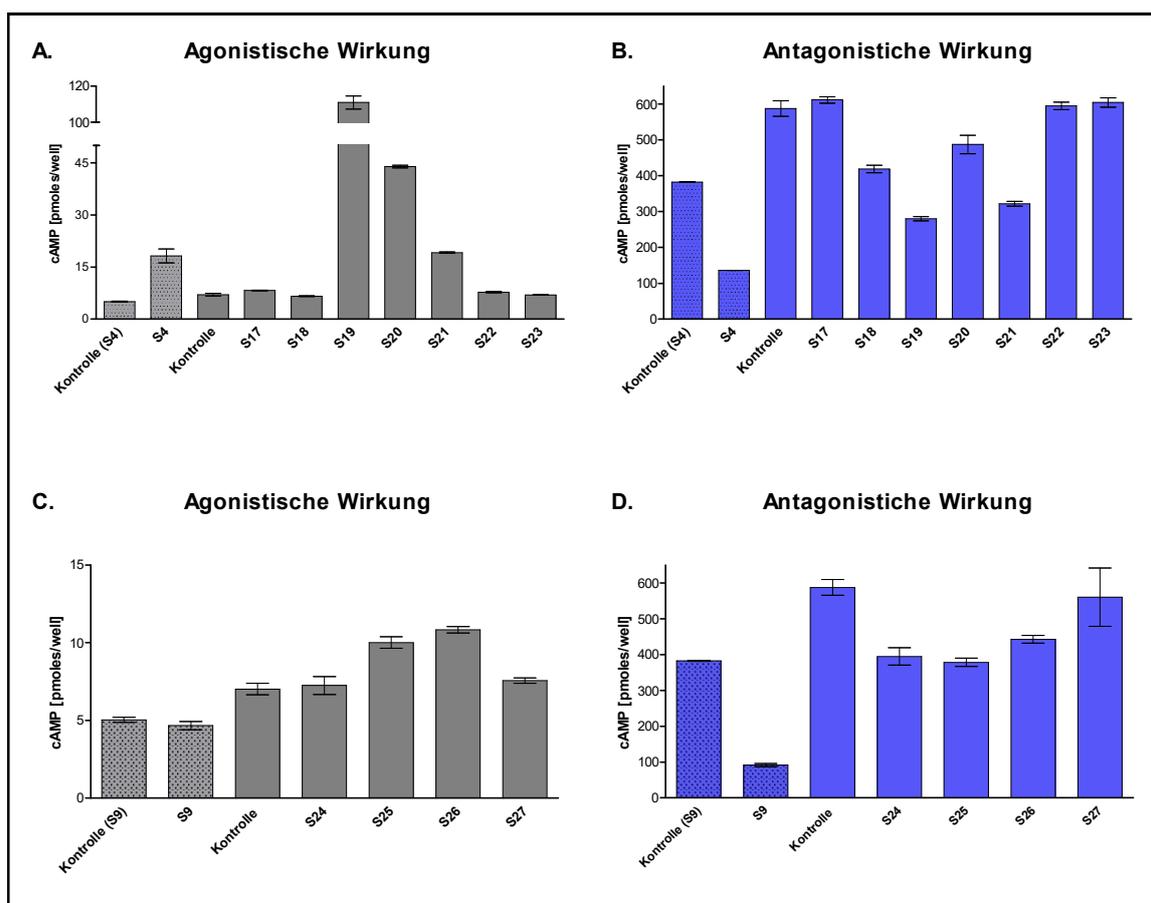
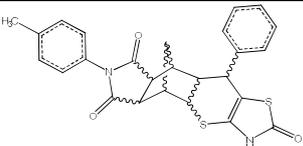
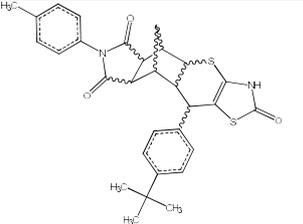
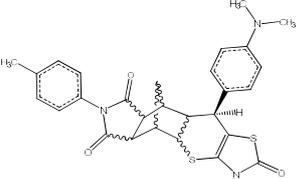
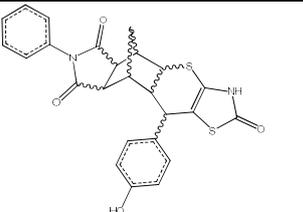
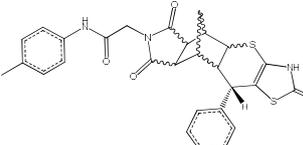
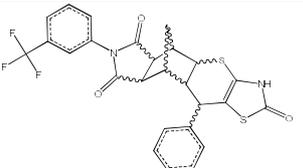
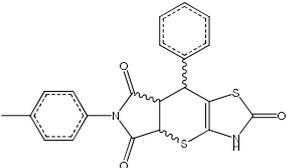
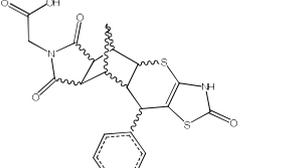


Abbildung 6-17: Radioimmunologische Analyse zur Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration durchgeführt in HEK293T-TSHR-Zellen. Die cAMP-Werte ohne bTSH-Stimulation mit Substanzzugabe (50 µM) sind in grau dargestellt. In blau sind cAMP-Werte nach Stimulation mit bTSH (2,14 IU/ml) und simultaner Substanzzugabe (50µM) dargestellt. A) cAMP-Bestimmung für S4 und Derivate. B) cAMP-Bestimmung für S9 und Derivate. Jeder Datenpunkt wurde als Doppelwert bestimmt. Angegeben ist der jeweilige arithmetische Mittelwert \pm Standardabweichung.

Keine der gekauften Substanzen zeigt eine bessere antagonistische Wirkung auf den TSHR als die beiden Hit-Strukturen S4 und S9. Die Substanzen S17, S22, S23 (Tabelle 6-3) sind Derivate von S4 und S27 (Tabelle 6-4) ist ein Derivat von S9. Diese Derivate zeigten weder einen antagonistischen noch einen agonistischen Effekt auf den TSHR und sind somit inaktiv am TSHR.

Die Substanz S18 (Tabelle 6-3), Derivat von S4, zeigt eine leichte ca. 30%-ige antagonistische Wirkung auf den TSHR. Die Substanz 19 (Tabelle 6-3), Derivat von S4, zeigt eine ca. 60%-ige antagonistische Wirkung, die mit S4 vergleichbar ist. Gleichzeitig wurde eine 15-fache agonistische Wirkung dieser Substanz gemessen und somit ist S19 auch ein partialer Agonist. Die Substanz S20 (Tabelle 6-3), Derivat von S4, zeigt sowohl eine leichte antagonistische als auch eine agonistische Wirkung. Die Substanz S21 (Tabelle 6-3) zeigt eine etwa 50%-ige antagonistische Wirkung, der Wirkung von S4 vergleichbar, aber auch hier ist eine leichte agonistische Wirkung messbar.

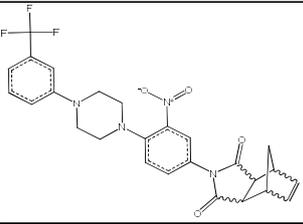
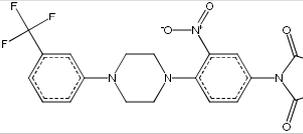
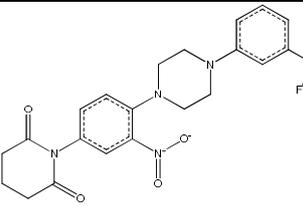
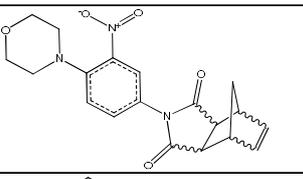
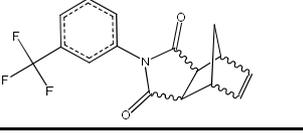
Tabelle 6-3: Übersicht der gekauften Derivate der Hit-Substanz S4.

Struktur und Summenformel	ID_FMP_IH	Summenformel	Tanimoto Koeffizient	Molare Masse	Antagonistische Wirkung in % bestimmt im RIA	Agonistische Wirkung n-fach über Basalwert
	S4	C ₂₆ H ₂₂ N ₂ O ₃ S ₂	1	474,59	63	3
	S17	C ₃₀ H ₃₀ N ₂ O ₃ S ₂	0,816	530,17	keine	keine
	S18	C ₂₈ H ₂₇ N ₂ O ₃ S ₂	0,816	517,15	30	keine
	S19	C ₂₅ H ₂₀ N ₂ O ₄ S ₂	0,766	476,09	50	15
	S20	C ₂₈ H ₂₅ N ₃ O ₄ S ₂	0,716	531,13	50	5
	S21	C ₂₆ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₃ S ₂	0,6969	528,08	55	1,7
	S22	C ₂₁ H ₁₆ N ₂ O ₃ S ₂	0,677	408,06	keine	keine
	S23	C ₂₁ H ₁₈ N ₂ O ₅ S ₂	0,646	442,07	keine	keine

Die Substanzen S24, S25, S26 sind Derivate von S9 und zeigen alle eine antagonistische Wirkung, die aber nur halb so stark ist. Interessanterweise wirkt keine dieser Substanzen, wie auch S9 selbst nicht, agonistisch auf den TSHR.

Obwohl keine der gekauften Substanzen ein stärkerer TSHR-Antagonist ist als die im HTS identifizierte Hit-Substanzen S4 und S9, tragen die unterschiedlichen Effekte dieser Substanzen zu den SAR bei.

Tabelle 6-4: Übersicht der gekauften Derivate der Substanz S9.

Struktur	ID_FMP_IH	Summenformel	Tanimoto Koeffizient	Molare Masse	Antagonistische Wirkung in % bestimmt im RIA	Agonistische Wirkung n-fach über Basalwert
	S9	C ₂₆ H ₂₃ F ₃ N ₄ O ₄	1	512,48	75	keine
	S24	C ₂₅ H ₂₅ F ₃ N ₄ O ₄	0,75	502,18	30	keine
	S25	C ₂₂ H ₂₁ F ₃ N ₄ O ₄	0,688	462,15	28	keine
	S26	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₅	0,65	369,13	35	keine
	S27	C ₁₆ H ₁₂ F ₃ NO ₂	0,648	307,08	keine	keine

6.4.2. STEREOSELEKTIVE SYNTHESE

Alle kommerziell erhältlichen Substanzen sind in ihrer Stereochemie vom Hersteller nicht klar definiert und liegen als Stereoisomere vor. Um den Effekt der einzelnen Isomere zu testen, wurden stereoselektive Synthesen zur Herstellung der S4- und S9-Derivate durchgeführt und die Stereoisomere getrennt. Die Synthesen wurden in der AG Edgar Specker von Sebastian Sobotka im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt¹⁴³.

Tabelle 6-5: Übersicht der stereoselektiven Derivate der Substanz S9

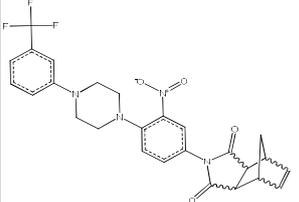
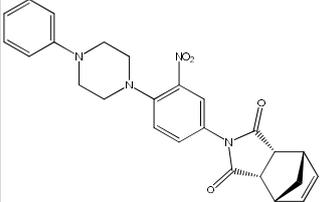
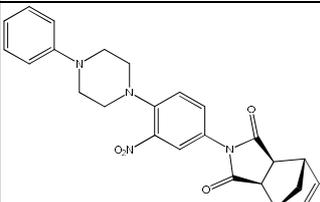
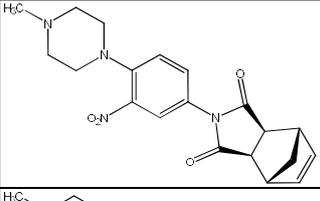
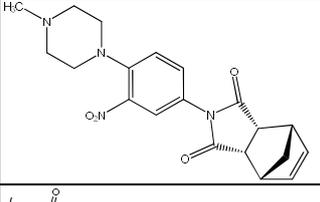
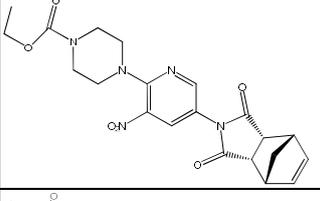
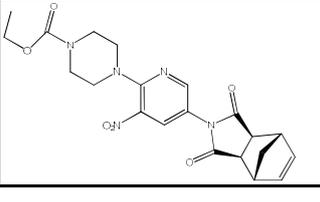
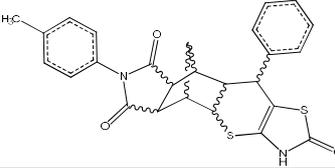
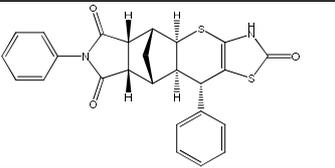
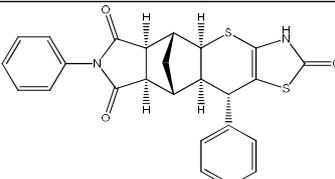
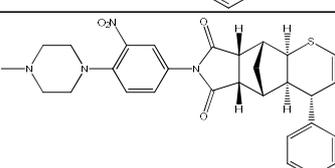
Struktur	ID_FMP_IH	Summenformel	Tanimoto Koeffizient	Molare Masse	Antagonistische Wirkung in% bestimmt in RIA	Agonistische Wirkung n-fach basal Wert
	S9	C ₂₆ H ₂₃ F ₃ N ₄ O ₄	1	512,48	75	keine
	S30	C ₂₅ H ₂₄ N ₄ O ₄	0,80488	444,18	20	keine
	S31	C ₂₅ H ₂₄ N ₄ O ₄	0,80488	444,18	20	keine
	S32	C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O ₄	0,64583	382,41	keine	keine
	S33	C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O ₄	0,64583	382,41	keine	keine
	S34	C ₂₁ H ₂₃ N ₅ O ₆	0,65306	440,17	30	keine
	S35	C ₂₁ H ₂₃ N ₅ O ₆	0,65306	440,17	15	keine

Tabelle 6-6: Übersicht der stereoselektiven Derivate der Substanz S4.

Struktur	ID_FMP_IH	Summenformel	Tanimoto Koeffizient	Molare Masse	Antagonistische Wirkung in % bestimmt im RIA	Agonistische Wirkung n-fach über Basalwert
	S4	C ₂₆ H ₂₂ N ₂ O ₃ S ₂	1	474,59	63	3
	S37	C ₂₅ H ₂₀ N ₂ O ₃ S ₂	0,94595	460,09	70	4
	S36	C ₂₅ H ₂₀ N ₂ O ₃ S ₂	0,9459	460,09	keine	keine
	S38	C ₃₀ H ₂₈ N ₅ O ₅ S ₂	0,625	603,71	40	keine

Es wurden insgesamt drei Derivate der Substanz S4 (S36, S37, S38; Tabelle 6-6) und sechs Derivate der Substanz S9 (S30, S31, S32, S33, S34, S35; Tabelle 6-5) stereoselektiv synthetisiert und funktionell charakterisiert.

Obwohl für keine der nachsynthetisierten Substanzen eine deutlich verbesserte antagonistische Wirkung auf den TSHR gegenüber den Ausgangssubstanzen gemessen wurde, gab es dennoch einen entscheidenden Fortschritt für die SAR.

So zeigen die Stereoisomere S30 und S31, Derivate von S9, vergleichbare inhibitorische Wirkung auf TSHR (Tabelle 6-5), wogegen die Stereoisomere S37 und S36 klare unterschiedliche funktionale Effekte aufweisen (Tabelle 6-6). Während die Substanz S37 ein *endo*-Stereoisomer ist und eine 70%-ige Inhibierung nach Stimulation mit bTSH in HEK293T-TSHR-Zellen zeigt, ist für deren *exo*-Stereoisomer S36 kein antagonistischer Effekt zu beobachten (Abbildung 6-20). Die beiden Stereoisomere S36 und S37 zeigen klare Unterschiede in ihrer Konformation, die im Zusammenhang mit ihrer Aktivität am Rezeptor stehen. Die Stereoisomere S30 und S31 hingegen unterscheiden sich nur geringfügig in ihrer Konformation und zeigen einen vergleichbaren Effekt auf den Rezeptor.

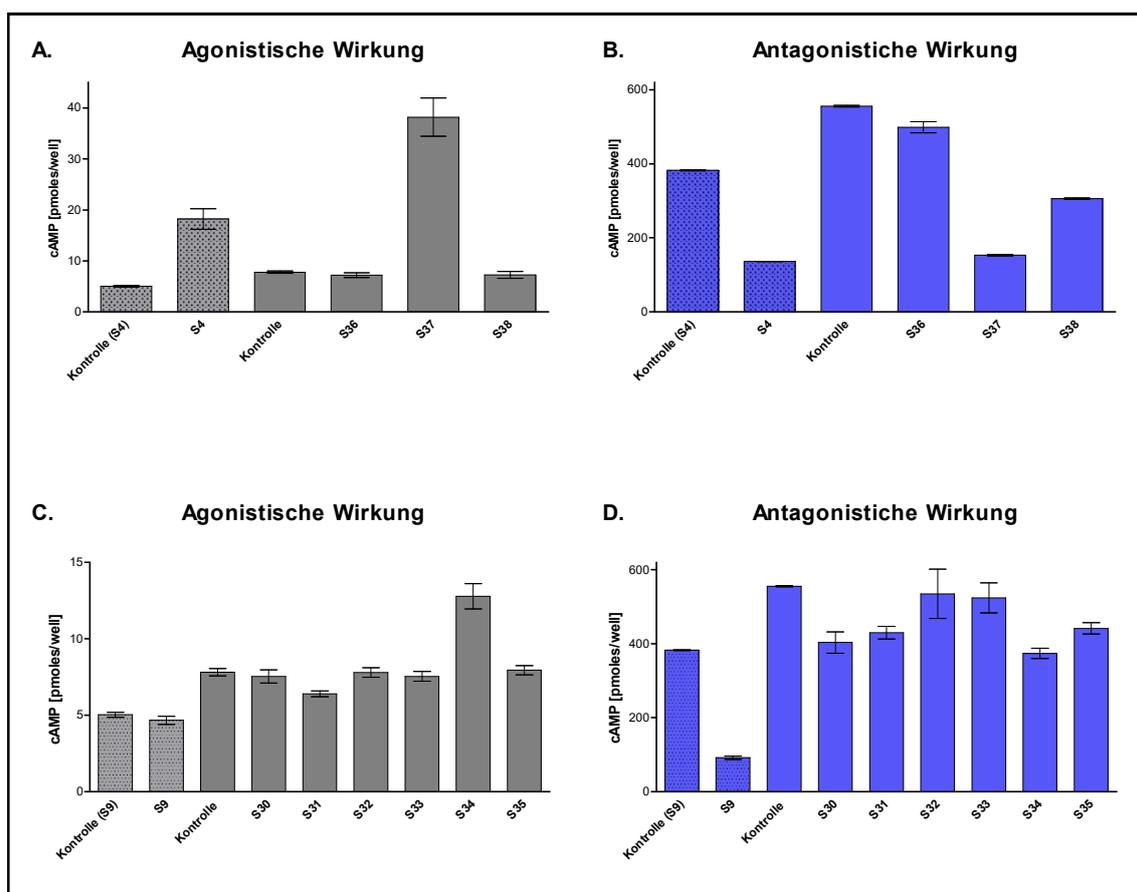


Abbildung 6-18: Radioimmunologische Analyse zur Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration durchgeführt in HEK293T-TSHR-Zellen. Die Zellen wurden mit 50 μ M Substanz behandelt. Bestimmt wurden die cAMP-Basalwerte ohne bTSH-Stimulation (grau dargestellt) und die cAMP-Werte nach einer Stimulation mit bTSH (2,14 IU/ml, blau dargestellt). A) cAMP-Bestimmung für S4 und Derivate. B) cAMP-Bestimmung für S9 und Derivate. Jeder Datenpunkt wurde als Doppelwert bestimmt. Angegeben ist der jeweilige arithmetische Mittelwert \pm Standardabweichung.

S37 und S36 stellen Sonderformen der Diastereomerie dar, sie sind *endo*-/*exo*-Isomere zu einander. Aus Abbildung 6-20 (B und D) geht der Unterschied in der Konformation der Substanzen deutlich hervor.

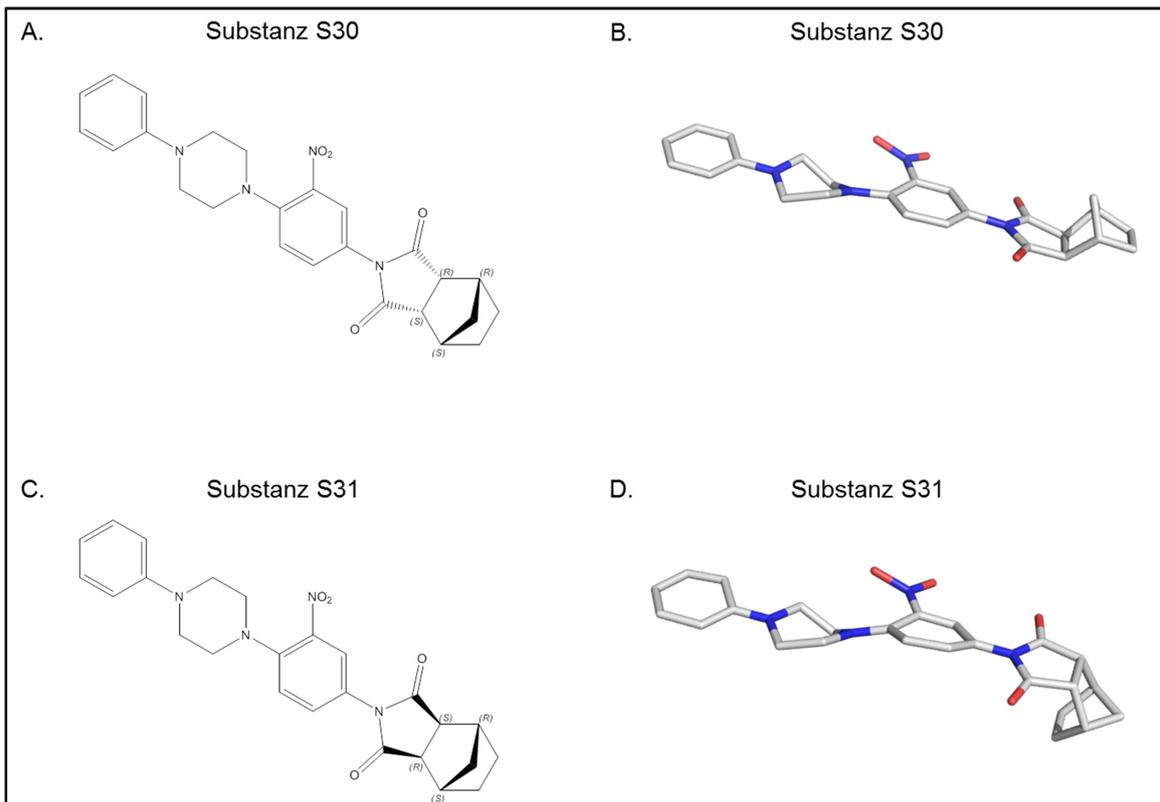


Abbildung 6-19: Stereoisomere von S30 (A, B) und S31 (C, D). Dargestellt sind die chemische Struktur mit Kennzeichnung aller chiralen Zentren (S30 A, S31 C) und die 3-D Struktur (S30 B, S31 D).

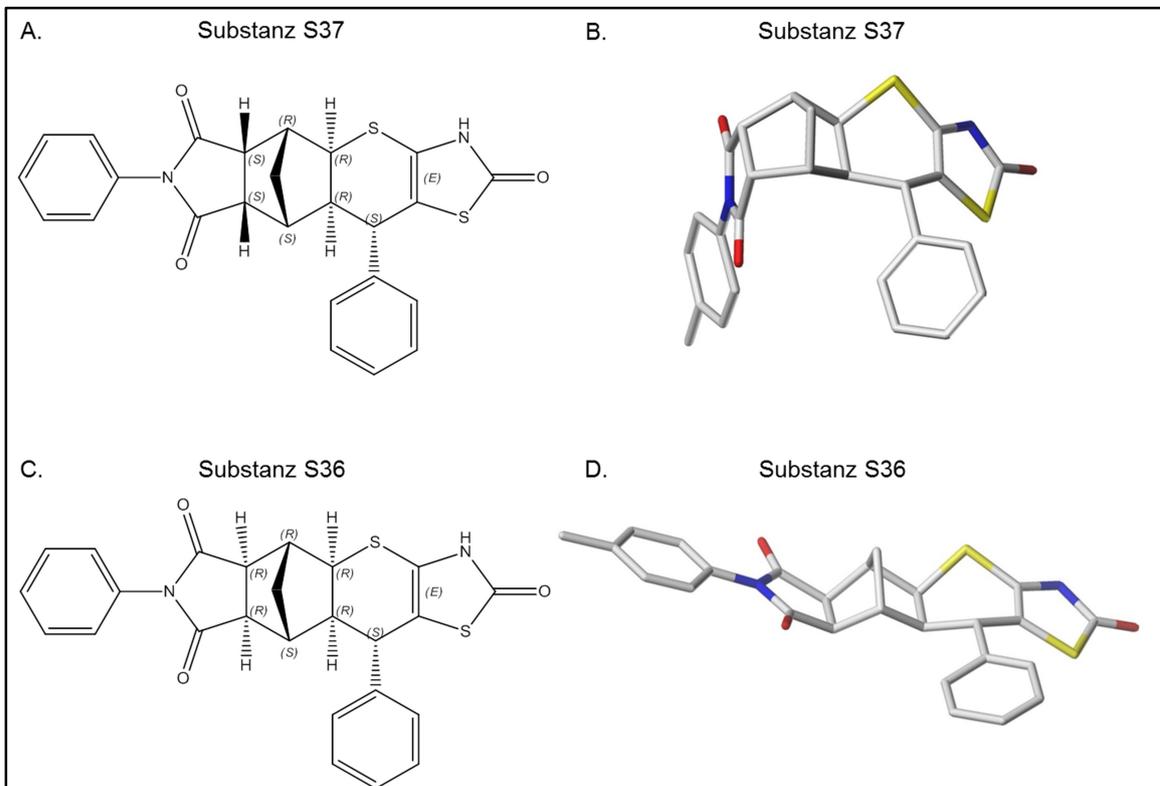


Abbildung 6-20: Stereoisomere von S37 (A, B) und S36 (C, D). Dargestellt sind die chemische Struktur mit Kennzeichnung aller chiralen Zentren (S37 A, S36 C) und die 3-D Struktur (S37 B, S36 D).

6.4.3. SELEKTIVITÄT

Für weiterführende Untersuchungen sollten die Substanzen ausgewählt werden, die ausschließlich am TSHR wirken. Die Selektivitätsanalysen der Substanzen wurden sowohl am TSHR, als auch an den homologen Rezeptoren wie FSHR und LHCGR durchgeführt. Ein Mitglied der Familie B der GPCR, der *Corticotropin-releasing factor 1 receptor* (CRF₁R), wurde als Negativkontrolle mitgeführt. Alle getesteten Rezeptoren wurden stabil in HEK293T-Zellen exprimiert. Der Einfluss der Substanz auf den jeweiligen Rezeptor wurde durch die Zugabe der Testsubstanz (50 µM) allein oder in Kombination mit dem entsprechenden Agonisten getestet. Die Zugabe von Substanz und Agonist erfolgte simultan. Die cAMP-Konzentration wurde nach einstündiger Inkubation radioimmunologisch gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6-21 dargestellt.

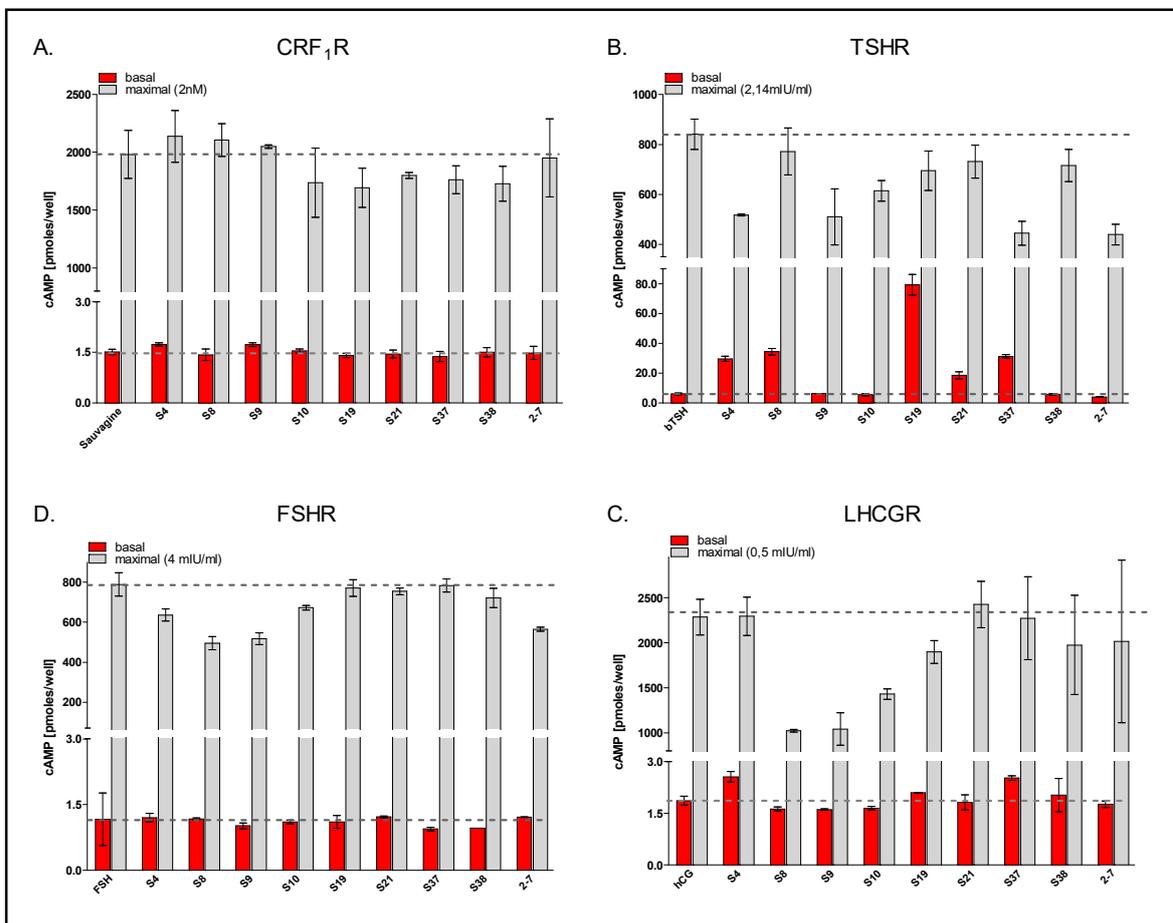


Abbildung 6-21: Radioimmunologische Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration zur Ermittlung der selektiven Substanzwirkung auf unterschiedliche GPCR, durchgeführt in der HEK293T-Zelllinie, die CRF1R, TSHR, FSHR oder LHCGR jeweils stabil exprimiert. Die Rezeptoren wurden mit den Substanzen (50 µM) allein oder in Kombination mit dem jeweiligen Agonisten behandelt. Die cAMP-Akkumulation wurde nach 1h Inkubation bestimmt. Dargestellt sind die cAMP-Akkumulation nach Zugabe der Substanz allein (rot) und nach Zugabe der Substanz und Agonisten (grau). A) CRF₁R; Stimulation mit Sauvagine (2 nM). B) TSHR; Stimulation mit bTSH (2,14 IU/ml). C) FSHR; Stimulation mit FSH (4 IU/ml). D) LHCGR; Stimulation mit hCG (0,5 IU/ml). Jeder Datenpunkt wurde als Doppelwert bestimmt. Angegeben ist der jeweilige arithmetische Mittelwert ± Standardabweichung.

In Abbildung 6-21 sind die absoluten cAMP-Mengen für den jeweiligen Rezeptor dargestellt. Da die gemessenen absoluten cAMP-Produktionslevel der Rezeptoren nicht direkt miteinander vergleichbar sind, wurde die jeweilige antagonistische bzw. agonistische Wirkung berechnet (Formel 6-1) und in Prozent gegenüber dem Basalwert dargestellt (Abbildung 6-22:).

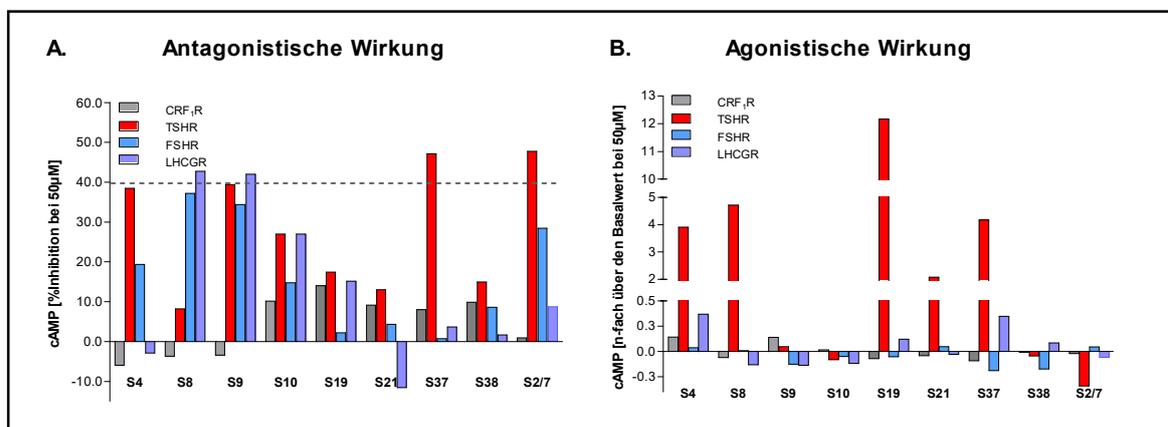


Abbildung 6-22: Die berechnete antagonistische bzw. agonistische Wirkung der Substanzen auf die getestete GPCR (Formel 6-1).

Keine der getesteten Substanzen zeigt eine agonistische oder antagonistische Wirkung auf den als Kontrolle mitgeführten CRF₁R.

Die Referenzsubstanz S2/7 (erhalten von Kooperationspartner AG M. Gershengorn, NIH) zeigte wie erwartet keine antagonistische Wirkung auf CRF₁R und LHCGR, jedoch eine leichte antagonistische Wirkung auf FSHR (ca. 20%) und eine ca. 45%-ige antagonistische Wirkung auf TSHR.

Keine der getesteten Substanzen wirkte agonistisch auf einen der beiden homologen Rezeptoren LHCGR und FSHR. Das ist insofern überraschend, als S19 eine zwölfwache agonistische Wirkung und S4, S8 sowie S37 vierfache agonistische Wirkung über dem Basalwert des TSHR zeigen.

Die Substanzen S4, S8, S9 und S10 zeigen eine antagonistische Wirkung auf die homologen Rezeptoren, d.h. entweder auf LHCGR und/oder auf FSHR, und sind somit nicht TSHR-spezifisch. S19, S21 und S38 zeigen eine vergleichbare inhibitorische Wirkung auf alle drei GPCR, und sind demnach auch nicht TSHR-spezifisch.

S37 inhibiert die TSH-induzierte cAMP-Produktion am TSHR. Diese Substanz zeigt keinen inhibitorischen Einfluss auf die cAMP-Bildung bei LHCGR oder FSHR. Die hemmende Wirkung von S37 ist vergleichbar mit der von Referenzsubstanz S2/7. Nach diesem Test ist S37 die einzige TSHR-selektive Substanz.

6.4.4. DIE TOXIZITÄTSBESTIMMUNG

Das TSHR-selektive Stereoisomer S37 wurde in seiner toxischen Wirkung auf die Zellen getestet. Hierfür wurden die Zellen für 18h mit unterschiedlichen Konzentrationen von S37 inkubiert und die Zellvitalität mittels des *amarBlue*-Assays bestimmt¹²⁴. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen und sowie mit 0,2%-iger DMSO-Lösung inkubierte Zellen mitgeführt.

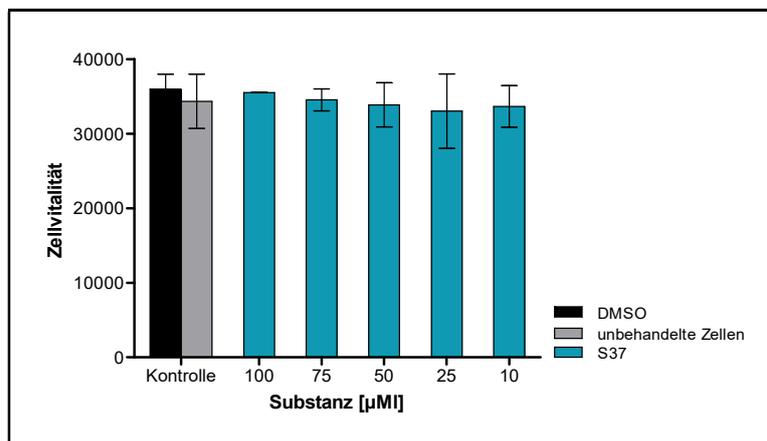


Abbildung 6-23: Toxizitätsbestimmung der Substanzen mittels *amarBlue*-Assay. HEK293T-TSHR-Zellen wurden mit S37 in verschiedenen Konzentrationen (10 µM bis 100µM) für 18h behandelt. Die Aktivität lebender, metabolisch aktiver Zellen wurde mittels *amarBlue*-Assay vermessen (n = 3, Triplikate je Konzentration).

Keine der getesteten Konzentration von S37 zeigte eine toxische Wirkung auf die Zellen. Demnach konnte im gewählten Konzentrationsbereich von 10 µM-100 µM kein LC_{50} -Wert (*Lethal Concentration*, mittlere letale Konzentration) bestimmt werden¹⁶. Die Substanz S37 beeinflusst die Vitalität der HEK293T-Zellen nach 18h Inkubationszeit nicht. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass S37 im eingesetzten Konzentrationsbereich nicht toxisch auf HEK293T-TSHR-Zellen wirkt.

6.4.4.1. KONZENTRATIONS-INHIBITIONSKURVEN

Der inhibitorischer Effekt der Substanzen wurde in ihrer Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration untersucht. Es wurden Konzentrations-Inhibitionskurven für das selektive Stereoisomer S37, für S38 und für die beiden Hit-Substanzen S4 und S9 erstellt. Als Kontrolle wurden DMSO und der bekannte (nicht selektive) TSHR-Antagonist S2/7 mitgeführt.

Die Bestimmung des intrazellulären cAMP-Levels erfolgte nach einer Stimulation mit bTSH (EC_{80} -Wert) mit und ohne Zugabe ansteigender Konzentrationen der jeweiligen Substanz in stabil transfizierten HEK293T-TSHR-Zellen. Die Inhibition wurde als Redukti-

on der cAMP Konzentration im Vergleich zu einer Kontrolle (DMSO-Lösung) radioimmunologisch bestimmt.

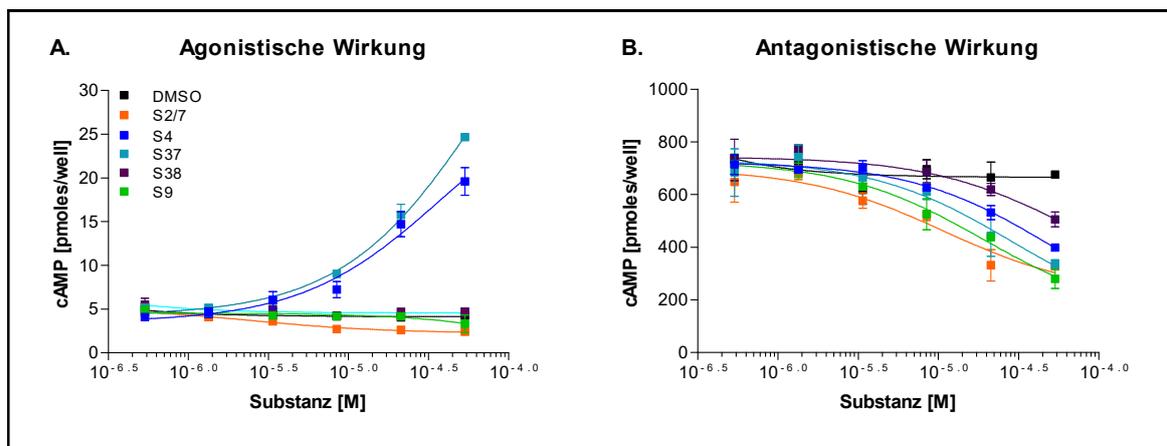


Abbildung 6-24: Konzentrations-Inhibitionskurven. Radioimmunologische Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration zur Ermittlung der konzentrationsabhängigen inhibitorischen Substanzwirkung, durchgeführt in HEK293-TSHR. A) cAMP-Akkumulation nach der Zugabe ansteigender Substanzkonzentration in Abwesenheit des Agonisten (bTSH). B) cAMP-Akkumulation nach der Zugabe ansteigender Substanzkonzentrationen und Stimulation mit normierter Agonistenkonzentration (bTSH; EC_{80} -Wert). Jeder Datenpunkt wurde als Doppelwert bestimmt. Angegeben ist der jeweilige arithmetische Mittelwert \pm Standardabweichung.

Alle getesteten Substanzen zeigten eine konzentrationsabhängige inhibitorische Wirkung auf die cAMP-Bildung. Die Unterschiede waren jedoch in den IC_{50} -Werten (Tabelle 6-7) festzustellen. Keine der Substanzen konnte bei 50 μ M Konzentration die Rezeptoraktivität, ausgelöst durch Stimulation mit bTSH (EC_{80} -Wert), auf das Basalniveau bringen. Die Substanzen S4 und S37 zeigten auch eine konzentrationsabhängige agonistische Wirkung auf den TSHR. Die Substanzen S9, S38 sowie die Referenzsubstanz S2/7 zeigten keine agonistische Wirkung.

Tabelle 6-7: Übersicht der kalkulierten IC_{50} -Werte, ermittelt aus Konzentrations-Inhibitionskurven in GraphPrism unter Verwendung der nicht linearen Regressionsanalyse.

Substanz ID	IC_{50} -Wert
S4	48,96 μ M
S9	18,62 μ M
S37	27,97 μ M
S2/7	10,70 μ M

6.4.5. SCHILD-REGRESSIONS-ANALYSE UND SCHILD-PLOT

Die Charakterisierung, ob die eingesetzten Substanzen kompetitiv zu bTSH binden, wurden die Schild-Regressions-Analyse und der Schild-Plot durchgeführt (Kapitel 5.3.4.2).

Führen die steigenden Antagonistenkonzentrationen zu einer Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurven und zu einer Abnahme des EC_{50} -Wertes des Agonisten, so handelt es sich um einen kompetitiven Antagonisten zum eingesetzten Agonisten.

Führen steigende Antagonistenkonzentrationen zu einer Minderung des Maximalwertes und einem gleichbleibenden EC_{50} -Wert des Agonisten, so handelt es sich um einen nicht kompetitiven Antagonisten zum eingesetzten Agonisten.

Aus der Rechtsverschiebung lässt sich das Konzentrationsverhältnis r berechnen. Das Konzentrationsverhältnis r wird als $\log(r-1)$ gegen den Logarithmus der eingesetzten Antagonistenkonzentration im Schild-Plot eingetragen und dient zur Ermittlung des pA_2 -Wertes. Die Steigung und Linearität liefern Aussagen über die Art des Antagonismus

123,144

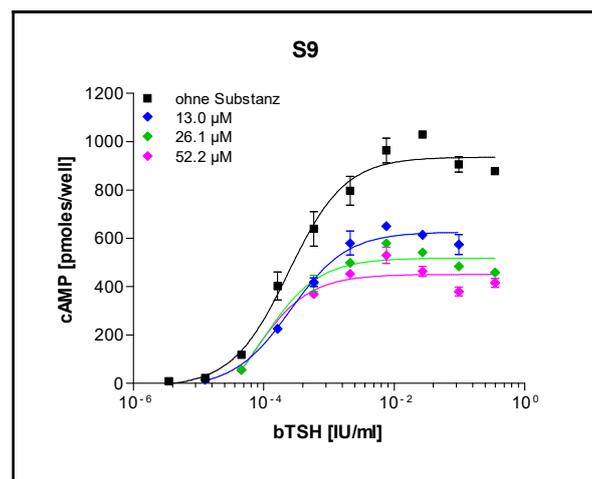


Abbildung 6-25: Schild-Regressions-Analyse für S9 durchgeführt in HEK293T-TSHR-Zellen. Die Stimulation erfolgte mit ansteigenden Konzentrationen von bTSH allein (schwarz) und einer Zugabe der S9 (13 µM blau; 26,1 µM grün, 52,2 µM pink). Jeder Datenpunkt wurde als Doppelwert bestimmt. Angegeben ist der jeweilige arithmetische Mittelwert \pm Standardabweichung.

Nach einer Behandlung der Zellen mit der Substanz S9 konnte der Maximalwert durch bTSH-Stimulation nicht mehr erreicht werden (Abbildung 6-26). Die ermittelten bTSH EC_{50} -Werte sind zur mitgeführten Kontrolle (schwarze Kurve Abbildung 6-26) vergleichbar. Dieses Ergebnis lässt auf einen zu bTSH kompetitiven Antagonisten schließen.

Die Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurven beim Einsatz höherer Konzentrationen des Antagonisten S37, die Abnahme des EC_{50} -Wertes vom Agonisten (bTSH) sowie das Erreichen des Maximalwertes lassen darauf schließen, dass sowohl

S37 als auch S2/7 kompetitive Antagonisten zu bTSH sind. Die ermittelte Linearität und der Anstieg aus der Schild-Plot-Analyse bestätigten diese Annahme.

Um die Annahme zu überprüfen, wurden Schild-Regressions-Analysen für die Substanzen S37, S2/7, S4 und S9 unter dem Einsatz des Agonisten *compound 2* erstellt. *Compound 2* ist ein kleines Molekül, das innerhalb der Transmembrandomäne des TSHR bindet⁷⁵. Ein optimaler Stimulationsbereich des TSHR durch *compound 2* wurde anhand der *compound 2* Konzentrations-Wirkungskurven definiert (Abbildung 6-27).

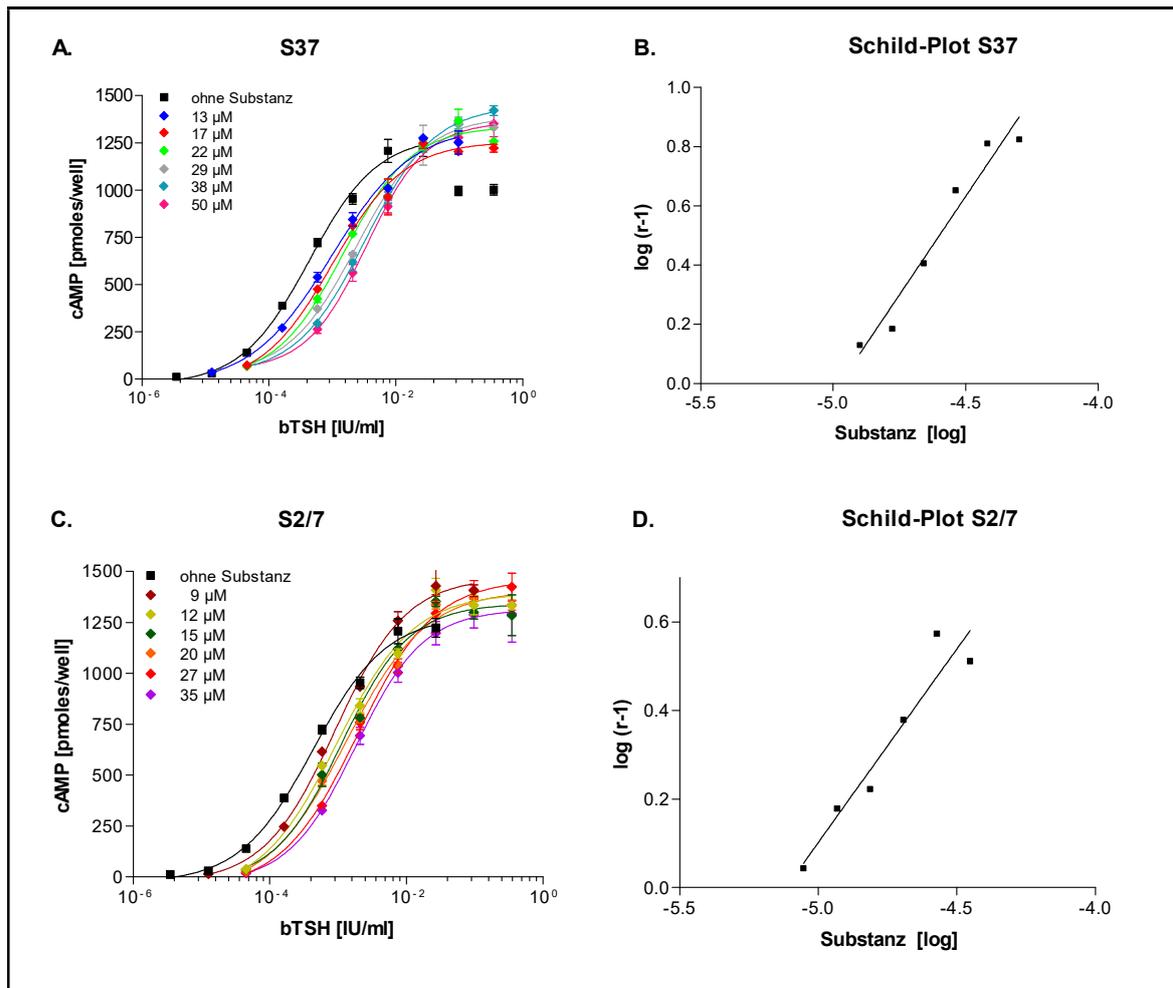


Abbildung 6-26: Schild-Regressions-Analyse (A,C) und Schild-Plot (B, D) für S37 (A, B) und S2/7 (C, D). Jeder Datenpunkt wurde als Doppelwert bestimmt. Angegeben ist der jeweilige arithmetische Mittelwert \pm Standardabweichung.

Die Stimulation der HEK293T-TSHR-Zellen mit *compound 2* und die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit den Substanzen (S37, S2/7, S4 und S9) führten zu einer Abnahme des Maximalwertes. Die EC_{50} -Werte für *compound 2* blieben vergleichbar zur Kontrolle (Abbildung 6-28; schwarze Kurve).

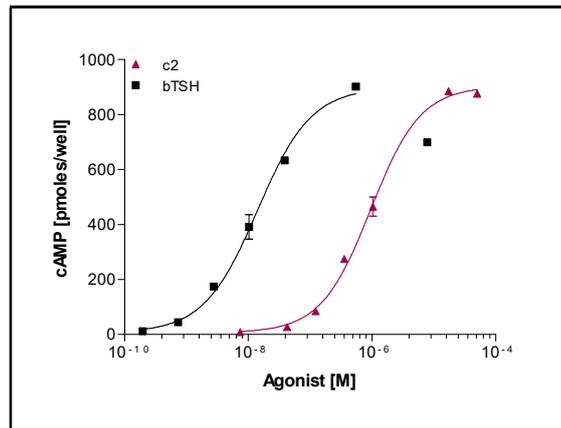


Abbildung 6-27: Konzentrations-Wirkungskurven für *compound 2* und bTSHR, durchgeführt in HEK293T-TSHR-Zellen. Jeder Datenpunkt wurde als Doppelwert bestimmt. Angegeben ist der jeweilige arithmetische Mittelwert \pm Standardabweichung.

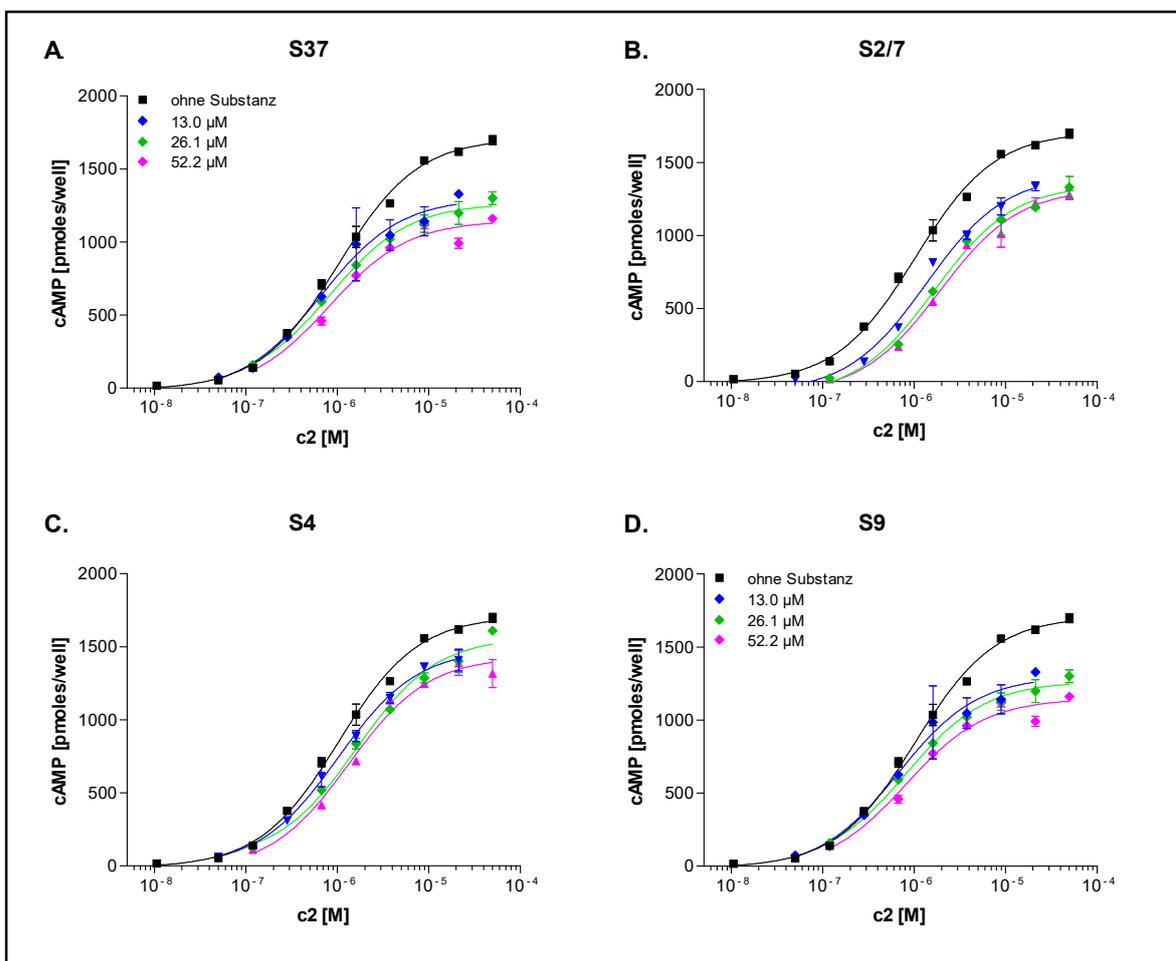


Abbildung 6-28: Schild-Regressions-Analyse für S37, S2/7, S4 und S9, durchgeführt in HEK293T-TSHR-Zellen. Die Stimulation erfolgte mit ansteigenden Konzentrationen von *compound 2* allein (schwarz) und einer Zugabe der Substanzen (13µM blau; 26,1µM grün, 52,2µM pink). Jeder Datenpunkt wurde als Doppelwert bestimmt. Angegeben ist der jeweilige arithmetische Mittelwert \pm Standardabweichung.

Somit sind die Substanzen S37, S2/7, S4 aber auch S9 nicht kompetitiv zu *compound 2*. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die getesteten Substanzen eine andere Interaktionsstelle am TSHR haben, als der Agonist *compound 2*.

7. DISKUSSION

7.1. EINFLUSS VON ALANIN AN DER POSITION 593 (5.50) AUF DIE TSHR-KONFORMATION

Im ersten Teil der Arbeit wurden unter Anwendung der zielgerichteten Mutagenese Sequenz-Struktur-Funktionsbeziehungen des TSHR analysiert, die die potentielle Bindungstasche für kleine Moleküle beeinflussen können. Ausgangspunkt waren Mutationsergebnisse an TMH5, die im Widerspruch mit dem ursprünglichen, auf Rhodopsin basierenden Homologiemodel standen. In dieser Arbeit charakterisierte Mutationen an der Position 593 im TSHR deuten darauf hin, dass der N-terminale Bereich der TMH5 des TSHR im Vergleich zu Rhodopsin/Opsin um circa 10 bis 15 Grad gedreht sein muss. Das an dieser Position in vielen GPCR hochkonservierte Prolin ist beim TSHR durch ein Alanin ersetzt. Die durch LSM und FACS ermittelte Oberflächenexpression zeigt, dass das eingeführte Prolin im TSHR zu einer starken Reduktion der Rezeptorexpression an der Plasmamembran führt.

Dies bestätigt sich auch im Western Blot. Nach einer Immunpräzipitation konnte keine komplex-glykosilierte Bande für die Mutante nachgewiesen werden. Die Analyse des Glykosylierungsstatus der A593P-Mutante ergab nur eine 100 kDA-große Proteinbande. Diese Bande entspricht der mannosereichen Glykosylierungsform des Rezeptors und ist für die unreifen Rezeptoren im ER und frühen Golgi-Apparat charakteristisch. Dieses Ergebnis lässt auf die Fehlfaltung der Mutante schließen, die nur bedingt an die Oberfläche transportiert wird.

Die Proteinmodifikation beginnt im ER und wird im Golgi-Apparat fortgeführt. Dabei spielt die Glykosylierung eine wichtige Rolle. Sie ist der Angriffspunkt für molekulare Chaperone wie Calnexin und Calretikulin. Diese beiden sind Bestandteil des Qualitäts-Kontroll-Systems in der Zelle. Calnexin und Calretikulin fördern die korrekte Proteinfaltung und verhindern, dass inkorrekt gefaltete Proteine weiter transportiert werden. Oligosaccharide können die Affinität für Bindungspartner verändern, fungieren als Transportsignal und sorgen für den Proteintransport zum entsprechenden Kompartiment¹⁴⁵.

Die Gruppe von Nagayama konnte zeigen, dass die Modifikationen der Oligosaccharide die funktionelle Reifung des TSHR beeinflussen. Die Hemmung der Glykosylierung durch Behandlung mit Tunicamycin führte zu einem nicht-glykosylierten TSHR, der nicht korrekt gefaltet war. Die Modifizierung der mannosereichen Glykosylierungsform in die komplex glykosylierte Form im Golgi-Apparat steht im direkten Zusammenhang mit der Oberflächenexpression des TSHR⁶¹. Die Daten von Nagayama et al. zeigten, dass die *N*-Glykosylierung im TSHR für die korrekte Faltung im ER und für den intrazellulären Trans-

port zum Golgi-Apparat wesentlich sind, jedoch keinen Einfluss auf die Bindung von TSH und TSHR-Autoantikörpern haben. Diese Arbeitsgruppe konnte unter anderem auch zeigen, dass die mannosereiche Form der TSHR (Man5GlcNAc₂), eine höhere Affinität zu TSH hat⁶¹. Inwieweit dies für die A593P-Mutante eine Rolle spielt, ist nicht klar. Die höhere Affinität zu TSH und die erhöhte basale Aktivität könnten die Ergebnisse erklären. Hierfür sind weitere Analysen notwendig, z. B. Bindungsstudien.

Die Ergebnisse der Signalisierung zeigen, dass der Maximalwert der A593P-Mutante etwa 70% des WT-Wertes erreicht. Dies steht im Kontrast zur stark minimierten Oberflächenexpression, die nur 10% des WT beträgt.

Die veränderte Basalaktivität (nicht TSH-induzierte Stimulation) der Mutanten A593G, A593P und A593V deuten auf deren Beteiligung an der Signalisierung und Stabilisierung der basalen Konformation hin. Die in vielen GPCR hochkonservierte Position hat im TSHR eine vergleichbare Funktion. Die Veränderung dieser Position hat immer eine Veränderung in der Basalaktivität zur Folge. Außerdem wurden pathologischen Mutationen im TSHR an der Position A593 beschrieben, die pathologischen CAM A593N¹⁴⁶ und die pathologische, inaktivierende Mutation A593V¹⁴⁷. Basierend auf der funktionellen Charakterisierung von A593V könnte deren inaktivierende Wirkung durch eine verminderte Expression (ca. 40%) und durch die verringerte Basalaktivität als ein Hauptgrund für die beobachtete, leichte angeborene primäre Hypothyreose zu erklären sein. Interessanterweise führt die Mutation von V509^{3,40} in der TMH3 zu einer 2,8-fachen Erhöhung der Basalaktivität. Vom Modell ausgehend sind V509^{3,40} und A593^{5,50} Interaktionspartner, denn die Doppelmutation V509A-A593V zeigt eine dem WT vergleichbare basale Aktivität¹⁴⁸. Demnach ist der Kontakt zwischen A593 und V509 an der Stabilisierung der basal aktiven Konformation beteiligt. Die jüngsten Erkenntnisse aus der Kristallstruktur einer aktivierten Rezeptorkonformation des β 2-adrenergen Rezeptors entsprechen den hier gewonnenen Daten. Die Position 5.50 der TMH5 und die Region um Position 3.40 der TMH3 scheinen im direkten Zusammenhang mit der Signalregulierung des Rezeptor zu stehen¹⁴⁹.

Die Berücksichtigung der Sequenzspezifität der Position 5.50 bei der Erstellung eines TSHR-Homologiemodells führte zu dem Ergebnis zweier möglicher Konformationen der TMH5. Berücksichtigt man das Prolin an der Position 5.50, wie die Kristallstruktur des Rhodopsins es vorschlägt, so ergibt sich eine Unterbrechung der regulären α -Helix-Konformation durch eine Aufweitung der TMH5-Rückgratstruktur. Die Berücksichtigung des Alanins an dieser Position führt zu einer regulären α -Helix-Konformation der TMH5.

Die beiden Variationen der α -Helix-Struktur der TMH5, bedingt durch Prolin bzw. Alanin, haben eine deutliche Veränderung der räumlichen Orientierungen der Seitenketten zur Folge. Im TSHR Homologiemodell 1 (Abbildung 6-5, basierend auf Prolin) ist Leucin an

der Position L587^{5.54} in Richtung der Membran orientiert, im TSHR-Modell 2 (reguläre α -Helix-Struktur) hingegen zeigt Leucin zur TMH6 hin. Die vorausgegangenen Studien zeigten, dass die Einführung von Valin anstelle von Leucin (L587^{5.54}) zu einer konstitutiven Aktivierung des TSHRs führt^{68,69}. Mit der Charakterisierung der Aminosäuren der TMH5 und TMH6 wurde der Interaktionspartner von L587 identifiziert. Die erhobenen Daten führen zu der Hypothese, dass L587^{5.54} (TMH5) mit L645^{6.56} (TMH6) interagiert. Die Veränderung an der Position L645^{6.56} zu Valin führt ebenfalls zu einer konstitutiven Aktivierung des TSHRs (Kleinau et al. 2011). Diese Daten bekräftigen die Annahme, dass der TSHR eine reguläre α -Helix-Konformation (wie im TSHR-Modell 2, Abbildung 6-5, dargestellt) aufweist.

Alle in diesem Abschnitt erzielten Ergebnisse zeigen, dass im TSHR mit Alanin an Position 593 (5.50) eine durchgängig reguläre α -helikale-Konformation vorliegt und nicht eine aufgeweitete helikale Rückgrat-Konformation, wie in vielen anderen GPCR der Familie A, die an dieser Position ein Prolin aufweisen. Dieser aufgeweitete Helixturn führt zur Verschiebung der helikalen Konformation im N-terminalen Teil der TMH5 und damit zur Verschiebung der räumlichen Anordnung der Aminosäureposition um je eine Aminosäure. Das hat zur Folge, dass sich die wechselwirkenden Aminosäuren mit den benachbarten Helices ändern. Das erklärt auch, weshalb die Ersetzung des Alanins durch Prolin im TSHR strukturell nicht toleriert und es zur beobachteten Fehlfaltung kommt. Die hier vorgelegten Ergebnisse belegen aber auch, dass der TSHR in diesem Bereich eine individuellere Konformation bzw. konformationelle Mikrodomäne zwischen TMH5/TMH6 und TMH3 aufweist.

Die hier diskutierte Konformation und Interaktionen an der TMH5 im Homologiemodell des TSHR wurden kürzlich durch die veröffentlichte Kristallstruktur des P2Y12-Rezeptors¹⁵⁰ bestätigt. Während die meisten aufgelösten Strukturen von GPCR der Familie A ein hochkonserviertes Prolin an der Position 5.50 haben, was zu einem Bruch der α -Helix-Struktur führt, weist der P2Y12-Rezeptor ein Asparagin an dieser Position auf. Die Kristallstruktur des P2Y12-Rezeptors zeigt, wie auch für TSHR vorhergesagt, eine reguläre α -helikale Struktur der TMH5. Darüber hinaus hat der P2Y12-Rezeptor keine anderen Prolin- oder Glycin-Reste in der TMH5, die einen destabilisierenden Einfluss auf seine reguläre α -Helix-Konformation haben könnten¹⁵⁰. Dies gilt auch für den TSHR.

7.2. PRIMÄRES SCREENING ZUR IDENTIFIZIERUNG DES TSHR-ANTAGONISTEN

In den letzten zehn Jahren entwickelten sich Hochdurchsatzverfahren zu einem innovativen multidisziplinären Gebiet innerhalb der biologischen Chemie und der Biologie. Die Sequenzierung des menschlichen Genoms zusammen mit der Entwicklung kombinatori-

scher Synthesen und der Durchführung biologischer HTS bieten beispiellose Möglichkeiten zur Medikamentenentwicklung ¹⁵¹.

Die erste Entwicklung eines Arzneimittels kann in zwei Phasen eingeteilt werden. Phase 1 besteht aus der HTS-Durchführung mit dem Ziel einen Hit zu identifizieren. Dabei wird eine große Anzahl an chemischen Substanzen auf ihre biologische Wirksamkeit getestet. Das Ziel ist es, aus einer großen Menge getesteter Substanzen diejenige mit einer konzentrationsabhängigen Wechselwirkung zum Rezeptor zu identifizieren ¹⁵².

Phase 2 besteht aus der Optimierung und Charakterisierung der Hits (identifiziert im HTS) durch methodisch synthetische Modifikationen zur Charakterisierung und Erhöhung der biologischen Aktivität. Diese Phase ist entscheidend für die therapeutische Relevanz der Substanz. Während dieser Phase wird die molekulare Struktur der Substanz verändert, um die gewünschte Aktivität auf den Rezeptor zu maximieren ¹⁵².

Die EO ist die häufigste extrathyreoidale Manifestation der autoimmunen Hyperthyreose vom Typ Morbus Basedow ⁹⁵. Es ist eine organspezifische Autoimmunerkrankung deren Ursache in der Autoantikörperbildung gegen TSHR vermutet wird. TSHR wird in OF exprimiert und die Rezeptoraktivierung durch Antikörper führt zur immunologischen Entzündung des retrobulbärem Gewebes. Dies hat ein Anschwellen des Muskel-, Fett- und Bindegewebes und das damit verbundene Hervortreten des Auges (Exophtalmus) zur Folge. Die Entwicklung allosterischer Liganden, die direkt am TSHR als Ursache angreifen würde die vorhandene therapeutische Lücke schließen, denn bis heute ist kein selektiver TSHR-Antagonist bekannt. Die als selektiv wirkenden TSHR-Antagonisten publizierte Substanzen, *compound 2* und Org274179-0, zeigen biologische Aktivität an homologen Rezeptoren ^{26,116}.

Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Durchführung eines Hochdurchsatzverfahrens zur Identifizierung antagonistisch wirkender Substanzen am TSHR, die als Hit-Substanz für die Verifizierung sowie Charakterisierung und erste Optimierung im sekundären Assay untersucht werden sollten.

7.2.1. FMP SUBSTANZBIBLIOTHEK, CHEMBIONET

Die Durchführung eines HTS im akademischen Bereich ist nur im begrenzten Ausmaß möglich. Die finanziellen Mittel und die Anzahl der Substanzen sind im Vergleich zu einem industriell durchgeführten HTS limitiert. Der Erfolg und die Effizienz des HTS hängen stark von der Vorauswahl der biologisch aktiven chemischen Verbindungen ab, denn eine hohe Anzahl getesteter chemischer Verbindungen allein führt oft nicht zu der erwarteten Zunahme der Wirkstoffkandidaten ¹⁵¹.

Die Limitierung in der Substanzanzahl im akademischen Bereich wurde durch die optimierte Substanzbibliothek des FMP kompensiert. Die Arbeitsgruppe von Ronald Kühne (FMP, Berlin) erstellte eine ChemBioNet Substanzbibliothek. Das Ziel war es, eine Substanzbibliothek an putativen bioaktiven Verbindungen zu generieren, welche eine möglichst große chemisch-strukturelle Vielfalt aufweisen. Die Verbindungen mit reaktiven und unstabilen funktionellen Gruppen (z. B. Sulfonsäurehalogenide, Sulfonat, Aziridin, Carbonsäurehalogenide) wurden aus der Bibliothek ausgeschlossen¹⁵³. Die sorgfältige Auswahl der bioaktiven Verbindungen wurde unter Berücksichtigung des jeweiligen Substanzgrundgerüsts und dessen physikalisch-chemischen Eigenschaften mithilfe des MCS-Algorithmus (*maximum common substructure algorithm*)¹⁵⁴ anhand des *World Drug Index* (WDI) getroffen¹⁵³. Zum Zeitpunkt der HTS-Durchführung beinhaltete die ChemBioNet Substanzbibliothek insgesamt 16671 Substanzen.

7.2.2. HTS: VOR- UND NACHTEILE

HTS ist ein wichtiger Bestandteil der Arzneimittelforschung, dessen Ziel die Identifizierung von biologisch aktiven Substanzen ist. Dabei bildet das Bestreben nach einer Kostenreduktion durch Automatisierung sowie Miniaturisierung des durchgeführten Assays die treibende Kraft hinter der HTS-Technologie^{155,156}.

Ein HTS bringt sowohl Vorteile als auch Nachteile mit sich. Es bildet eine kostengünstige Variante zur Identifizierung der potentiellen Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Arzneistoffe durch eine rasche Testung einer Vielzahl von Substanzen (Zehntausende bis Millionen) in einer kurzen Zeit. Doch gerade diese Vorteile haben auch die Nachteile des HTS zu Folge. So beinhalten die Ergebnisse des HTS insbesondere in einem zellbasierten Assay oft falsch positive Hits, da zusätzliche Substanzeigenschaften (z. B. Eigenfluoreszenz, Löslichkeit, Absorption und Aggregation)¹⁵⁶ das Messergebnis verfälschen können. Die Bedingungen, unter denen ein HTS durchgeführt wird, schränken auch die quantitativen Aussagen über die Wirkstärke (Potenz) und Selektivität der Substanzen ein. Die wichtigen pharmakologischen Parameter, wie Substanz-Resorption, -Verteilung, -Speicherung, -Metabolisierung und -Exkretion, sowie Zellmembran- bzw. Gewebepерmeabilität und Toxizität werden im HTS nicht oder nur unzureichend berücksichtigt. Demnach ist und bleibt die Verifizierung der pharmakologischen Parameter der Substanzen in einem sekundären Assay, möglichst in einer anderen Zellenlinie, notwendig^{16,156}.

Des Weiteren muss das im HTS verwendete Assay empfindlich und robust sein, ohne dabei falsch positive Hits zu erzeugen¹⁵⁵. Der Fokus der Assay-Optimierung, -Validierung und -Kalibrierung sollte auf Parametern der Assay-Robustheit liegen, unter der Berücksichtigung des Signal-Rausch-Verhältnisses, der Standardabweichungen und des Z-Faktors bzw. Z'-Faktors^{129,155}.

Das HTS zur Identifizierung antagonistisch wirkenden Substanz auf TSHR war das erste in der Screening Unit des FMP durchgeführte GPCR-HTS.

7.2.3. AUSWAHL DES ZELLSYSTEMS UND KALIBRIERUNG DES ZELlassAYS

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen zellbasierten und zellfreien Assays für HTS. Die zellbasierten Systeme beruhen in der Regel auf der Messung der nachgeschalteten (*downstream*) Signalisierungsereignisse, wie die Produktion verschiedener sekundärer Botenstoffe (z. B. cAMP, IP₃ oder Ca²⁺). Die Möglichkeiten eines zellfreien Systems für die GPCR ist eher begrenzt, da nachgeschaltete Zielproteine (z. B. Adenylylcyclase, Phospholipase C) in der Regel in solchen Präparaten nicht vorhanden sind¹⁵⁵.

In dieser Arbeit wurde ein zellbasiertes HTS zur Identifizierung von TSHR Antagonisten erfolgreich etabliert und durchgeführt. Dafür war es erforderlich ein geeignetes Zellsystem und Zellassay zu finden, in dem das Messfenster für cAMP-abhängige Inhibierung auswertbar beurteilt werden konnte.

Die Wahl des Expressionssystems fiel aus zwei Gründen auf *die Chinese Hamster Ovary* (CHO)-Zelllinie. Zum einem könnte die Anwesenheit von endogenen Rezeptoren, insbesondere in säugerheterologen Expressionssystemen, ein Hintergrund-Signal zu Folge haben¹⁹. Zum anderen erfordern die im HTS notwendigen Waschschriffe eine Zelllinie, die sich nicht vom Boden des Wells ablöst. Die CHO-K1-Zelllinie erfüllte beide Anforderungen, denn die Zellen exprimieren kein endogenes TSHR und eine Ablösung nach dem Waschen wurde, im Gegensatz zu HEK293T-Zellen, nicht beobachtet. Somit erwies sich die CHO-K1-Zelllinie als geeignetes Zellsystem für HTS. Die Expression von humanen TSHR erfolgte durch stabile Transfektion und die Kontrolle des Expressionssystems wurde über die FACS-Analyse nachgewiesen (Abbildung 6-13).

Die cAMP-Messung im HTS erfolgte mit einem kommerziell erworbenen EFC-Assay¹²⁵⁻¹²⁷. Zur Durchführung des HTS wurden die Zellzahl, die Inkubationszeiten und optionale Waschschriffe optimiert und etabliert (Kapitel 5.3.5.1.1).

Des Weiteren wurden Z-Faktor und Z'-Faktor als statistische Parameter zu Beurteilung des Messfensters und der Assay-Qualität bestimmt (Kapitel 5.3.5.1.5). Gleichzeitig diente der Z-Faktor als Kontrollmaß für die Signaltrennung auf einer Platte¹²⁹.

Zur der Einschätzung der Eignung des EFC-Assays für die Durchführung des HTS erfolgte in einem Pilot-Screening. Hierfür wurden 4x 384 Wellplatten mit CHO-K1-TSHR-Zellen (15000 Zellen/Well) ausgesät und nach Protokoll behandelt (Kapitel 5.3.5.1.1). Die Auswertung ergab, dass sowohl der Z-Faktor als auch Z'-Faktor im optimalen Bereich lagen (Z-Faktor bei 0,62-0,9; Z'-Faktor bei 0,89; Kapitel 5.3.5.1.5).

Des Weiteren wurden EC_{80} -Werte für bTSH bestimmt. Der EC_{80} -Wert für bTSH betrug 2,14 IU/ml und stellt damit eine Konzentration am oberen Abschluss des linearen Bereiches der Konzentrations-Wirkungskurve dar. Dieser Wert eignete sich am besten zur Testung der antagonistischen Substanzaktivität. Er erlaubt eine Rezeptoraktivierung und bietet gleichzeitig ein gutes und sichtbares Messfenster für die Hemmung.

Die Auswertung der inhibitorischen Wirkung der getesteten Substanzen auf den TSHR erfolgte mithilfe des *Pipeline Pilot* Programm durch Martin Neuenschwander (Schreening Unit, FMP, Berlin) ¹³⁹.

7.2.4. IDENTIFIZIERUNG DER HIT-SUBSTANZEN, ALS TSHR-ANTAGONISTEN

Im HTS wurden 350 positive Hits erzielt. Das Auftreten falsch positiver Ergebnisse im HTS lässt sich vermindern, aber nicht komplett ausschließen ¹⁵⁵. Um die Menge falsch positiver Hits zu reduzieren, wurden für jede der 350 Substanzen eine 9-Punkte Konzentrations-Wirkungskurve zur Bestimmung der dosis-abhängigen Inhibierung der Substanzen erstellt. Diese Analyse führte zu 263 potenziellen TSHR-Antagonisten.

Ziel des HTS war es, antagonistisch wirkende Substanzen zu identifizieren, die direkt mit dem TSHR interagieren und die cAMP-Bildung durch Rezeptorinaktivierung beeinflussen. Zur Testung der direkten Substanz-Rezeptor-Interaktion wurde ein Assay in der CHO-K1-Zelllinie ohne TSHR durchgeführt. Bei einer direkten Einwirkung der Substanz auf den Rezeptor ist in einer rezeptorfreien Zelllinie keine Herabsetzung der cAMP-Produktion zu erwarten. Zeigen die Substanzen dennoch einen Einfluss auf die cAMP-Produktion, so kann davon ausgegangen werden, dass die getesteten Substanzen in einem anderen Bereich der Signalkaskade eingreifen. Die Auswertung führte zur Identifizierung von zwölf chemisch unterschiedlichen Verbindungen (Tabelle 6-2).

Die unterschiedliche Wirkung der Substanzen in verschiedenen Zellen ist bekannt, deshalb wurden die zwölf im HTS identifizierten Substanzen in einem HEK293T-TSHR-Zellsystem mittels RIA-Assay getestet. Diese Testung führte zur Verifizierung der drei Substanzverbindungen S4, S8 und S9 (Tabelle 6-2).

Zwei dieser Verbindungen, die Substanzen S4 und S9, bildeten die Grundlage für weiterführende Untersuchungen zur Charakterisierung und Optimierung der TSHR-spezifischen und -selektiven Antagonisten.

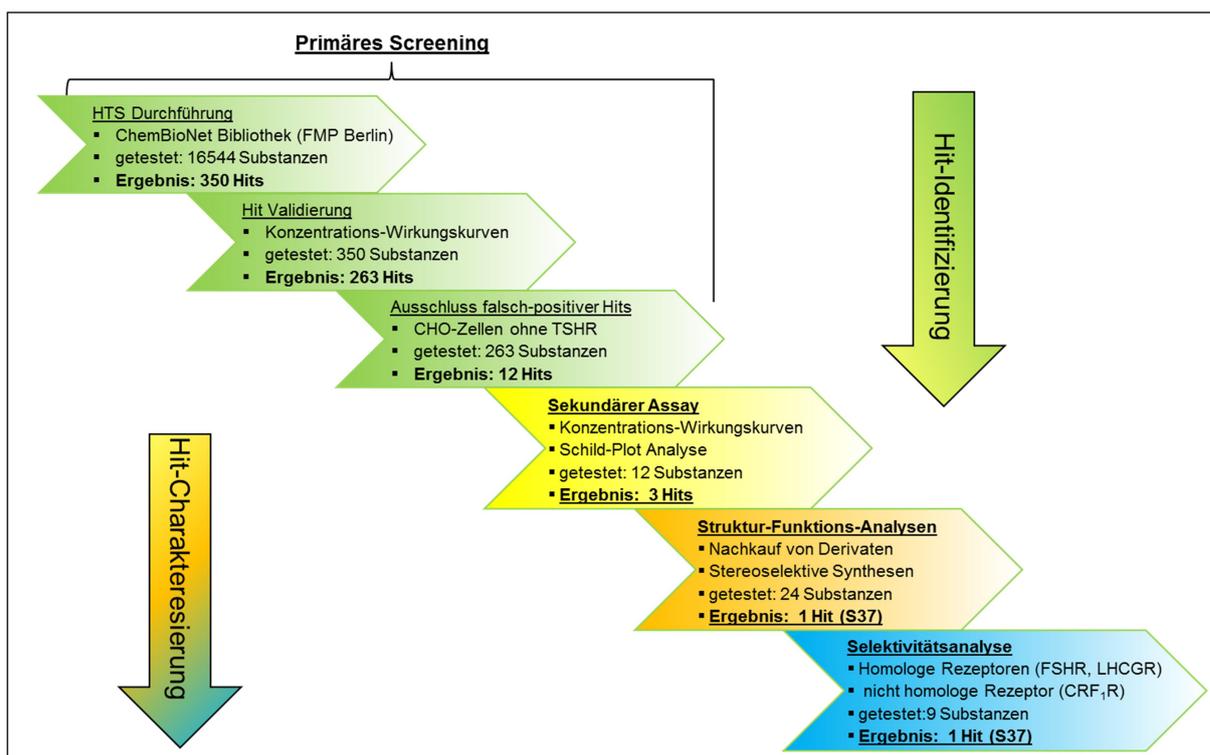


Abbildung 7-1: Vom Primären Screening bis zum Hit. Dargestellt sind die durchgeführten Arbeitsschritte zur Hit-Identifizierung, -Charakterisierung und -Optimierung.

7.2.4.1. HIT-SUBSTANZ S4

Die kommerziell bei der Firma ChemDiv erhältliche Substanz S4 (*10-phenyl-7(p-tolyl)-5,5a8a,9,99a,10-hexahydro-5,9-methanothiazolo[5',4':5,6]thiopyrano[2,3-f]isoindole-2,6,8(3H,4aH,7H)-trione*) ist vermutlich eine Mischung von mehreren Stereoisomeren (*endo*-/*exo*-Isomere) mit sieben Stereozentren. Das Norbornengrundgerüst von S4 wurde auf beiden Seiten des Norbornens mittels zweier aufeinanderfolgender Diels-Alder-Reaktionen aufgebaut und dekoriert.

S4 zeigt eine dreifache agonistische Wirkung am TSHR. Die Analysen verschiedener S4-Derivate sollten klären, welche funktionellen Gruppen für die agonistische Eigenschaft der Substanz verantwortlich sind, um diese minimieren bzw. eliminieren zu können.

7.2.4.2. HIT-SUBSTANZ S9

Die ebenfalls bei der Firma ChemDiv käufliche Substanz S9 (*2-(3-nitro-4-(4-(3-(trifluoromethyl)phenyl)piperazin-1-yl)phenyl-3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-4,7-methanoisoindole-1,3(2H)-dione*) liegt ebenso wie S4 als eine Mischung von mehreren Stereoisomeren (*endo*-/*exo*-Isomere) mit vier möglichen Stereozentren vor und weist eine für GPCR bereits bekanntes Strukturmotiv der Piperazine bzw. Phenylpiperazine auf¹⁵⁷. Die Phenylpiperazin-Struktur bedingt die Affinität zum Rezeptor ist aber gleichzeitig für die nicht-spezifische Bindung verantwortlich¹⁵⁸. Die Struktur ist unter anderem Bestandteil

von Trazodon, einem Psychopharmakon mit den Eigenschaften eines Sedativums und Antidepressivums. Bei Trazodon handelt es sich um einen selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer mit zusätzlicher ausgeprägter antagonistischer Wirkung auf die 5HT₂-Rezeptoren und einer α -adrenolytischen Komponente ¹⁵⁹. Das Piperazin wurde in den 60er-Jahren als Anti-Wurmmittel verabreicht und hat eine GABA-agonistische Wirkung ¹⁶⁰.

Die Dekoration der Phenylpiperazine bedingt die Selektivität der einzelnen Rezeptoren. Basierend auf diesen Kenntnissen wurden verschiedene S9-Derivate funktionell charakterisiert.

7.3. CHARAKTERISIERUNG UND OPTIMIERUNG DER HIT-SUBSTANZEN

Die im HTS identifizierten Substanzen haben nicht automatisch die Qualität einer Leitstruktur. Das Hauptziel der Wirkstoffforschung ist die gezielte Optimierung der Substanzigenschaften bei gleichbleibender oder verbesserter Affinität zum Zielprotein ¹⁵². Somit nehmen die Charakterisierung und die Optimierung der im HTS identifizierten Hit-Substanzen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung einer Leitstruktur ein ¹⁵².

7.3.1. OPTIMIERUNG DER HIT-SUBSTANZEN ANHAND DER SAR

Die Optimierung der pharmakologischen Aktivität der identifizierten Hit-Substanzen erfolgte anhand der SAR (Kapitel 6.4.1). Die SAR ist ein sich wiederholender Prozess aus computerunterstütztem molekularem Modeling, chemischer Synthese neuer Substanzen und deren funktionaler Analyse ¹⁴⁰. Hierfür wurden zum einen den Hit-Substanzen ähnliche Substanzen nachgekauft (Tabelle 6-3; Tabelle 6-4), zum anderen stereoselektive Derivate der Hit-Substanzen synthetisiert (Tabelle 6-5; Tabelle 6-6).

Das Ziel der SAR-Studie ist, zu klären, welche funktionellen Gruppen und strukturellen Merkmale der Substanzen für die antagonistische Wirkung und Selektivität ausschlaggebend sind. Die Substanzen S4 und S9 bildeten den Ausgangspunkt für die Auswahl sowohl käuflicher Substanzen als auch stereoselektiver Synthesen.

7.3.2. SAR DER KOMMERZIELL ERWORBENEN SUBSTANZEN

Die Auswahl der kommerziell erworbenen Substanzen wurde anhand des Tanimoto-Koeffizienten ¹⁴² getroffen, mit dem Fokus, das Grundgerüst der Substanzen beizubehalten. Der Austausch der funktionellen Gruppen sollte deren Einfluss auf die Rezeptorinhibition klären. Alle Substanzen (Tabelle 6-3; Tabelle 6-4) wurde von der Firma ChemDiv bzw. Vitas-M Laboratory erworben und ihre antagonistische Wirkung funktionell charakterisiert.

Keine der Substanzen zeigte eine bessere antagonistische Wirkung auf TSHR als die Ausgangssubstanzen S4 und S9, die im HTS identifiziert wurden. Die Konformation der kommerziell erworbenen Substanzen ist vom Anbieter nicht festgelegt, so dass man davon ausgehen musste, dass die kommerziell erworbenen Substanzen als Isomeren-Gemische vorlagen.

Die stereoselektiven Synthesen sollen den Einfluss der *endo*-/*exo*-Isomerie der Norbornen-Struktur klären.

7.3.3. SAR DER STEREOSELEKTIV SYNTHETISIERTEN SUBSTANZEN

Die verschiedenen stereoselektiven Derivate von S4 und S9 wurden ausgehend von Anhydriden mit *endo*- bzw. *exo*-Konformation in der AG von Edgar Specker (FMP Berlin) synthetisiert¹⁴³. Die stereoselektiven Synthesen der *endo*-/*exo*-Isomere ermöglichten die Analyse der pharmakologischen Eigenschaften der einzelnen Isomere.

Für die Klärung der *endo*-/*exo*-Isomerie von S4 wurden zwei Derivate, S36 (*exo*) und S37 (*endo*), synthetisiert¹⁴³. Die beiden Substanzen unterscheiden sich von S4 nur durch das Fehlen der Methylgruppe am Phenylring (Abbildung 6-20). Sowohl S36 als auch S37 haben sieben Stereozentren und liegen jeweils als Racemate vor.

Für die Klärung der *endo*-/*exo*-Isomerie von S9 wurden drei *endo*-/*exo*-Isomerenpaare mit unterschiedlichen Modifikationen am Phenylpiperazin synthetisiert (Tabelle 6-5). Das Isomerenpaar S30 und S31 unterscheidet sich von S9 durch die fehlende Trifluoromethyl-Substitution am Phenylring. Bei den Isomerenpaaren S32 und S33 bzw. S34 und S35 ist der 3-Trifluoromethylphenylring durch eine Methyl- bzw. Acetat-Gruppe ersetzt.

Die Substanz S38 enthält strukturelle Merkmale von den beiden Antagonisten S4 und S9. Das Norbornengrundgerüst ist an beiden Seiten analog zu S4 bzw. S9 derivatisiert worden. Die antagonistische Wirkung der Substanzen wurde mittels radioimmunologischer Bestimmung der cAMP-Konzentration ermittelt (Kapitel 5.3.4.1). Für die potentiell stärksten TSHR-Antagonisten mit einer antagonistischen Wirkung von über 40% (S4, S9 und S37) wurde deren antagonistischer Effekt in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration untersucht. Für diese potentiell wirksamsten Antagonisten wurden außerdem Konzentrations-Inhibitionskurven (Abbildung 6-27) erstellt und EC₅₀-Werte bestimmt (Tabelle 6-7).

7.3.4. CHARAKTERISIERUNG DER HIT-SUBSTANZEN UND IHRER DERIVATE

Die Testung der Substanzen unter entsprechenden pathologischen Bedingungen ist sehr schwierig und selten möglich. Trotz vieler Ansätze existiert für die EO kein geeignetes und zufriedenstellendes Tiermodell. Aus diesem Grund ist es wichtig viele Informationen über die Substanzeigenschaften *in vitro* zu bekommen.

Die Substanzen können entweder selektiv an einen bestimmten Rezeptor binden (z. B. β_1 -selektive Betablocker¹⁶¹) oder mit unterschiedlicher Affinität an verschiedenen Rezeptoren wirken (z. B. niederpotente Neuroleptika¹⁶²). Diese Eigenschaften bestimmen das Nebenwirkungsprofil, welches sich besonders bei Überdosierungen und Vergiftungen bemerkbar macht, da dann auch die Rezeptoren besetzt werden, die eine geringere Affinität für die Substanz aufweisen. Daher ist die Bestimmung der Substanzselektivität von entscheidender Bedeutung für die Weiterentwicklung. Durch das Erreichen einer hohen Selektivität können schwere Nebenwirkungen der Substanz vermieden werden¹⁶.

7.3.5. SELEKTIVITÄT UND THERAPEUTISCHES FENSTER

In dieser Arbeit wurden für die Selektivitätsanalysen ausgewählte Substanzen an den homologen Rezeptoren (LHCGR und FSHR) getestet. Außerdem wurden der CRF₁R (Negativkontrolle) und eine bereits bekannte Substanz S2/7, ein nicht selektiver TSHR-Antagonist (Kooperation zwischen der AG G. Krause; FMP, Berlin und AG M. Gershemgorn; NIH, USA), als Kontrolle bzw. Referenz mitgeführt. Während die Substanz S9 unspezifisch an alle drei homologen Rezeptoren bindet, interagiert die S4 neben TSHR auch mit LHCGR. Die Selektivitätsanalyse führte zur Identifizierung der Substanz S37, einem Derivat von S4, als TSHR-selektiven Antagonisten. Die Substanz S37 zeigt keine antagonistische Wirkung auf die beiden homologen Rezeptoren, LHCGR und FSHR, und auch nicht auf das Mitglied der Familie B, dem CRF₁R.

Die stereoselektiven Synthesen haben einen eindeutigen Fortschritt in Bezug auf die Substanz-Selektivität gebracht. Es wurde erstmals ein selektiver Antagonist für TSHR identifiziert. Die als selektive TSHR-Antagonisten publizierten Substanzen, c52 und Org 274179-0, die andere chemische Grundgerüsten aufweisen, wirken zwar im μM - bzw. sogar im nM-Bereich auf TSHR, zeigen aber auch eine biologische Aktivität an LHCGR bzw. FSHR. So ist c52 ein partieller Agonist für LHCGR²⁶ und Org 274179-0 zeigt eine deutliche antagonistische Wirkung auch auf FSHR¹¹⁶.

7.3.6. SCHILD-REGRESSIONS-ANALYSE UND SCHILD-PLOT ZUR BESTIMMUNG DES ANTAGONISTENTYPUS

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen kompetitiver und nicht kompetitiver Hemmung. Eine kompetitive Hemmung liegt vor, wenn zwei Liganden um eine Bindungsstelle konkurrieren und eine nicht kompetitive Hemmung liegt vor, wenn diese an zwei unterschiedlichen Stellen an den Rezeptor binden. Die Bindungsstelle, an welche der endogene, physiologische Ligand bindet, wird als orthosterische Bindungsstelle bezeichnet, demnach ist die große extrazelluläre Domäne des TSHR eine orthosterische Bindungsstelle des TSH. Eine allosterische Interaktion findet an einer anderen Stelle als an der des natürlichen Liganden statt¹⁵⁸. Im TSHR befindet sich in der transmembranären Domäne eine alloste-

rische Bindungsstelle. Bei der Entwicklung eines Wirkstoffes ist es von großer Bedeutung zu wissen, auf welche Art und Weise die eingesetzte Substanz auf den Rezeptor wirkt.

Zur Aufklärung, ob die Substanzen sich kompetitiv oder nicht kompetitiv zu bTSH verhalten, wurden Schild-Regressions-Analysen durchgeführt. Hierfür wurde der Rezeptor in HEK293T-TSHR-Zellen mit bTSH stimuliert und mit Substanzen behandelt (Kapitel 5.3.4.2). Die funktionalen Ergebnisse, dargestellt als Schild-Plot, lassen darauf schließen, dass sowohl S37 als auch S4 kompetitive Antagonisten zu bTSH sind. Diese Hypothese wurde dadurch bekräftigt, dass beide Substanzen sich in der gleichen Analyse nicht kompetitiv zu *compound 2* verhalten. *Compound 2* ist ein bekannter allosterischer TSHR-Agonist, für den anhand von Mutationsstudien die Interaktion innerhalb der allosterischen Bindungstasche des TSHR nachgewiesen wurde⁷⁵. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse des Schild-Plots darauf hin, dass die Substanzen S4 und S37 sich kompetitiv zum orthosterisch-bindenden bTSH, aber nicht kompetitiv zu dem allosterisch-bindenden Agonisten *compound 2* verhalten. Dieser Umstand ist für das angestrebte therapeutische Ziel äußerst interessant, da der gesuchte Antagonist die TSHR-Aktivierung durch autoimmune Antikörper blockieren soll, die am gleichen Ort wie TSH mit dem Rezeptor interagieren.

Die Schlussfolgerung, dass die Substanzen S4 und S37 nicht allosterisch sondern orthosterisch-bindende TSHR-Antagonisten sind, steht im Kontrast zur publizierten Literatur. Alle bis jetzt beschriebenen kleinen Moleküle, sowohl Agonisten als auch Antagonisten für die GPHR, binden innerhalb der allosterischen transmembranären Bindungstasche des jeweiligen Rezeptors^{26,67}. Die hier erhobenen experimentellen Befunde lassen darauf schließen, dass beide Substanzen zumindest anders mit dem TSHR interagieren als *compound 2*. Diese Interaktion kann neben der direkten Konkurrenz zur Bindung des TSH auch die indirekte Konkurrenz an anderer Stelle zur Rezeptorsignalisierung durch TSH beinhalten.

In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass Van Koppen und Kollegen¹¹⁶ gezeigt haben, dass die Bindung des Antagonisten Org 274179-0 an dem TSHR zwar zu einer Änderung der Wirksamkeit des orthosterischen Liganden führt, jedoch nicht dessen Affinität zum Rezeptor verändert. Das Einsetzen steigender Antagonistenkonzentrationen führt zur geringfügigen Rechtsverschiebung der TSH-Konzentrations-Wirkungskurven. Gleichzeitig bleibt die Dissoziation von [125I]-TSH und Rezeptor unverändert. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Org 274179-0 die Fähigkeit des Ligand-Rezeptor-Komplexes, $G\alpha_s$ und $G\alpha_q$ Proteine zu stimulieren ändert, die Bindungsaffinität des Hormons zum Rezeptor aber gleich bleibt¹¹⁶. Das könnte die beobachtete Konkurrenz zwischen TSH und den Substanzen S4 bzw. S37 erklären. Eine weitere Erklärung wäre, dass die Bindung, z. B von S37, zu einer Änderung in der Rezeptorkonformation führt und sich

infolgedessen auch die Bindungsaffinität des orthosterischen Liganden vermindert, in diesem Falle die des extrazellulär bindenden TSH. Ein einfaches allosterisches GPCR-Modell nimmt an, dass die Bindung eines Liganden an einem allosterischen Ort die Affinität des orthosterischen Liganden moduliert. Dieses Modell wird als allosterisches ternäres Komplex-Modell bezeichnet¹⁵⁸ und könnte eine Erklärung für die scheinbar kompetitive Bindung zwischen S4 bzw. S37 und TSH liefern. Jedoch sind für eine eindeutige Klärung weitere experimentelle Analysen in Bezug auf Lokalisation der Bindungsstelle der Substanzen S4 und S37 notwendig.

7.3.7. TOXIZITÄT VON S37

Die Bestimmung der zytotoxischen Eigenschaften der Substanz S37 erfolgte mittels *alamarBlue*-Assay, durchgeführt in HEK293T-Zellen (Kapitel 0). Der Toxizitätstest ergab, dass die Substanz S37 in einem Konzentrationsbereich von 10 μ M bis 100 μ M keinen Einfluss auf die Vitalität dieser Zelllinie zeigt. Die zytotoxische Wirkung in anderen Zelllinien kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Weitere Analysen, insbesondere in Tumorzelllinien, sind erforderlich, da die funktionelle Einheit, ein Teilgerüst mit drei kondensierten heterozyklischen Ringen, (*4aS,5R,8S,8aR*)-3,4a5678,8a,9-octahydro2H-5,8-methanothiochromeno[2,3-d]thiazol-2-one) in S4 und S4-Derivaten enthalten ist, für die *in vitro* Antitumor-Aktivität gezeigt wurde¹⁶³. Diese drei kondensierten Ringe sind als Untereinheit auch in der Substanz S37 zu finden. Somit sind weitere zytotoxische Untersuchungen an dieser Stelle notwendig.

7.4. WERTUNG DER ERGEBNISSE

Die Entwicklung selektiv wirkender Substanzen ist eine Herausforderung, besonders wenn ein hoher Grad an struktureller Homologie zwischen Rezeptoren vorliegt. In dieser Arbeit durchgeführte HTS und die anschließende SAR-Analyse zur Optimierung und Charakterisierung führten zur Identifizierung der selektiv auf TSHR antagonistisch wirkenden Substanz S37, die keine toxische Wirkung in HEK293T-Zellen bei 100 μ M Konzentration zeigt.

Basierend auf der funktionellen Charakterisierung der S4- und S9-Derivate wurden detaillierte Erkenntnisse über deren inhibitorische Wirkung auf die agonisteninduzierte cAMP-Produktion am TSHR gewonnen. Die Ergebnisse können für die Optimierung eines selektiven und hochaffinen TSHR-Antagonisten genutzt werden. Dabei bilden die SAR-Analysen ein hilfreiches Werkzeug für die Entwicklung selektiver und hochaffiner Liganden.

In dieser Arbeit wurden zwei neue Hit-Substanzen, S4 und S9, gefunden und deren Derivate auf deren antagonistische Aktivität am TSHR charakterisiert.

7.4.1. SUBSTANZ S9

Die SAR-Analysen von S9 führten zu der Schlussfolgerung, dass jede Veränderung an der Substanzgrundstruktur eine Verminderung oder gar den kompletten Verlust der antagonistischen Aktivität zur Folge hat.

Der Austausch der Norbornenstruktur gegen Piperidindione (S25) oder ein Phenyl (S24) hat ein Herabsetzen der antagonistischen Substanzaktivität am TSHR von 75% auf ca. 30% zur Folge. Die Änderungen an Phenylpiperazin-Struktur zu 1-(3-Nitrophenyl)-Piperazine, zu 4-(2-Nitrophenyl)-Morpholin und zu Piperidin (S25, S27, S32, S33, S34, S35) führen ebenfalls zu einer Minderung bzw. zu einem kompletten Verlust der antagonistischen Aktivität. Dies lässt darauf schließen, dass die beiden Hauptstrukturmerkmale des chemischen Grundgerüsts, Norbornen und Phenylpiperazinring eine wichtige Rolle in der Substanz-Rezeptor-Interaktion einnehmen.

Des Weiteren wurde der Einfluss der Trifluoromethylphenyl-Substituenten untersucht. Das Entfernen (S30 und S31) bzw. der Austausch des Trifluoromethylphenyl-Substituenten gegen eine Methylgruppe (S32 und S33) bzw. Acetat führt zu drastischem Herabsetzen der antagonistischen Wirkung (auf 20%) bzw. komplettem Verlust der antagonistischen Aktivität (Tabelle 6-5).

Die Phenylpiperazin-Struktur, die in der Struktur von S9 zu finden ist, ist ein Bestandteil von verschiedenen Medikamenten (z.B. Trazodon), die gegen einen GPCR gerichtet sind. Eine besondere Bedeutung stellt dabei das tertiäre Amin dar. Viele bekannte aktive Agonisten und Antagonisten der Monoamin-GPCR beinhalten dieses chemische Motiv. Das tertiäre Amin der Phenylpiperazin-Struktur bedingt die Rezeptoraffinität, ist aber auch für die nicht spezifische Bindung verantwortlich^{157,164}. Die Dekoration der Phenylpiperazine bedingt die Selektivität der einzelnen Rezeptoren. Das stimmt auch mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten überein. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass S9 zwar ein guter TSHR-Antagonist ist, jedoch nicht TSHR-spezifisch. Zudem inhibiert S9 auch eine agonisteninduzierte Aktivierung bei homologen Rezeptoren in vergleichbarer Weise wie bei TSHR. Jede Veränderung an der Grundstruktur ging mit dem Verlust der antagonistischen Aktivität einher. Somit bleiben für weitere Modifikationen die NO₂ als funktionelle Gruppe die einzige Möglichkeit, die bisher noch nicht untersucht wurde.

7.4.2. SUBSTANZ S38

Interessant ist die Substanz S38, die sich aus strukturellen Merkmalen der Substanzen S4 und S9 zusammensetzt und in der *endo*-Konformation synthetisiert wurde. Beide Seiten des Norbornengrundgerüsts sind mit den gleichen strukturellen Motiven wie S37 und S32 dekoriert, so dass diese Substanz biologische Eigenschaften beider Substanzen, S37 und S32, aufweisen sollte. Die antagonistische Wirkung von S38 ist im Vergleich zu S4

bzw. S9 auf ca. 40% herabgesetzt. Dabei zeigt diese Substanz, wie auch die S9 keine agonistische Wirkung am TSHR. Des Weiteren zeigt diese Substanz keine inhibitorische Wirkung auf homologe Rezeptoren (Abbildung 6-22).

7.4.3. SUBSTANZ S37

Die Auswirkung der *endo-/exo*-Konformation der Substanzen auf deren antagonistische Wirkung wurde durch die stereoselektiven Synthesen der *endo-/exo*-Isomere von S36 und S37 auf deren funktionelle Unterschiede hin charakterisiert. S36 und S37 sind *endo-/exo*-Isomere zueinander. Diese Isomerieform spiegelt sich in der 3D-Konformation der Substanzen wider (Abbildung 6-20). Die Analyse der Substanzen ergab, dass nur die *endo*-Konformation, S37, eine inhibitorische Wirkung auf TSHR hat. Die Substanz S36 ist am TSHR nicht aktiv. S37 ist dagegen ein zu S4 bzw. S9 vergleichbarer Antagonist, hat aber auch wie S4 agonistische Wirkung auf TSHR und ist demnach ein Partialagonist.

7.4.4. AUSBLICK AUF FORTFÜHRENDE STUDIEN

Sowohl S36 als auch S37 haben sieben chirale Zentren und liegen als Racemate vor. In der Biologie wird oft nur eines der Enantiomere bevorzugt. Die pharmakologischen Wirkungen von Enantiomeren können in Organismen unterschiedlich sein, denn häufig besteht eine Stereoselektivität der spiegelbildlichen (*S*)- und (*R*)-Enantiomere. Stereospezifische Wirkungen von Enantiomeren wurden für zahlreiche Betablocker beschrieben¹⁶¹. So sind die (*S*)-Enantiomere der β -Blocker 10- bis 500-mal aktiver als die (*R*)-Enantiomere. Timotol, Penbutol und Leobunolol werden als enantiomerenreine (*S*)-konfigurierte Arzneimittel vermarktet, wobei die meisten anderen β -Blocker als Racemate eingesetzt werden¹⁶⁵. Das (*R*)-Enantiomer des β -Blockers, Nebivolol, ist zum größten Teil für die hohe Selektivität verantwortlich, hingegen wird die Gefäßerweiterung eher auf das (*S*)-Enantiomer zurückgeführt¹⁶⁶.

Ausgehend von der Literatur kann man spekulieren, dass nur ein Enantiomer biologisch aktiv ist (0/100). Wobei es nicht auszuschließen ist, dass beide gleich aktiv (50/50) oder unterschiedlich aktiv (30/70) sind. Darüberhinaus könnten die Enantiomere sogar gegensätzliche Wirkung am Rezeptor auslösen, d.h. die eine Form aktiviert, die andere inhibiert den Rezeptor. Die hohe Wirkstärke setzt voraus, dass die Substanz gut an bzw. in die Rezeptorbindungsstelle passt, demnach macht sich jede Veränderung in der Geometrie der hochaktiven Substanzen stark bemerkbar¹⁶².

Das Enantiomerenpaar kann durch die chromatographische Trennung an chiralen Säulen separiert werden. Die Trennung und anschließende Analyse würde Erkenntnisse über die Aktivität dem einzelnen Enantiomere liefern und eventuell eine Verbesserung der antagonistischen Wirkung am Rezeptor zur Folge haben. Eine sich anschließende kristallogra-

phische Untersuchung würde die absolute Konfiguration des aktiveren Enantiomers feststellen.

S37 hat zwar das Potential einer Leitstruktur als selektiver TSHR-Antagonist, ist jedoch noch nicht *drug-like*. Die aliphatischen Bicyklen von S37 bieten mehrere Angriffspunkte für Cytochrome und sind somit höchstwahrscheinlich metabolisch nicht stabil. Die eingebauten Schwefelatome sind ebenfalls oxidationsempfindlich und könnten leicht zu Sulfoxiden oder Sulfonen oxidiert werden^{16,162}. Zudem ist durch das hohe Molekulargewicht eine verminderte Bioverfügbarkeit zu erwarten. Trotz der Anwesenheit zahlreicher Heteroatome liegt die *Polar Surface Area* (PSA) für S37 innerhalb des in der Literatur empfohlenen Bereichs, nämlich bei 66,48 Ångström^{164,167}.

Die geplanten Synthesen von Derivaten haben zum Ziel, die Schwefelatome durch Sauerstoff- oder Kohlenstoffatome zu ersetzen. Zusätzlich wird geprüft, ob das Molekulargewicht der Substanz durch nachfolgende Ringspaltung herabgesetzt werden kann.

7.4.5. PHARMAKOLOGISCHES POTENTIAL DER IDENTIFIZIERTEN SUBSTANZEN

In der Pharmakologie unterscheidet man zwischen Agonisten, Antagonisten, Partialagonisten und inversen Agonisten. In dieser Arbeit wurde eine Vielzahl der Substanzen funktionell charakterisiert, wobei keine die Eigenschaften eines inversen Agonisten zeigte. Es wurden ein selektiver Partialagonist S37, ein nicht selektiver Antagonist S9 und ein nicht selektiver Partialagonist S4 identifiziert und charakterisiert.

Die identifizierte Substanz S9, die nicht selektiv am TSHR wirkt, könnte als pharmakologisches Werkzeug eingesetzt werden, um die Funktion und das therapeutische Potential der homologen Rezeptoren zu erforschen.

Des Weiteren sollten die kleinen Moleküle auf ihre mögliche Funktion als pharmakologische *Chaperone* untersucht werden. Oft führen Mutationen zu einer Fehlfaltung des Rezeptors und damit zu dessen Funktionsverlust. Für TSHR sind eine Vielfalt von pathologischen Mutationen bekannt, die gravierende Probleme für betroffene Patienten zu Folge haben^{77,168}. Die Fehlfaltung des Rezeptors spiegelt sich oft in einer geringeren Oberflächenexpression wider. Die Möglichkeit mithilfe von kleinen Molekülen die Anzahl der Rezeptoren an der Oberfläche zu erhöhen, könnte die damit verbundene reduzierte Funktion des Rezeptors beheben. Es wurde für den LHCGR bereits ein kleines Molekül beschrieben (Org42599), welches in der Lage ist, die geringe Oberflächenexpression der LHCGR-Mutanten (S616Y und A593P) aufzuheben¹¹².

Im Gegensatz zu einem vollen Agonisten führt ein Partialagonist zu einem unvollständigen Effekt am Rezeptor bzw. der nachgeschalteten Signaltransduktion. Der Partialagonist

ist in der Lage, den Agonisten von seinem Rezeptor zu verdrängen und kann dadurch teilweise die Wirkung des Agonisten hemmen.

Der Partialagonist ist dann von besonderem therapeutischen Interesse, wenn die Wirkung des endogenen Agonisten imitiert, die maximale Aktivität jedoch, z. B. aus Sicherheitsgründen, vermieden werden soll. Ein Beispiel hierfür ist Buprenorphin. Es handelt sich dabei um ein halbsynthetisches Opioid, welches zur Behandlung von akuten und chronischen Schmerzen seit 1979 eingesetzt wird. Buprenorphin wirkt an den Opioidrezeptoren als ein Partialagonist und weist im Vergleich zu vollen Agonisten ein besseres Sicherheitsprofil auf ¹⁶⁹.

So kann auch der Partialagonist S37 seine Vorteile in einer agonistischen Wirkung haben und besitzt demnach das Potential einer Leitstruktur.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Lefkowitz RJ. Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25(8):413–22. doi:10.1016/j.tips.2004.06.006.
2. Lefkowitz RJ. G Protein-coupled Receptors. III. NEW ROLES FOR RECEPTOR KINASES AND β -ARRESTINS IN RECEPTOR SIGNALING AND DESENSITIZATION. *J Biol Chem.* 1998;273(30):18677–18680. doi:10.1074/jbc.273.30.18677.
3. Schwartz TW, Frimurer TM, Holst B, Rosenkilde MM, Elling CE. Molecular mechanism of 7TM receptor activation--a global toggle switch model. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2006;46(3):481–519. doi:10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141218.
4. Baldwin JM. The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J.* 1993;12(4):1693–703. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=413383&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed February 20, 2014.
5. Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, et al. Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science.* 2000;130(6):865. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11124332>. Accessed April 24, 2014.
6. Bockaert J, Pin JP. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 1999;18(7):1723–1729. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1093/emboj/18.7.1723/full>. Accessed February 20, 2014.
7. Kobilka BK. G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1768(4):794–807. doi:10.1016/j.bbamem.2006.10.021.
8. Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin L-G, Schiöth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol.* 2003;63(6):1256–72. doi:10.1124/mol.63.6.1256.

9. Vroiling B, Sanders M, Baakman C, et al. GPCRDB: information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(Database issue):D309–19. doi:10.1093/nar/gkq1009.
10. Lagerström MC, Schiöth HB. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(4):339–57. doi:10.1038/nrd2518.
11. Davies MN, Secker A, Halling-Brown M, et al. GPCRTree: online hierarchical classification of GPCR function. *BMC Res Notes.* 2008;1:67. doi:10.1186/1756-0500-1-67.
12. Ji TH, Grossmann M, Ji I. G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem.* 1998;273(28):17299–302. doi:10.1074/jbc.273.28.17299.
13. Pin J-P, Galvez T, Prézeau L. Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther.* 2003;98(3):325–354. doi:10.1016/S0163-7258(03)00038-X.
14. Makita N, Iiri T. Biased agonism: a novel paradigm in G protein-coupled receptor signaling observed in acquired hypocalcemic hypercalcemia. *Endocr J.* 2013;1–7. doi:10.1507/endocrj.
15. Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science.* 1991;252(5007):802–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1902986>. Accessed June 25, 2014.
16. Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 10. Auflage ed. München: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag; 2009:1224.
17. Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science.* 2005;308(5721):512–7. doi:10.1126/science.1109237.
18. Rajagopal S, Rajagopal K, Lefkowitz RJ. Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(5):373–86. doi:10.1038/nrd3024.

19. Wise A, Gearing K, Rees S. Target validation of G-protein coupled receptors. *Drug Discov Today*. 2002;7(4):235–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11839521>. Accessed July 15, 2014.
20. Kobilka B. The structural basis of G-protein-coupled receptor signaling (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*. 2013;52(25):6380–8. doi:10.1002/anie.201302116.
21. Ma P, Zimmel R. Value of novelty? *Nat Rev Drug Discov*. 2002;1(8):571–2. doi:10.1038/nrd884.
22. Howard a D, McAllister G, Feighner SD, et al. Orphan G-protein-coupled receptors and natural ligand discovery. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22(3):132–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11239576>. Accessed February 14, 2014.
23. Efferth T. *Molekulare Pharmakologie und Toxikologie*. Springer Verlag; 2006.
24. Knoflach F, Mutel V, Jolidon S, et al. Positive allosteric modulators of metabotropic glutamate 1 receptor: characterization, mechanism of action, and binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(23):13402–7. doi:10.1073/pnas.231358298.
25. Carroll FY, Stolle A, Beart PM, et al. BAY36-7620: a potent non-competitive mGlu1 receptor antagonist with inverse agonist activity. *Mol Pharmacol*. 2001;59(5):965–73. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2573968&tool=pmcentre&rendertype=abstract>. Accessed October 15, 2014.
26. Neumann S, Kleinau G, Costanzi S, et al. A low-molecular-weight antagonist for the human thyrotropin receptor with therapeutic potential for hyperthyroidism. *Endocrinology*. 2008;149(12):5945–50. doi:10.1210/en.2008-0836.
27. Urwyler S, Mosbacher J, Lingenhoehl K, et al. Positive allosteric modulation of native and recombinant gamma-aminobutyric acid(B) receptors by 2,6-Di-tert-butyl-4-(3-hydroxy-2,2-dimethyl-propyl)-phenol (CGP7930) and its aldehyde analog CGP13501. *Mol Pharmacol*. 2001;60(5):963–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11641424>. Accessed October 15, 2014.
28. Strotmann R, Schröck K, Bösel I, Stäubert C, Russ A, Schöneberg T. Evolution of GPCR: change and continuity. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;331(2):170–8. doi:10.1016/j.mce.2010.07.012.

29. Hayashi H, Hayashi T, Hanaoka Y. Amphibian lutropin and follitropin from the bullfrog *Rana catesbeiana*. Complete amino acid sequence of the alpha subunit. *Eur J Biochem.* 1992;203(1-2):185–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1730225>. Accessed April 17, 2014.
30. Foster DN, Galehouse D, Giordano T, et al. Nucleotide sequence of the cDNA encoding the common alpha subunit of the chicken pituitary glycoprotein hormones. *J Mol Endocrinol.* 1992;8(1):21–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1543531>. Accessed April 17, 2014.
31. Stockell Hartree a, Renwick a G. Molecular structures of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components. *Biochem J.* 1992;287 (Pt 3:665–79. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1133060&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
32. Vassart G, Pardo L, Costagliola S. A molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors. *Trends Biochem Sci.* 2004;29(3):119–26. doi:10.1016/j.tibs.2004.01.006.
33. Costagliola S, Urizar E, Mendive F, Vassart G. Specificity and promiscuity of gonadotropin receptors. *Reproduction.* 2005;130(3):275–81. doi:10.1530/rep.1.00662.
34. Müller T, Gromoll J, Simula AP, Norman R, Sandhowe-Klaverkamp R, Simoni M. The carboxyterminal peptide of chorionic gonadotropin facilitates activation of the marmoset LH receptor. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2004;112(10):574–9. doi:10.1055/s-2004-830409.
35. Marchelidon J, Fontaine-Bertrand E, Salesse R, Garnier J, Burzawa-Gérard E, Fontaine YA. [Speed of in vitro reassociation of gonadotropin subunits in a teleost fish, the carp (*Cyprinus carpio* L.)]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.* 1978;287(4):301–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/102442>. Accessed April 17, 2014.
36. Magner JA, Weintraub BD. Thyroid-stimulating hormone subunit processing and combination in microsomal subfractions of mouse pituitary tumor. *J Biol Chem.* 1982;257(12):6709–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7085597>. Accessed April 17, 2014.

37. Magner JA. Thyroid-stimulating hormone: biosynthesis, cell biology, and bioactivity. *Endocr Rev.* 1990;11(2):354–85. doi:10.1210/edrv-11-2-354.
38. Hirschberg CB, Snider MD. Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu Rev Biochem.* 1987;56:63–87. doi:10.1146/annurev.bi.56.070187.000431.
39. Szkudlinski MW, Fremont V, Ronin C, Weintraub BD. Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiol Rev.* 2002;82(2):473–502. doi:10.1152/physrev.00031.2001.
40. Ascoli M, Fanelli F, Segaloff DL. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr Rev.* 2002;23(2):141–74. doi:10.1210/edrv.23.2.0462.
41. Kristiansen K. Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther.* 2004;103(1):21–80. doi:10.1016/j.pharmthera.2004.05.002.
42. Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev.* 1997;18(6):739–73. doi:10.1210/edrv.18.6.0320.
43. Lüllmann H, Mohr K, Ziegler A. *Taschenatlas der Pharmakologie.* Thieme Verlag; 1994:383.
44. Kopp P. The TSH receptor and its role in thyroid disease. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(9):1301–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11577986>. Accessed April 18, 2014.
45. Lezoualc'h F, Hassan AH, Giraud P, Loeffler JP, Lee SL, Demeneix BA. Assignment of the beta-thyroid hormone receptor to 3,5,3'-triiodothyronine-dependent inhibition of transcription from the thyrotropin-releasing hormone promoter in chick hypothalamic neurons. *Mol Endocrinol.* 1992;6(11):1797–804. doi:10.1210/mend.6.11.1480171.
46. Rousseau-Merck MF, Misrahi M, Loosfelt H, Atger M, Milgrom E, Berger R. Assignment of the human thyroid stimulating hormone receptor (TSHR) gene to chromosome 14q31. *Genomics.* 1990;8(2):233–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2249847>. Accessed January 14, 2014.

47. Libert F, Passage E, Lefort A, Vassart G, Mattei MG. Localization of human thyrotropin receptor gene to chromosome region 14q3 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.* 1990;54(1-2):82–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2249482>. Accessed April 22, 2014.
48. Grob F, Deladoëy J, Legault L, et al. Autonomous Adenomas Caused by Somatic Mutations of the Thyroid-Stimulating Hormone Receptor in Children. *Horm Res Paediatr.* 2014;73–79. doi:10.1159/000357143.
49. Gross B, Misrahi M, Sar S, Milgrom E. Composite structure of the human thyrotropin receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;177(2):679–87. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2049090>. Accessed March 13, 2014.
50. Tanaka K, Chazenbalk GD, McLachlan SM, Rapoport B. Subunit structure of thyrotropin receptors expressed on the cell surface. *J Biol Chem.* 1999;274(48):33979–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10567361>. Accessed October 15, 2014.
51. Latif R, Graves P, Davies TF. Oligomerization of the human thyrotropin receptor: fluorescent protein-tagged hTSHR reveals post-translational complexes. *J Biol Chem.* 2001;276(48):45217–24. doi:10.1074/jbc.M103727200.
52. Kleinau G, Brehm M, Wiedemann U, Labudde D, Leser U, Krause G. Implications for molecular mechanisms of glycoprotein hormone receptors using a new sequence-structure-function analysis resource. *Mol Endocrinol.* 2007;21(2):574–80. doi:10.1210/me.2006-0309.
53. Kleinau G, Krause G. Thyrotropin and homologous glycoprotein hormone receptors: structural and functional aspects of extracellular signaling mechanisms. *Endocr Rev.* 2009;30(2):133–51. doi:10.1210/er.2008-0044.
54. Rapoport B, Chazenbalk GD, Jaume JC, McLachlan SM. The thyrotropin (TSH) receptor: interaction with TSH and autoantibodies. *Endocr Rev.* 1998;19(6):673–716. doi:10.1210/edrv.19.6.0352.
55. Smits G, Campillo M, Govaerts C, et al. Glycoprotein hormone receptors: determinants in leucine-rich repeats responsible for ligand specificity. *EMBO J.* 2003;22(11):2692–703. doi:10.1093/emboj/cdg260.

56. Sanders J, Bolton J, Sanders P, et al. Effects of TSH receptor mutations on binding and biological activity of monoclonal antibodies and TSH. *Thyroid*. 2006;16(12):1195–206. doi:10.1089/thy.2006.16.1195.
57. Vlaeminck-Guillem V, Ho S-C, Rodien P, Vassart G, Costagliola S. Activation of the cAMP pathway by the TSH receptor involves switching of the ectodomain from a tethered inverse agonist to an agonist. *Mol Endocrinol*. 2002;16(4):736–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11923470>.
58. Misrahi M, Milgrom E. Cleavage and shedding of the TSH receptor. *Eur J Endocrinol*. 1997;137(6):599–602. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9437220>.
59. Chen C-R, McLachlan SM, Rapoport B. Evidence that the thyroid-stimulating hormone (TSH) receptor transmembrane domain influences kinetics of TSH binding to the receptor ectodomain. *J Biol Chem*. 2011;286(8):6219–24. doi:10.1074/jbc.M110.211003.
60. Russo D, Chazenbalk GD, Nagayama Y, Wadsworth HL, Rapoport B. Site-directed mutagenesis of the human thyrotropin receptor: role of asparagine-linked oligosaccharides in the expression of a functional receptor. *Mol Endocrinol*. 1991;5(1):29–33. doi:10.1210/mend-5-1-29.
61. Nagayama Y, Namba H, Yokoyama N, Yamashita S, Niwa M. Role of asparagine-linked oligosaccharides in protein folding, membrane targeting, and thyrotropin and autoantibody binding of the human thyrotropin receptor. *J Biol Chem*. 1998;273(50):33423–8. doi:10.1074/jbc.273.50.33423.
62. Costagliola S, Panneels V, Bonomi M, et al. Tyrosine sulfation is required for agonist recognition by glycoprotein hormone receptors. *EMBO J*. 2002;21(4):504–13. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=125869&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed April 23, 2014.
63. Sanders J, Chirgadze DY, Sanders P, et al. Crystal structure of the TSH receptor in complex with a thyroid-stimulating autoantibody. *Thyroid*. 2007;17(5):395–410. doi:10.1089/thy.2007.0034.

64. Sanders P, Young S, Sanders J, et al. Crystal structure of the TSH receptor (TSHR) bound to a blocking-type TSHR autoantibody. *J Mol Endocrinol.* 2011;46(2):81–99. doi:10.1530/JME-10-0127.
65. Krause G, Kreuchwig A, Kleinau G. Extended and structurally supported insights into extracellular hormone binding, signal transduction and organization of the thyrotropin receptor. *PLoS One.* 2012;7(12):e52920. doi:10.1371/journal.pone.0052920.
66. Jiang X, Liu H, Chen X, et al. Structure of follicle-stimulating hormone in complex with the entire ectodomain of its receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(31):12491–6. doi:10.1073/pnas.1206643109.
67. Jäschke H, Neumann S, Moore S, et al. A low molecular weight agonist signals by binding to the transmembrane domain of thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR) and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor (LHCGR). *J Biol Chem.* 2006;281(15):9841–4. doi:10.1074/jbc.C600014200.
68. Kleinau G, Haas A-K, Neumann S, et al. Signaling-sensitive amino acids surround the allosteric ligand binding site of the thyrotropin receptor. *FASEB J.* 2010;24(7):2347–54. doi:10.1096/fj.09-149146.
69. Kleinau G, Hoyer I, Kreuchwig A, et al. From molecular details of the interplay between transmembrane helices of the thyrotropin receptor to general aspects of signal transduction in family a G-protein-coupled receptors (GPCRs). *J Biol Chem.* 2011;286(29):25859–71. doi:10.1074/jbc.M110.196980.
70. Haas A-K, Kleinau G, Hoyer I, et al. Mutations that silence constitutive signaling activity in the allosteric ligand-binding site of the thyrotropin receptor. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(1):159–67. doi:10.1007/s00018-010-0451-2.
71. Tunaru S, Lättig J, Kero J, Krause G, Offermanns S. Characterization of determinants of ligand binding to the nicotinic acid receptor GPR109A (HM74A/PUMA-G). *Mol Pharmacol.* 2005;68(5):1271–80. doi:10.1124/mol.105.015750.
72. Park JH, Scheerer P, Hofmann KP, Choe H-W, Ernst OP. Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature.* 2008;454(7201):183–7. doi:10.1038/nature07063.

73. Ahuja S, Smith SO. Multiple switches in G protein-coupled receptor activation. *Trends Pharmacol Sci.* 2009;30(9):494–502. doi:10.1016/j.tips.2009.06.003.
74. Rovati GE, Capra V, Neubig RR. The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Mol Pharmacol.* 2007;71(4):959–64. doi:10.1124/mol.106.029470.
75. Neumann S, Huang W, Titus S, et al. Small-molecule agonists for the thyrotropin receptor stimulate thyroid function in human thyrocytes and mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(30):12471–6. doi:10.1073/pnas.0904506106.
76. Kleinau G, Claus M, Jaeschke H, et al. Contacts between extracellular loop two and transmembrane helix six determine basal activity of the thyroid-stimulating hormone receptor. *J Biol Chem.* 2007;282(1):518–25. doi:10.1074/jbc.M606176200.
77. Kreuchwig A, Kleinau G, Kreuchwig F, Worth CL, Krause G. Research resource: Update and extension of a glycoprotein hormone receptors web application. *Mol Endocrinol.* 2011;25(4):707–12. doi:10.1210/me.2010-0510.
78. Hoyer I, Haas A-K, Kreuchwig A, Schülein R, Krause G. Molecular sampling of the allosteric binding pocket of the TSH receptor provides discriminative pharmacophores for antagonist and agonists. *Biochem Soc Trans.* 2013;41(1):213–7. doi:10.1042/BST20120319.
79. Tanaka K, Nagayama Y, Nishihara E, Namba H, Yamashita S, Niwa M. Palmitoylation of human thyrotropin receptor: slower intracellular trafficking of the palmitoylation-defective mutant. *Endocrinology.* 1998;139(2):803–6. doi:10.1210/endo.139.2.5911.
80. Nagayama Y, Rapoport B. The thyrotropin receptor 25 years after its discovery: new insight after its molecular cloning. *Mol Endocrinol.* 1992;6(2):145–56. doi:10.1210/mend.6.2.1569961.
81. Schulte G, Schambony A, Bryja V. beta-Arrestins - scaffolds and signalling elements essential for WNT/Frizzled signalling pathways? *Br J Pharmacol.* 2010;159(5):1051–8. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00466.x.
82. Kohout T, Lefkowitz R. Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol Pharmacol.* 2003;63(1):9–18.

- Available at: <http://molpharm.aspetjournals.org/content/63/1/9.short>. Accessed March 5, 2013.
83. Frenzel R, Voigt C, Paschke R. The human thyrotropin receptor is predominantly internalized by beta-arrestin 2. *Endocrinology*. 2006;147(6):3114–22. doi:10.1210/en.2005-0687.
 84. Calebiro D, Nikolaev VO, Lohse MJ. Imaging of persistent cAMP signaling by internalized G protein-coupled receptors. *J Mol Endocrinol*. 2010;45(1):1–8. doi:10.1677/JME-10-0014.
 85. Kleinau G, Jaeschke H, Mueller S, Worth CL, Paschke R, Krause G. Molecular and structural effects of inverse agonistic mutations on signaling of the thyrotropin receptor—a basally active GPCR. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(22):3664–76. doi:10.1007/s00018-008-8450-2.
 86. Chazenbalk GD, Nagayama Y, Russo D, Wadsworth HL, Rapoport B. Functional analysis of the cytoplasmic domains of the human thyrotropin receptor by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*. 1990;265(34):20970–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2250002>. Accessed January 10, 2014.
 87. Laugwitz KL, Allgeier A, Offermanns S, et al. The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(1):116–20. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=40189&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed April 22, 2014.
 88. Vassart G, Dumont JE. The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocr Rev*. 1992;13(3):596–611. doi:10.1210/edrv-13-3-596.
 89. Corvilain B, Van Sande J, Dumont JE, Vassart G. Somatic and germline mutations of the TSH receptor and thyroid diseases. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001;55(2):143–58. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11531919>.
 90. Song Y, Massart C, Chico-Galdo V, et al. Species specific thyroid signal transduction: conserved physiology, divergent mechanisms. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;319(1-2):56–62. doi:10.1016/j.mce.2010.01.024.
 91. Büch TRH, Biebermann H, Kalwa H, et al. G13-dependent activation of MAPK by thyrotropin. *J Biol Chem*. 2008;283(29):20330–41. doi:10.1074/jbc.M800211200.

92. Neumann S, Krause G, Claus M, Paschke R. Structural determinants for g protein activation and selectivity in the second intracellular loop of the thyrotropin receptor. *Endocrinology*. 2005;146(1):477–85. doi:10.1210/en.2004-1045.
93. Davies TF, Ando T, Lin R-Y, Tomer Y, Latif R. Thyrotropin receptor-associated diseases: from adenomata to Graves disease. *J Clin Invest*. 2005;115(8):1972–83. doi:10.1172/JCI26031.
94. Flynn RW V, MacDonald TM, Morris a D, Jung RT, Leese GP. The thyroid epidemiology, audit, and research study: thyroid dysfunction in the general population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(8):3879–84. doi:10.1210/jc.2003-032089.
95. Krause AM. *Die chirurgische Therapie der endokrinen Orbitopathie – ein 9-Jahres-Bericht.*; 2009:18–22.
96. Feliciello A, Porcellini A, Ciullo I, Bonavolontà G, Avvedimento E V, Fenzi G. Expression of thyrotropin-receptor mRNA in healthy and Graves' disease retro-orbital tissue. *Lancet*. 1993;342(8867):337–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8101586>. Accessed April 22, 2014.
97. Endo T, Ohno M, Kotani S, Gunji K, Onaya T. Thyrotropin receptor in non-thyroid tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;190(3):774–9. doi:10.1006/bbrc.1993.1116.
98. Sorisky A, Pardasani D, Gagnon A, Smith TJ. Evidence of adipocyte differentiation in human orbital fibroblasts in primary culture. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81(9):3428–31. doi:10.1210/jcem.81.9.8784110.
99. Wiersinga WM. Autoimmunity in Graves' ophthalmopathy: the result of an unfortunate marriage between TSH receptors and IGF-1 receptors? *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(8):2386–94. doi:10.1210/jc.2011-0307.
100. Prabhakar BS, Bahn RS, Smith TJ. Current perspective on the pathogenesis of Graves' disease and ophthalmopathy. *Endocr Rev*. 2003;24(6):802–35. doi:10.1210/er.2002-0020.
101. Perlman S, Schambye HT, Rivero RA, Greenlee WJ, Hjorth SA, Schwartz TW. Non-peptide angiotensin agonist. Functional and molecular interaction with the AT1

- receptor. *J Biol Chem.* 1995;270(4):1493–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7829475>. Accessed April 25, 2014.
102. Schwartz TW, Rosenkilde MM. Is there a “lock” for all agonist “keys” in 7TM receptors? *Trends Pharmacol Sci.* 1996;17(6):213–216. doi:10.1016/0165-6147(96)10017-1.
103. Li J, Edwards PC, Burghammer M, Villa C, Schertler GFX. Structure of bovine rhodopsin in a trigonal crystal form. *J Mol Biol.* 2004;343(5):1409–38. doi:10.1016/j.jmb.2004.08.090.
104. Okada T, Sugihara M, Bondar A-N, Elstner M, Entel P, Buss V. The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 Å crystal structure. *J Mol Biol.* 2004;342(2):571–83. doi:10.1016/j.jmb.2004.07.044.
105. Silvente-Poirot S, Escrieut C, Wank S a. Role of the extracellular domains of the cholecystokinin receptor in agonist binding. *Mol Pharmacol.* 1998;54(2):364–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9687578>. Accessed April 25, 2014.
106. Shi L, Javitch J a. The second extracellular loop of the dopamine D2 receptor lines the binding-site crevice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(2):440–5. doi:10.1073/pnas.2237265100.
107. Gershengorn MC, Osman R. Minireview: Insights into G protein-coupled receptor function using molecular models. *Endocrinology.* 2001;142(1):2–10. doi:10.1210/endo.142.1.7919.
108. Stenkamp RE, Teller DC, Palczewski K. Rhodopsin: a structural primer for G-protein coupled receptors. *Arch Pharm (Weinheim).* 2005;338(5-6):209–16. doi:10.1002/ardp.200400995.
109. Gloriam DE, Foord SM, Blaney FE, Garland SL. Definition of the G protein-coupled receptor transmembrane bundle binding pocket and calculation of receptor similarities for drug design. *J Med Chem.* 2009;52(14):4429–42. doi:10.1021/jm900319e.
110. Van Straten NCR, van Berkel THJ, Demont DR, et al. Identification of substituted 6-amino-4-phenyltetrahydroquinoline derivatives: potent antagonists for the follicle-

- stimulating hormone receptor. *J Med Chem.* 2005;48(6):1697–700. doi:10.1021/jm049676l.
111. Van Straten NCR, Schoonus-Gerritsma GG, van Someren RG, et al. The first orally active low molecular weight agonists for the LH receptor: thienopyr(im)idines with therapeutic potential for ovulation induction. *Chembiochem.* 2002;3(10):1023–6. doi:10.1002/1439-7633(20021004)3:10<1023::AID-CBIC1023>3.0.CO;2-9.
112. Newton CL, Whay AM, McArdle CA, et al. Rescue of expression and signaling of human luteinizing hormone G protein-coupled receptor mutants with an allosterically binding small-molecule agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(17):7172–6. doi:10.1073/pnas.1015723108.
113. Titus S, Neumann S, Zheng W, et al. Quantitative high-throughput screening using a live-cell cAMP assay identifies small-molecule agonists of the TSH receptor. *J Biomol Screen.* 2008;13(2):120–7. doi:10.1177/1087057107313786.
114. Gershengorn MC, Neumann S. Update in TSH receptor agonists and antagonists. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(12):4287–92. doi:10.1210/jc.2012-3080.
115. Neumann S, Huang W, Eliseeva E, Titus S, Thomas CJ, Gershengorn MC. A small molecule inverse agonist for the human thyroid-stimulating hormone receptor. *Endocrinology.* 2010;151(7):3454–9. doi:10.1210/en.2010-0199.
116. Van Koppen CJ, de Gooyer ME, Karstens W-J, et al. Mechanism of action of a nanomolar potent, allosteric antagonist of the thyroid-stimulating hormone receptor. *Br J Pharmacol.* 2012;165(7):2314–24. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01709.x.
117. Moore S, Jaeschke H, Kleinau G, et al. Evaluation of small-molecule modulators of the luteinizing hormone/choriogonadotropin and thyroid stimulating hormone receptors: structure-activity relationships and selective binding patterns. *J Med Chem.* 2006;49(13):3888–96. doi:10.1021/jm060247s.
118. Rapoport B, McLachlan SM. The thyrotropin receptor in Graves' disease. *Thyroid.* 2007;17(10):911–22. doi:10.1089/thy.2007.0170.
119. McLachlan SM, Nagayama Y, Rapoport B. Insight into Graves' hyperthyroidism from animal models. *Endocr Rev.* 2005;26(6):800–32. doi:10.1210/er.2004-0023.

120. Allen MD, Neumann S, Gershengorn MC. Small-molecule thyrotropin receptor agonist activates naturally occurring thyrotropin-insensitive mutants and reveals their distinct cyclic adenosine monophosphate signal persistence. *Thyroid*. 2011;21(8):907–12. doi:10.1089/thy.2011.0025.
121. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Second Edi. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
122. Mülhardt C. *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag; Auflage: 5. Aufl. (13. April 2006); 2006:298.
123. Wyllie DJ a, Chen PE. Taking the time to study competitive antagonism. *Br J Pharmacol*. 2007;150(5):541–51. doi:10.1038/sj.bjp.0706997.
124. INVITROGEN. alamarBlue® Assay. 2008. (5).
125. Golla R, Seethala R. A homogeneous enzyme fragment complementation cyclic AMP screen for GPCR agonists. *J Biomol Screen*. 2002;7(6):515–25. doi:10.1177/1087057102238625.
126. Olson KR, Eglen RM. Beta galactosidase complementation: a cell-based luminescent assay platform for drug discovery. *Assay Drug Dev Technol*. 2007;5(1):137–44. doi:10.1089/adl.2006.052.
127. Eglen RM. High Throughput Screening Assay Technology. 2002;1(1):97–104.
128. Zhang J-H. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen*. 1999;4(2):67–73. doi:10.1177/108705719900400206.
129. Zhang J-H, Chung T, Oldenburg K. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen*. 1999;4(2):67–73. doi:10.1177/108705719900400206.
130. Mueller S, Jaeschke H, Paschke R. *Current standards, variations, and pitfalls for the determination of constitutive TSHR activity in vitro*. Elsevier Inc.; 2010:421–36. doi:10.1016/B978-0-12-381296-4.00023-3.

131. Urizar E, Claeysen S, Deupí X, et al. An activation switch in the rhodopsin family of G protein-coupled receptors: the thyrotropin receptor. *J Biol Chem.* 2005;280(17):17135–41. doi:10.1074/jbc.M414678200.
132. Case DA. Molecular dynamics and NMR spin relaxation in proteins. *Acc Chem Res.* 2002;35(6):325–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12069616>. Accessed April 29, 2014.
133. Laskowski RA, Moss DS, Thornton JM. Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J Mol Biol.* 1993;231(4):1049–67. doi:10.1006/jmbi.1993.1351.
134. Ballesteros JA, Weinstein H. *Receptor Molecular Biology*. Elsevier; 1995:366–428. doi:10.1016/S1043-9471(05)80049-7.
135. Ballesteros JA, Weinstein H. Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods Neurosci.* 1995.
136. Worth CL, Kreuchwig A, Kleinau G, Krause G. GPCR-SSFE: a comprehensive database of G-protein-coupled receptor template predictions and homology models. *BMC Bioinformatics.* 2011;12(1):185. doi:10.1186/1471-2105-12-185.
137. Kreutzig T. *Biochemie*. jungjohann Verlag mbH; 1994:421.
138. Cetani F, Tonacchera M, Vassart G. Differential effects of NaCl concentration on the constitutive activity of the thyrotropin and the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors. *FEBS Lett.* 1996;378(1):27–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8549796>. Accessed April 15, 2014.
139. Warr W a. Scientific workflow systems: Pipeline Pilot and KNIME. *J Comput Aided Mol Des.* 2012;26(7):801–4. doi:10.1007/s10822-012-9577-7.
140. <http://www.biaffin.com/de/service/biaffin-biacore-spr-service/wirkstoffentwicklung/leitsubstanzoptimierung/>.
141. http://www.chemgapedia.de/vsengine/glossary/de/struktur_00045aktivit_00228tsbeziehung.glos.html.
142. Segaran T. *Kollektive Intelligenz analysieren, programmieren und nutzen*. Auflage: 1. O'Reilly Verlag; 2008:400.

143. Sobottka S. Synthese neuartiger Thyrotropin-Rezeptor (TSHR) Antagonisten. 2012.
144. SCHILD HO. pA, a new scale for the measurement of drug antagonism. *Br J Pharmacol Chemother.* 1947;2(3):189–206. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1509780&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed January 30, 2014.
145. Helenius A. How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell.* 1994;5(3):253–65. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=301034&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed April 15, 2014.
146. Sykiotis GP, Neumann S, Georgopoulos N a, et al. Functional significance of the thyrotropin receptor germline polymorphism D727E. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;301(4):1051–1056. doi:10.1016/S0006-291X(03)00071-8.
147. Fricke-Otto S, Pfarr N, Mühlenberg R, Pohlenz J. Mild congenital primary hypothyroidism in a Turkish family caused by a homozygous missense thyrotropin receptor (TSHR) gene mutation (A593 V). *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2005;113(10):582–5. doi:10.1055/s-2005-865914.
148. Karges B, Krause G, Homoki J, Debatin K-M, de Roux N, Karges W. TSH receptor mutation V509A causes familial hyperthyroidism by release of interhelical constraints between transmembrane helices TMH3 and TMH5. *J Endocrinol.* 2005;186(2):377–85. doi:10.1677/joe.1.06208.
149. Rasmussen SGF, Choi H-J, Fung JJ, et al. Structure of a nanobody-stabilized active state of the $\beta(2)$ adrenoceptor. *Nature.* 2011;469(7329):175–80. doi:10.1038/nature09648.
150. Zhang K, Zhang J, Gao Z-G, et al. Structure of the human P2Y12 receptor in complex with an antithrombotic drug. *Nature.* 2014. doi:10.1038/nature13083.
151. Balakin K V, Kozintsev A V, Kiselyov AS, Savchuk NP. Rational design approaches to chemical libraries for hit identification. *Curr Drug Discov Technol.* 2006;3(1):49–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16712463>. Accessed July 4, 2014.
152. Kenakin T. Predicting therapeutic value in the lead optimization phase of drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(6):429–38. doi:10.1038/nrd1110.

153. Lisurek M, Rupp B, Wichard J, et al. Design of chemical libraries with potentially bioactive molecules applying a maximum common substructure concept. *Mol Divers*. 2010;14(2):401–8. doi:10.1007/s11030-009-9187-z.
154. Wagener M, Gasteiger J. The determination of maximum common substructures by a genetic algorithm: application in synthesis design and for the structural analysis of biological activity. *Angew Chem Int Ed Engl*. 1994.
155. Leifert WR, Aloia AL, Bucco O, Glatz R V, McMurchie EJ. G-protein-coupled receptors in drug discovery: nanosizing using cell-free technologies and molecular biology approaches. *J Biomol Screen*. 2005;10(8):765–79. doi:10.1177/1087057105280517.
156. Bechem M, Bembenek M, Brüggemeier U, et al. *High-Throughput Screening in Drug Discovery*. (Hüser J, ed.). Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2006. doi:10.1002/3527609326.
157. Rangel-Barajas C, Malik M, Taylor M, Neve K a, Mach RH, Luedtke RR. Characterization of [(3) H]LS-3-134, a Novel Arylamide Phenylpiperazine D3 Dopamine Receptor Selective Radioligand. *J Neurochem*. 2014. doi:10.1111/jnc.12825.
158. Gregory KJ, Sexton PM, Christopoulos A. Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. *Curr Neuropharmacol*. 2007;5(3):157–67. doi:10.2174/157015907781695946.
159. Kasper S. Trazodon bei Depression : Bewährt und voll im Trend. 2002:1–2.
160. Aubry ML, Cowell P, Davey MJ, Shevde S. Aspects of the pharmacology of a new anthelmintic: pyrantel. *Br J Pharmacol*. 1970;38(2):332–44. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1702778&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed August 4, 2014.
161. Mehvar R, Brocks DR. Stereospecific pharmacokinetics and pharmacodynamics of beta-adrenergic blockers in humans. *J Pharm Pharm Sci*. 2001;4(2):185–200. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11466176>. Accessed August 4, 2014.

162. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M. *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 8.Auflage ed. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2001:1186.
163. Lesyk R, Zimenkovsky B, Atamanyuk D, Jensen F, Kieć-Kononowicz K, Gzella A. Anticancer thiopyrano[2,3-d][1,3]thiazol-2-ones with norbornane moiety. Synthesis, cytotoxicity, physico-chemical properties, and computational studies. *Bioorg Med Chem*. 2006;14(15):5230–40. doi:10.1016/j.bmc.2006.03.053.
164. Kubinyi H, Müller G. *Chemogenomics in Drug Discovery A Medicinal Chemistry Perspective*. Wiley-WCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2004:463.
165. Martínez V, Maguregui MI, Jiménez RM, Alonso RM. Determination of the pKa values of beta-blockers by automated potentiometric titrations. *J Pharm Biomed Anal*. 2000;23(2-3):459–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10933539>. Accessed August 4, 2014.
166. Czajka S. Nebivolol: ein neuer Betablocker. *Pharm Zeitung Online*. 1997. Available at: GOVI-Verlag.
167. Mannhold R. *Molecular Drug Properties: Measurement and Prediction*. Wiley, 2008; 2008:471.
168. Kreuchwig A, Kleinau G, Krause G. Research resource: novel structural insights bridge gaps in glycoprotein hormone receptor analyses. *Mol Endocrinol*. 2013;27(8):1357–63. doi:10.1210/me.2013-1115.
169. Dahan a, Yassen A, Romberg R, et al. Buprenorphine induces ceiling in respiratory depression but not in analgesia. *Br J Anaesth*. 2006;96(5):627–32. doi:10.1093/bja/ael051.

9. ANHANG

9.1. DIE AMINOSÄURENSEQUENZ DES HUMANEN TSHR

5'atgaggccggcggacttgctgcagctgggtgctgctgctgcacctgccagggacctgggagggaatgggggtgttcgtctccacctgagtgccatcaggaggaggacttcagagtcacctgcaaggatattcaacgcatcccagcttaccgcccagtagcagactctgaagcttattgagactcacctgagaactattccaagtcagcatcttctaattctgccaatatttccagaatctacgtatctatagatgtgactctgcagcagctggatcacactccttctacaatttgagtaaagtgactcacatagaaattcggaataaccaggaacttaacttacatagaccctgatgccctcaaagagctccccctcctaaagttccttggcattttcaacactggacttaaaatgttccctgacctgaccaaagtttattccactgatataattctttatacttgaaattacagacaacccttacatgacgtcaatccctgtgaatgcttttcaggactatgcaatgaaaccttgacactgaagctgtacaacaatggctttacttcagttccaaggatatgctttcaatgggacaaagctggatgctgtttacctaaacaagaataaataacctgacagttattgacaaaagatgcatggaggagtatacagtggaaccaagcttgctggacgtgtctcaaacagtgctactgcccctcatccaaaggcctggagcacctgaaggaactgatagcaagaaacacctggactcttaagaaacttccactttccttgagtttcttcacctcacacgggctgacctttcttaccgaagccactgctgtgcttttaagaaatcagaagaaaatcagaggaatccttgagtccttgatgtgtaatgagagcagtatgcagagcttgcgcagagaaaatctgtgaatgccttgaatagccccctccaccaggaatatgaagagaatctgggtgacagcattgttgggtacaaggaaaagtccaagttccaggatactataacaacgctcattattacgtcttctttgaagaacaaggatgagatcattggttttggccaggagctcaaaaacccccaggaagagactctacaagcttttgacagccattatgactacaccatatgtggggacagtgaagacatgggtgtgtaccccccaagtcagatgagttcaaccctgttgaagacataatgggctacaagttcctgagaattgtgggtgtggttcgttagtctgctggctctcctgggcaatgtctttgtcctgcttattctcctcaccagccactacaaactgaacgtccccgctttctcatgtgcaacctggcctttgcggatttctgcatggggatgtacctgctcctcatcgctctgtagacctctacactactctgagtactacaacatgccatcgactggcagacaggccctgggtgcaacacggctggtttcttactgtctttgc aagcgagttatcgggtgatacgtgacggatcacctggagcgtggatgccatcaccttcgccatgcccctggaccggaagatccgcctcaggcacgcatgtgccatcatggttgggggctgggtttgctgcttctctcgccctgcttctttgggtgggaataagtagctatgcaaaagtcagtatctgcctgccatggacaccgagaccctcttgctctggcatatattgtttttgttctgacgctcaacatagttgccttcgtcatcgtctgctgctgttatgtgaagatctacatcacagtcgaaatccgcagtacaaccaggggacaaagataccaaaattgccaaaggatggctgtgttgatcttaccgacttcatatgcatggcccaatctcattctatgctctgtcagcaatcttgaacaagcctctcatcactgttagcaactccaaaatcttgctggtagcttcttatccacttaactcctgtgccaatccattcctctatgctattttccaaaggccttccagagggatgtgttcatcctactcagcaagttggcatctgtaaaccgaggctcaggcataccgggggagagggttcctccaaagaacagcactgatattcaggttcaaaaaggttaccacagagatgaggcagggtctccacaacatggaagatgtctatgaaactgattgaaaactcccatctaaccacaaagaagcaaggccaaatctcagaagagtatatgcaaacggttttgttaa3'

9.2. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Albumin, bovine serum
bTSH	bovines TSH
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cAMP	cyclischen Adenosinmonophosphat
c52	compound 52
Cb	Cysteinbox
CG	Choriogonadotropin
CH	Schweiz
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
cm	Zentimeter
cpm	counts per minute
D	Deutschland
DK	Dänemark
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EA	Enzym-Akzeptor
E. coli	Escherichia coli
EC ₅₀	mittlere effektive Dosis
ED	Enzym-Donor
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EFC	enzym fragment complementation
EGTA	Ethylendioxy-bis(ethylnitrilo)-etraessigsäure
Endo H	Endoglykosidase H
EO	Endokrinen Orbithopathie

ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere (et alii)
EZS	extrazelluläre Schleife
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FKS	Foetales Kälberserum
FSH	follikelstimulierendes Hormon
FSHR	follikelstimulierendes Hormon Rezeptor
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	green fluorescent protein
GPHR	Glykoproteinhormonrezeptor
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Glycoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Reinstwasser
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HEK	humane embryonale Nierenzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HTS	High Throughput Screening
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IZS	intrazelluläre Schleife
IU	Internationale Unit
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LC50-Wert	Lethal Concentration, mittlere letale Konzentration
LH	luteinisierendes Hormon
LHCGR	Rezeptor für das luteinisierende Hormon und Choriogonadotropin

LRR	leucin rich repeat
LMW	low molecular weight
M	Molar
mA	Milliampere
Min.	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NBT	p-Nitro-Tetrazolium-Blau-Chlorid
ng	Nanogramm
NL	Niederlande
nm	Nanometer
OD	Optical density, optische Dichte
OF	orbitale Fibroblasten
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PBS-CM	PBS mit Calcium und Magnesium
PBSM	PBS ohne Calcium und Magnesium
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pmol	Pikomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNGase F	N-Glykosidase F
PSA	Polar Surface Area
r	concentration ratio
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
T ₃	Triiodthyronin
T ₄	Thyroxin
TAE	Tris-Acetat-EDTA

Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TMH	Transmembranhelix
TRH	Thyreotropin–Releasing–Hormon
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
TSHR	Thyreoidea-stimulierendes Hormon Rezeptor
SBA	spezifische basale Aktivität
SAR	<i>structure activity relationship</i>
UK	United Kingdom
USA	United States of America
V	Volt
v/v	volume/volume (Volumen/Volumen)
w/v	weight/volume (Gewicht/Volumen)
w/v	weight/volume (Gewicht/Volumen)
WT	Wildtyp
x	mal
z. B.	zum Beispiel

9.3. ABKÜRZUNGEN DER AMINOSÄUREN

Einbuchstabencode	Dreibuchstabencode	Aminosäure
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

9.4. PUBLIKATIONEN, VORTRÄGE UND POSTER

9.4.1. PUBLIKATIONEN

Hoyer I, Haas AK, Kreuchwig A, Schülein R, Krause G (2013)

Molecular sampling of the allosteric binding pocket of the TSH receptor provides discriminative pharmacophores for antagonist and agonists.

Biochem Soc Trans. 2013;41(1):213-7. doi:10.1042/BST20120319

Kleinau G, Hoyer I, Kreuchwig A, Haas AK, Rutz C, Furkert J, Worth CL, Krause G, Schülein R (2011)

From molecular details of the interplay between transmembrane helices of the thyrotropin receptor to general aspects of signal transduction in family a G-protein-coupled receptors (GPCRs).

J Biol Chem. 2011;286(29):25859-71. doi:10.1074/jbc.M110.196980.

Haas AK, Kleinau G, Hoyer I, Neumann S, Furkert J, Rutz C, Schülein R, Gershengorn MC, Krause G (2011)

Mutations that silence constitutive signaling activity in the allosteric ligand-binding site of the thyrotropin receptor.

Cell Mol Life Sci. 2011;68(1):159-67. doi:10.1007/s00018-010-0451-2.

Kleinau G, Haas AK, Neumann S, Worth CL, Hoyer I, Furkert J, Rutz C, Gershengorn MC, Schülein R, Krause G (2010)

Signaling-sensitive amino acids surround the allosteric ligand binding site of the thyrotropin receptor.

FASEB J. 2010;24(7):2347–54. doi:10.1096/fj.09-149146.

9.4.2. VORTRÄGE UND POSTER

Hoyer I, Kreuchwig F, Haas AK, Furkert J, Rutz C, Schülein R, Krause G (2012; Kurzvortrag und Posterpräsentation)

Allosteric modulation of the TSH Receptor: Switching between active and inactive states. MPGPCR Meeting, Monash University, Melbourne, Australien, Dezember 2012

Hoyer I, Haas AK, Furkert J, Rutz C, Schülein R, Krause G (2012; Vortrag und Posterpräsentation)

Switching agonism to antagonism and vice versa by molecular sampling the allosteric binding pocket of the TSHR

GPCR-Conference, Monash University, Prato, Italy, September 2012

Hoyer I, Haas AK, Furkert J, Rutz C, Schülein R, Krause G (2012, Vortrag)

Molecular sampling of TSH receptor allosteric binding pocket: Switching agonism to antagonism and reverse.

36th Annual Meeting of the European Thyroid Association (ETA), Pisa, Italy, September 2012

Hoyer I, Furkert J, Schülein R, Krause G (2011, Vortrag)

Screening small molecules as allosteric ligands for the Thyrotropin Receptor.

27. Arbeitstagung Experimentell Schilddrüsenforschung (AESF), Berlin, Deutschland, Dezember 2011

Hoyer I, Kleinau G, Haas AK, Kreuchwig A, Grzesik P, Worth C, Schülein R, Krause G (2011, Posterpräsentation)

Different and common transmembrane activation mechanisms between glycoprotein hormone receptors and other G-protein coupled receptors.

European Congress of Endocrinology (ECE), Rotterdam, Niederlande, Mai 2011

Hoyer I, Kleinau G, Haas AK, Kreuchwig A, Furkert J, Worth C, Schülein R, Krause G (2011, Posterpräsentation)

The conformation of transmembrane helix 5 in glycoprotein hormone receptors is likely different compared to other G-protein-coupled receptors.

54. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE), Hamburg, Deutschland, März 2011

Hoyer I, Kleinau G, Haas AK, Kreuchwig A, Worth C, Schülein R, Krause G (2010, Kurzvortrag und Posterpräsentation)

Transmembrane helix 5 of the thyrotropin receptor likely exhibits different conformations than in other GPCR structures and function as a stabilizing component for the active state.

14th International Thyroid Congress (ICE), Paris, Frankreich, September 2010

Hoyer I, Kleinau G, Haas AK, Schülein R, Krause G (2010, Posterpräsentation)

Mapping the complete interface of signaling sensitive amino acids between helices 5 and 6 of the Thyrotropin Receptor.

53. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE), Leipzig, Deutschland, März 2010

Hoyer I, Kleinau G, Haas AK, Kreuchwig A, Furkert J, Worth C, Schülein R, Krause G (2010, Vortrag)

Thyrotropin Receptor: Transmembrane helix 5 likely exhibits different conformation than in other GPCR structures and functions as a stabilizing component for the active state.

26. Arbeitstagung Experimentell Schilddrüsenforschung (AESF), Halle, Deutschland, Dezember 2010

9.5. SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, dass ich die von mir vorlegte Dissertation selbständig verfasst, die benutzten Quellen sowie Hilfsmittel vollständig angegeben habe. Diese Dissertation hat noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen. Abgesehen von den Teilpublikationen wurde diese Dissertation nicht veröffentlicht.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Dr. Gerd Krause und Herrn Prof. Dr. Hartmut Oschkinat betreut worden.

Berlin, den 13. November 2014

Inna Hoyer