

Aus dem Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Neue Einblicke in Struktur und Funktion des
Thyreotropin Rezeptors
durch die Charakterisierung natürlich vorkommender Mutationen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Franziska Winkler
aus Bernau

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. H. Biebermann

2. Prof. Dr. K. Brix

3. Priv.-Doz. Dr. R. Schülein

Datum der Promotion: 07.09.2012

Abkürzungsverzeichnis

Abk.	Abkürzung
AC	Adenylatzyklase
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bTSH	bovines TSH
CAM	Konstitutiv aktivierende Mutation
cAMP	Zyklisches 3'-5'-Adenosinmonophosphat
C.flag	C-terminaler Flag
COS-7	Nierenzellen von <i>Ceropithicus aethiops</i> (CV1 Origin SV40)
C.tt	C-terminus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Extrazellulärer Loop (Schleife)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
HA	Hämagglutinin
N.HA	N-terminaler Hämagglutinin flag
HEK-293	Human Embryonic Kidney-Zellen
ICL	Intrazellulärer Loop (Schleife)
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GPHR	Glykoprotein-Hormon Rezeptor
IP	Inositolphosphat
IP3	Inositoltriphosphat
LHCGR	Lutropin/ Choriogonadotropin Rezeptor
N.HA	N-terminaler Hamagglutinin flag
N.tt	N-terminus
PCR	Polymerasekettenreaktion
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC-β	Phospholipase C- β
T3	Triiodthyronin
ft3	freies Triiodthyronin

Abk.	Abkürzung
T4	Tetraiodthyronin
fT4	freies Tetraiodthyronin
TMH	Transmembranhelix
TRAK	Thyrotropin Rezeptor Auto-Antikörper
TRH	Thyreotropin Releasing Hormon
TRHR	Thyreotropin Releasing Hormon Rezeptor
TSH	Thyreotropin
TSHR	Thyreotropin Rezeptor
WT	Wildtyp

Buchstabencode der Aminosäuren

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

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung.....	2
2.1 Relevanz des Thyreotropin Rezeptors in der Regulation der Schilddrüsenhormonsynthese	2
2.2 Struktur und Funktion des Thyreotropin Rezeptors	2
2.3 Schilddrüsenerkrankungen durch Mutationen im Thyreotropin Rezeptor	3
2.4 Oligomerisierung des Thyreotropin Rezeptors	4
3. Zielsetzung	5
4. Methodik.....	6
4.1 Patienten	6
4.2 Molekularbiologische Methoden	6
4.3 Zellkultur, Transfektion und funktionelle Assays.....	7
5. Ergebnisse	8
5.1 Funktionelle Charakterisierungen vier neuer Patientenmutationen	8
5.2 Funktionelle Untersuchungen von Seitenkettenvariationen an Position Cystein ⁶³⁶ und Prolin ⁶³⁹ der TMH6	13
5.3 Einfluss von konstitutiv aktivierenden Mutationen an Position Cystein ⁶³⁶ auf die Dimerisierungsfähigkeit des TSHR.....	13
6. Diskussion	17
6.1 TSHR-Mutationen als molekulare Ursache für Schilddrüsenerkrankungen	17
6.2 Seitenkettenveränderungen beeinflussen die Rezeptorkonformation und Funktionsfähigkeit	18
6.3 Einfluss von Mutationen auf die TSHR-Dimerisierung.....	19
7. Literaturverzeichnis	21
8. Anteilserklärung.....	24
9. Lebenslauf.....	25
10. Publikationsliste	26
11. Selbstständigkeitserklärung	27
12. Danksagung.....	28

1. Zusammenfassung

Der Thyreotropin Rezeptor (TSHR) ist ein Rhodopsin- ähnlicher, G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPCR). Der TSHR bindet seinen natürlichen Liganden Thyreotropin (TSH) extrazellulär. Dies führt zu strukturellen Veränderungen innerhalb des Rezeptors und ermöglicht die intrazelluläre Aktivierung von $G_{\alpha s}$ - und $G_{\alpha q/11}$ -Proteinen, welche die Konzentrationen sekundärer Effektoren wie cAMP oder IP3 regulieren. Der TSHR wird hauptsächlich in den Thyreozyten der Schilddrüse exprimiert und steht damit im direkten Zusammenhang mit der Regulation des Schilddrüsenhormonhaushaltes. Fehlfunktionen der Schilddrüse, wie die nicht-autoimmune Hyperthyreose oder die kongenitale Hypothyreose, sind häufige endokrine Erkrankungen des Menschen. Als molekulare Ursachen konnten bereits eine Vielzahl von natürlich vorkommenden Mutationen im TSHR-Gen identifiziert werden, welche den Rezeptor in seiner Funktionalität beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit werden detaillierte molekulare Untersuchungen zu vier neuen pathogenen TSHR-Mutationen beschrieben. Der Fokus dieser Arbeit liegt dabei auf der Untersuchung der funktionalen Signalisierungseigenschaften dieser TSHR-Varianten im Vergleich zum unveränderten TSHR-Wildtypen. Es kann gezeigt werden, dass die drei Mutationen p.Ile486Asn, p.Cys636Trp und p.Cys636Arg eine konstitutive (ligandenunabhängig) Aktivierung des $G_{\alpha s}$ -Signalisierungsweges auslösen und damit eine mögliche Ursache der nicht-autoimmunen Hyperthyreose darstellen. Die TSHR Variante p.Pro639Leu führt zu einem kompletten Funktionsverlust des Rezeptors (inaktiv für $G_{\alpha s}$ - und $G_{\alpha q/11}$ -Kopplung) und ist deshalb als Ursache für die kongenitale Hypothyreose der Patienten anzusehen. Gezielte Veränderungen der Wildtyp-Aminosäure an den Positionen Cystein⁶³⁶ und Prolin⁶³⁹ der Transmembranhelix 6 (TMH6) des TSHR haben diese Positionen als wichtige Schalterstellen für die Aktivierung bzw. Inaktivierung des Rezeptors charakterisiert. Große (verzweigte bzw. voluminöse) und geladene Aminosäuren können aktivierende Bewegungen der Helizes durch die Zerstörung hydrophober Wechselwirkungen zu benachbarten Aminosäuren verhindern, während kleinere Aminosäuren eine Neuorientierung der beteiligten Helizes auslösen und so den Rezeptor konstitutiv aktivieren. Weiterhin kann belegt werden, dass weder die konstitutiv aktivierenden p.Cys636Trp und p.Cys636Arg, noch die inaktivierende Mutation p.Cys636Leu den Oligomerstatus des TSHR beeinflussen bzw. einen Zerfall des Oligomers in Protomere hervorrufen.

2. Einleitung

2.1 Relevanz des Thyreotropin Rezeptors in der Regulation der Schilddrüsenhormonsynthese

Die Hauptfunktion der Schilddrüse besteht in der Bildung und endokrinen Sekretion der Schilddrüsenhormone Thyroxin (Tetraiodthyronin, T₄) und Triiodthyronin (T₃). Sie sind u.a. für die Entwicklung des zentralen Nervensystems, sowie für die Aufrechterhaltung metabolischer Stoffwechselwege im gesamten Körper von entscheidender Bedeutung [1,2]. Die Regulation des Schilddrüsenhormonspiegels erfolgt über einen hypothalamisch-hypophysären Regelkreis mit negativer Rückkopplung [3]. Das im Hypothalamus sezernierte Thyreotropin Releasing Hormon (TRH) bindet in der Adenohypophyse an den TRH-Rezeptor (TRHR) und regt dort die Ausschüttung von Thyreotropin (TSH) in die Blutlaufbahn an. Die spezifische Bindung von TSH an dem membranständigen TSH-Rezeptor (TSHR) der Thyreozyten initiiert die intrazelluläre Synthese und Sekretion der Schilddrüsenhormone und steuert gleichzeitig das Thyreozytenwachstum und die Schilddrüsendurchblutung. Die Schilddrüsenhormone wiederum regulieren über Rückkopplung die TRH- und TSH-Synthese, so dass sich ein Gleichgewicht des Hormonspiegels im Blut einstellt [4,40].

2.2 Struktur und Funktion des Thyreotropin Rezeptors

Der Thyreotropin Rezeptor (TSHR) gehört zusammen mit dem Follitropin- (FSHR) und dem Lutropin/ Choriogonadotropin- (LHCGR) Rezeptor zur Familie der Glykoprotein-Hormon Rezeptoren (GPHRs) [5]. Das TSHR-Gen ist auf Chromosomen 14p31.1 lokalisiert. Es besteht aus 10 kodierenden Exons, die das 764 Aminosäuren große TSHR-Glykoprotein verschlüsseln. Der TSHR besteht strukturell aus einem langen extrazellulären Bereich, sieben Transmembranhelizes (TMH 1-7), drei extrazellulären (ECL 1-3) und drei intrazellulären Schleifen (ICL 1-3) sowie einem intrazellulären C-terminalen Bereich [5]. Durch die extrazelluläre Bindung von TSH kommt es zu einer Konformationsänderung innerhalb des Rezeptors, wodurch intrazellulär interagierende G-Proteine aktiviert, zelluläre sekundäre Effektorsysteme wie zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) oder Inositolphosphat (IP) freigesetzt und Genexpressionen initiiert und reguliert werden. G-Proteine sind heterotrimere Proteine und bestehen aus einer α -Untereinheit sowie einer β/γ -Untereinheit. Der TSHR kann mit mehreren Subtypen von G-Proteinen interagieren. [6-8].

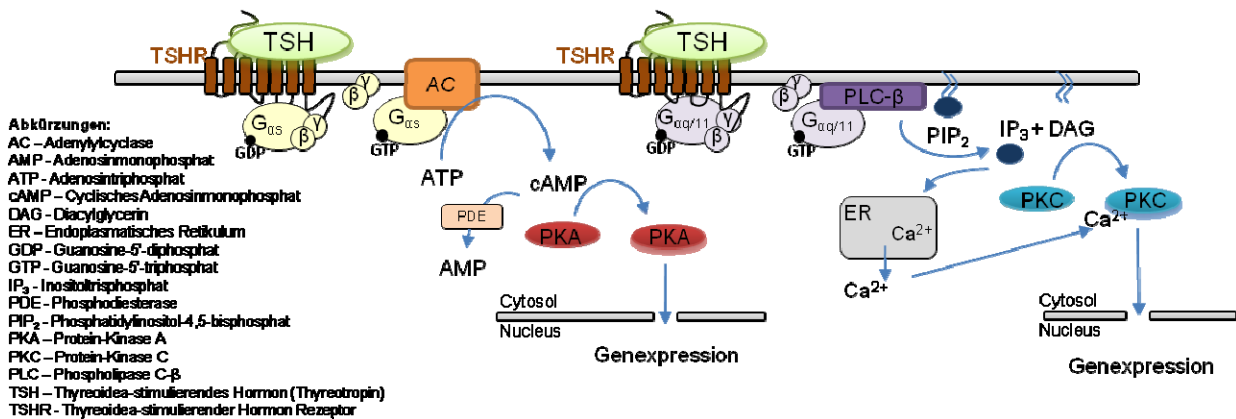


Abbildung 1: Signalkaskaden des TSH-Rezeptors. TSH bindet extrazellulär an den TSHR, wodurch dessen Konformation in einen aktivierten Zustand überführt wird. Der aktivierte Rezeptor reagiert selektiv mit den heterotrimeren G-Proteinen ($G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q/11}$, $G_{12/13}$), die durch den Austausch von GDP zu GTP selbst aktiviert werden und in ihre zwei Untereinheiten (G_{α} und $\beta\gamma$) dissoziieren. $G_{\alpha s}$ aktiviert anschließend die membranständige Adenylatzyklase (AC), welche die Synthese von ATP zu cAMP katalysiert und damit die PKA aktiviert. $G_{\alpha q/11}$ aktiviert andererseits die Phospholipase C- β (PLC- β), wodurch PIP_2 zu IP_3 und DAG katalysiert und die PKC aktiviert wird. IP_3 löst daraufhin die Calcium-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum aus. Beide hier dargestellten Signalwege führen zur Expression von spezifischen Genen im Nucleus.

Bisher wurde davon ausgegangen, dass die intrazelluläre Signalübertragung des TSHR hauptsächlich über die Aktivierung von $G_{\alpha s}$ -Proteinen realisiert wird und damit die induzierte cAMP-Akkumulation für das Wachstum und die Funktion der Schilddrüse verantwortlich ist [4,9]. Es gibt allerdings auch neuere Anhaltspunkte für eine physiologische und pathophysiologische Relevanz der $G_{\alpha q/11}$ -Aktivierung [10-12] im Zusammenhang mit dem Schilddrüsenwachstum. Zum einen handelt es sich um ein Mausmodell, bei dem durch einen spezifischen knock-out die $G_{\alpha q/11}$ -Proteine in den Thyreozyten ausgeschaltet sind, was sich, nach induzierter TSH-Stimulation, im Vergleich zum Wildtyp phänotypisch durch das Ausbleiben eines Strumawachstums auswirkt [12]. Zum anderen wurde eine homozygote, inaktivierende Mutation (L653V im ECL3) in Patienten mit Hyperthyrotropinämie und normal entwickelter Schilddrüse beschrieben, welche selektiv die $G_{\alpha q/11}$ -Aktivierung stark reduziert, die $G_{\alpha s}$ -Signalisierung jedoch nicht beeinträchtigt [10].

2.3 Schilddrüsenerkrankungen durch Mutationen im Thyreotropin Rezeptor

Fehlfunktionen der Schilddrüse zählen zu den häufigsten endokrinen Erkrankungen des Menschen. Natürlich vorkommende, aktivierende und inaktivierende Mutationen im TSHR-Gen sind als molekulare Ursache von Schilddrüsenerkrankungen, wie der nicht-autoimmunen Hyperthyreose und der kongenitale Hypothyreose, identifiziert worden [13].

Dabei kommt es entweder zu einer gesteigerten („gain-of-function“) oder zum teilweisen bzw. kompletten Verlust („loss-of-function“) der Hormonproduktion. Mutationen, die die Signalisierungsfähigkeit des Rezeptors ligandenunabhängig aktivieren, werden als konstitutiv aktivierende Mutationen (CAMs) bezeichnet. CAMs sind am häufigsten in den helikalen Transmembranstrukturen lokalisiert, mit einer Häufung in der Transmembranhelix 6 [13]. Heterozygote, konstitutiv aktivierende Mutationen wurden als molekulare Ursache für die Entstehung von Schilddrüsenadenomen [14] und der nicht-autoimmunen Hyperthyreose identifiziert [15,16]. Seit 1993 wurden zahlreiche somatische Mutationen [14,17,18] und Keimbahnmutationen [16] im TSHR-Gen identifiziert, die zu einer selektiven oder bivalent konstitutiven Aktivierung des G_{α_s} - und $G_{\alpha_q/11}$ -Signalisierungsweges führten. Die Schilddrüse aller bisherigen Mutationsträger von aktivierenden TSHR-Mutationen ist vergrößert, was auf den Effekt der konstitutiven G_{α_s} -Signalisierung zurückgeführt wurde. Inaktivierende Mutationen sind vorwiegend in dem intra- und extrazellulären Bereich des Rezeptors lokalisiert. Sie können homo- und heterozygot auftreten und gelten als molekulare Ursache für die kongenitale Hypothyreose [19].

2.4 Oligomerisierung des Thyreotropin Rezeptors

Der molekulare Mechanismus der GPCR-Oligomerisierung ist bislang nur teilweise aufgeklärt und seit vielen Jahren ein intensiv untersuchtes Forschungsgebiet. Auch der TSHR bildet Di- bzw. Oligomere [20]. Diese Komplexe formen sich schon frühzeitig im endoplasmatischen Retikulum und sind sowohl strukturell als auch funktionell relevant [21-23]. Monomere in einem Oligomer interagieren dabei insbesondere über Kontakte zwischen den Transmembranhelizes und intrazelluläre Bereiche, wobei der N-terminale Bereich des TSHR bei der Ausbildung des Oligomers unterstützend wirken kann [23,24]. Allerdings konnten bisher weder die kontaktierenden Helizes noch die involvierten Aminosäuren konkret benannt werden. Da die Aktivierung des Rezeptors, im Gegensatz zur Inaktivierung, strikt an eine strukturelle Bewegung der Helizes gebunden ist, könnten aktivierende Mutationen im Bereich der Transmembranhelizes des Rezeptors zur Formation neuer Interaktionen zwischen den Helizes oder auch zum Zerfall des Oligomers führen, wie für die Aktivierung des TSHR durch TSH oder TSHR-Auto-Antikörper postuliert wird [9,21].

3. Zielsetzung

Am *Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie* wurden im Rahmen eines Screenings nach Mutationen in Exon 9 und 10 des TSHR- Gen bei Patienten mit einer nicht-autoimmunen Hyperthyreose drei neue, heterozygote Mutationen (**p.Ile486Asn**, **p.Cys636Trp** und **p.Cys636Arg**) identifiziert. Außerdem wurde bei zwei Geschwistern mit kongenitaler Hypothyreose eine neue, compound heterozygote Mutation (**p.Trp546Stop/p.Pro639Leu**) nachgewiesen.

Ziele der vorliegenden Arbeit sind:

- 1) Funktionelle Charakterisierungen der vier neuen Patientenmutationen, um zu klären, ob die Mutationen ursächlich für die jeweiligen Erkrankungen sind und inwiefern sich die Mutationen auf die Struktur und Funktion des Rezeptors auswirken.
- 2) Herstellung von Seitenkettenvariationen an den Positionen Cystein⁶³⁶ und Prolin⁶³⁹ der im Aktivierungsprozess des Rezeptors involvierten Transmembranhelix 6. Die Analysen sollen weiterführende Informationen zu strukturellen Konsequenzen für die Rezeptoraktivierung und -inaktivierung liefern.
- 3) Untersuchung des Einflusses von konstitutiv aktivierenden Mutationen an Position Cystein⁶³⁶ auf die Dimerisierungsfähigkeit des TSHR, da ein möglicher Zusammenhang zwischen aktivierenden Mutationen und einer Modifizierung des TSHR-Oligomerstatus bisher nicht eingehend untersucht wurde.

4. Methodik

4.1 Patienten

Patient 1: **p.Ile486Asn**

Patient 2: **p.Cys636Trp**

Patient 3: **p.Cys636Arg**

Bei den drei untersuchten Patienten wurde die Diagnose der nicht- autoimmunen Hyperthyreose mit einem supprimierten TSH-Spiegel und erhöhten Schilddrüsenhormonwerten gestellt. Es konnten keine TSHR-Auto-Antikörper (TRAKs) nachgewiesen werden. Die Schilddrüsen der Patienten 1 und 2 zeigten keine Vergrößerung. Eine geringe Struma wurde bei Patient 3 beobachtet.

Patient 4, 5: p.Trp546Stop/ **p.Pro639Leu**

Bei einem Geschwisterpaar wurde eine kongenitale Hypothyreose infolge erhöhter TSH und erniedrigter T3/FT4 -Hormonwerten diagnostiziert. Im TSHR-Screening wurde festgestellt, dass beide Kinder gemischt (compound) heterozygote Träger von zwei Mutationen (p.Trp546Stop/p.Pro639Leu) im TSHR-Gen sind. Die väterlicherseits vererbte heterozygote Mutation p.Trp546Stop [25] wurde bereits beschrieben und führt zu einem Funktionsverlust des Rezeptors. Die Mutter ist heterozygote Trägerin der noch nicht beschriebenen Mutation p.Pro639Leu. Beide Elternteile weisen keine Krankheitssymptome auf.

4.2 Molekularbiologische Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Standardmethoden wurden nach folgenden Referenzen durchgeführt.

Tabelle 1: Allgemeine, molekularbiologische Methoden und deren Referenzen

Methoden	Referenz
Amplifikation von DNA mittels PCR	Mullis et al., 1986 [26]
Agarosegelelektrophorese	Aaij & Borst, 1972 [27]
DNA Aufreinigung aus Agarosegelen	Wizard [®] SV Gel Clean Up System (Promega)
Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> DH5α Zellen	MAX Efficiency [®] DH5α competent cells (Invitrogen)
Isolation von genomischer DNA aus Leukozyten	Blood amp kit (Qiagen) oder Maxwell 16 Tissue DNA Purification Kit (Promega)

Methoden	Referenz
Ligation von DNA-Fragmenten	Sambrook et al., 2001 (Molecular Cloning: A laboratory manual, 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)
Mini-Plasmidpräparation	PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega)
Midi-Plasmidpräparation	NucleoBond® Xtra Midi (Machery-Nagel)
ortsgerichteten Mutagenese von genomischer DNA mittels Overlap PCR	Heckman & Pease, 2007 [28]
Restriktionsanalysen	Sambrook et al., 2001 (Molecular Cloning: A laboratory manual, 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)
Sequenzierung	Sanger et al., 1977 [29] BigDye Terminator Cycle Sequencing ready reaction Kit (Perkin Elmer)
Transformation von DNA-Fragmenten	Cohen et al., 1972 [30]

4.3 Zellkultur, Transfektion und funktionelle Assays

Für die funktionelle *in vitro* Charakterisierung der TSHR Konstrukte wurden COS-7 bzw. HEK-293 Zellen verwendet. Die Zellen wurden 24h nach der Aussaat mit TSHR-DNA mittels Lipofektions-Technologie mit Hilfe des polykationischen Transfektionsreagenz Metafectene entsprechend der Herstellerangaben (Biontex, München, Germany) transient transfiziert. Folgende funktionelle Assays sind in Labor des IEPE etabliert.

Tabelle 2: Übersicht der etablierten funktionellen Assays (N.HA: N-terminaler Hämagglutinin- tag; C.flag: C-terminaler FLAG- tag; ¹²⁵I- bTSH: radioaktiv markiertes Iod¹²⁵ bovines TSH)

Assay	Zelltyp	Nachweis des	Methoden	Referenz
Oberflächenexpression	COS-7	N.HA	immunologisch und enzymatisch	[31,32]
Sandwich- ELISA	COS-7	N.HA & C.flag	immunologisch und enzymatisch	[31]
Ligandenbindung	COS-7	¹²⁵ I-bTSH/bTSH	Kompetitive Verdrängung (Perkin-Elmer)	[33]
cAMP- Akkumulation	COS-7	cAMP	Alpha Screen (Perkin Elmer)	[32,34]
IP3- Akkumulation	HEK-293	IP3	Luciferaseaktivität (Promega)	[32]

5. Ergebnisse

Nachfolgend sind die Patientenmutationen im *3-Letter-Code* angegeben. Zur Übersichtlichkeit wird bei den Untersuchungen der Seitenkettenvariationen auf den *1-Letter-Code* übergegangen.

5.1 Funktionelle Charakterisierungen vier neuer Patientenmutationen

Erste Zielsetzung war die funktionelle Charakterisierung der vier neuen Patientenmutationen. Die ausführlichen Untersuchungsergebnisse sind in den nachfolgend aufgeführten Publikationen (1- 3) dargestellt und werden hier kurz zusammengefasst.

Patient 1	p.Ile486Asn	Publikation 1
Patient 2	p.Cys636Trp	Publikation 2
Patient 3	p.Cys636Arg	Publikation 3
Patient 4, 5	p.Trp546Stop/ p.Pro639Leu	Publikation 3

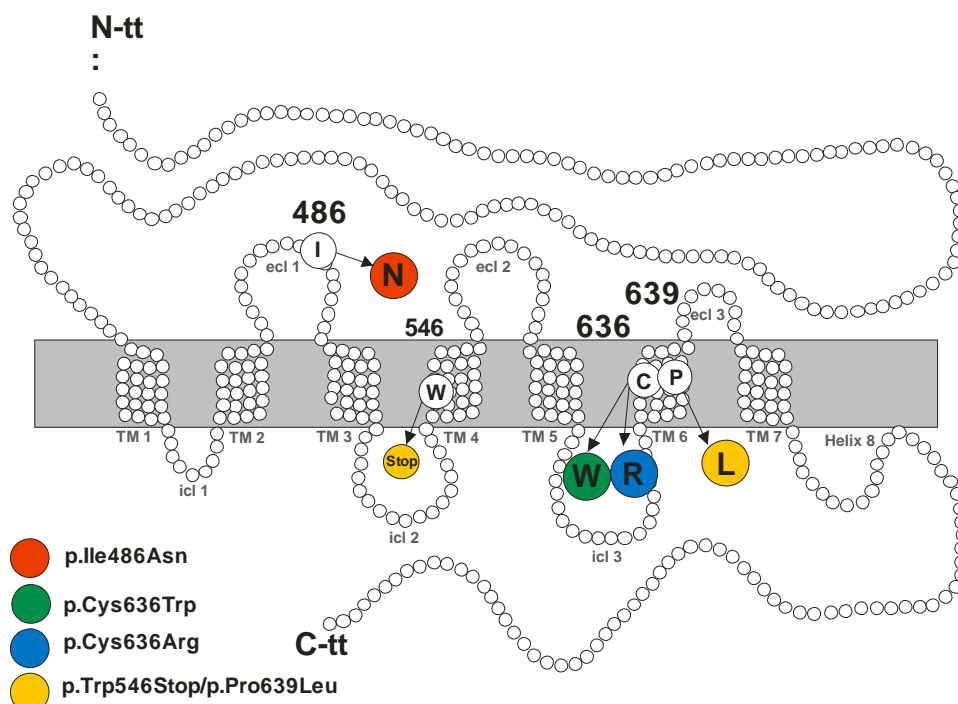


Abbildung 2: Vereinfachtes, zweidimensionales Schema des TSH- Rezeptors mit den vier neuen Patientenmutationen. Die Wildtypaminoacide sind im weißen Kreis dargestellt, die substituierten Aminosäuren der Patientenmutationen farblich daneben abgebildet. TM: Transmembranhelix; ecl: extrazellulärer loop; icl: intrazellulärer loop; N- tt: N- terminus; C- tt: C- terminus

Publikation 1

H Biebermann, **F Winkler**, D Handke, A Grütters, H Krude, G Kleinau

Molecular description of non-autoimmune hyperthyroidism at a neonate caused by a new thyrotropin receptor germline mutation.

Thyroid Research 2011 Aug 3; 4 Suppl 1:S8

<http://www.thyroidresearchjournal.com/content/4/S1/S8>

Patient 1

Molecular description of non-autoimmune hyperthyroidism at a neonate caused by a new thyrotropin receptor germline mutation.

Zusammenfassung

Bei einem Neugeborenen wurde während einer Routineuntersuchung eine erhöhte Herzschlagfrequenz festgestellt. Die Schilddrüse zeigte keine Vergrößerung und es konnten keine TSHR-Auto-Antikörper nachgewiesen werden. Allerdings wurden ein supprimierter TSH- Spiegel und erhöhte T3/FT4 -Hormonwerte festgestellt. Das Mutationsscreening ergab die heterozygote Mutation **p.Ile486Asn** in der extrazellulären Schleife 1 des TSHR.

Die funktionellen *in vitro* Untersuchungen des mutierten TSH- Rezeptors ergaben:

- Die Oberflächensexpression der Mutation p.Ile486Asn ist im Vergleich zum Wildtyp um die Hälfte reduziert.
- In der $G_{\alpha s}$ -Signalisierung zeigt die Mutation p.Ile486Asn eine 4-fach erhöhte liganden-unabhängige (basale) cAMP-Aktivierung, jedoch ist die Maximalaktivierung nach TSH-Stimulation leicht reduziert.
- Die $G_{\alpha q/11}$ -Signalisierung weist nach induzierter Aktivierung mit bovinem TSH (bTSH) eine 13-fache Verminderung der Maximalaktivierung auf und damit eine starke Beeinträchtigung der Signalisierungseigenschaft des mutierten Rezeptors.

Es zeigte sich für diese Mutation, dass durch den Austausch der Aminosäure Isoleucin zu Asparagin der Rezeptor konstitutiv für die cAMP-Akkumulation aktiviert, aber gleichzeitig die Aktivierung des $G_{\alpha q/11}$ -Weges stark beeinträchtigt wurde. Das TSHR-Strukturmodell deutet darauf hin, dass die Position Isoleucin⁴⁸⁶ im Zusammenspiel mit anderen extrazellulären, aktivierungssensitiven Bereichen ein potentieller Schalter für die Initiierung der Signaltransduktion sein könnte. Die milde Form der Hyperthyreose des Patienten resultiert höchstwahrscheinlich aus der konstitutiven Aktivierung des $G_{\alpha s}$ -Signalisierungsweges, während das Ausbleiben einer Struma mit der Inaktivierung der $G_{\alpha q/11}$ -vermittelten Signalisierung erklärt werden könnte.

Publikation 2

F Winkler, G Kleinau, P Tarnow, L Grohmann, I Gaetjens, D L'Allemand, A Grütters, G Krause, H Krude, H Biebermann

A new phenotype of nongoitrous and nonautoimmune hyperthyroidism caused by a heterozygous thyrotropin receptor mutation in transmembrane helix 6.

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2010 Aug; 95(8):3605-10

<http://jcem.endojournals.org/cgi/content/full/95/8/3605>

Patient 2

A new phenotype of nongoitrous and nonautoimmune hyperthyroidism caused by a heterozygous thyrotropin receptor mutation in transmembrane helix 6.

Zusammenfassung

Die Patientin im Alter von 5 Jahren fiel durch eine nicht-autoimmune Hyperthyreose mit einem supprimierten TSH-Spiegel und erhöhten fT3/fT4 -Werten auf. Die Schilddrüse zeigte jedoch, entgegen üblicher Anzeichen bei Hyperthyreose, keine Vergrößerung. Im Mutationsscreening wurde die heterozygote Mutation **p.Cys636Trp** in der Transmembranhelix 6 identifiziert.

Die funktionellen *in vitro* Untersuchungen der mutierten TSH-Rezeptoren ergaben:

- Die Oberflächenexpression der Mutation p.Cys636Trp ist dem Wildtyp ähnlich.
- Die Maximalbindung der Mutationen p.Cys636Trp ist im Vergleich zum Wildtyp leicht reduziert.
- Die Mutation p.Cys636Trp zeigt eine 5-fach erhöhte ligandenunabhängige (basale) cAMP -Aktivierung, die Maximalstimulation der $G_{\alpha s}$ -Aktivierung ist reduziert.
- Die bTSH -induzierte Aktivierung der $G_{\alpha q/11}$ -Signalisierung weist eine partielle Inaktivierung auf.

Der Austausch der Aminosäure Cystein zu Tryptophan aktiviert den Rezeptor konstitutiv für die cAMP-Akkumulation, beeinträchtigt aber gleichzeitig die Aktivierung des $G_{\alpha q/11}$ -Weges. Dies ist daher die erste Beschreibung einer Patientin, deren TSHR-Mutation zu einer nicht-autoimmunen Hyperthyreose führt, welche durch eine konstitutive Aktivierung des $G_{\alpha s}$ -Signalisierungsweges mit gleichzeitiger partieller Inaktivierung der $G_{\alpha q/11}$ -vermittelten Signalisierung gekennzeichnet ist [32]. Dies könnte eine Erklärung für das Fehlen der Struma der Patientin darstellen. In Übereinstimmung zu der hier aufgestellten Hypothese für eine humane Mutation ist an einem Mausmodell gezeigt worden, dass die $G_{\alpha q/11}$ -vermittelte Signalisierung einen Einfluss auf die Schilddrüsenhormonsynthese und das Wachstum der Schilddrüse ausübt [12].

5.2 Funktionelle Untersuchungen von Seitenkettenvariationen an Position Cystein⁶³⁶ und Prolin⁶³⁹ der TMH6

Die zweite Zielsetzung war die Herstellung von Seitenkettenvariationen an den Positionen Cystein⁶³⁶ und Prolin⁶³⁹ der im Aktivierungsprozess des Rezeptors involvierten Transmembranhelix 6. Die Ergebnisse wurden in Publikation 3 veröffentlicht und werden gemeinsam mit dem Einfluss von konstitutiv aktivierenden Mutationen an Position Cystein⁶³⁶ auf die Dimerisierungsfähigkeit des TSHR zusammengefasst.

5.3 Einfluss von konstitutiv aktivierenden Mutationen an Position Cystein⁶³⁶ auf die Dimerisierungsfähigkeit des TSHR

Die dritte Zielsetzung klärt den Einfluss von konstitutiv aktivierenden Mutationen an Position Cystein⁶³⁶ auf die Dimerisierungsfähigkeit des TSHR, um einen möglichen Zusammenhang zwischen aktivierenden Mutationen und einer Modifizierung des TSHR-Oligomerstatus herzustellen. Die Ergebnisse des Sandwich-ELISAs der TSHR-Konstrukte wurden in Publikation 3 veröffentlicht und werden nachfolgend kurz zusammengefasst.

Publikation 3

Biebermann H, **Winkler F**, Handke D, Teichmann A, Gerling B, Cameron F, Eichhorst J, Grüters A, Wiesner B, Kühnen P, Krude H, Kleinau G.

New Pathogenic Thyrotropin Receptor Mutations Decipher Differentiated Activity Switching at a Conserved Helix 6 Motif of Family A GPCR.

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2012 Feb;97(2):E228-32

<http://jcem.endojournals.org/content/97/2/E228.long>

Patienten 3, 4, 5***New Pathogenic Thyrotropin Receptor Mutations Decipher Differentiated Activity Switching at a Conserved Helix 6 Motif of Family A GPCR.*****Zusammenfassung**

Im TSHR wurden zwei neue, pathogene Mutationen identifiziert. Die heterozygote Mutation **p.Cys636Arg** wurde in einem Patienten gefunden, der durch eine nicht-auto-immune Hyperthyreose auffiel. Die Schilddrüse des Patienten zeigt eine leichte Vergrößerung. Eine compound heterozygote Mutation **p.Trp546Stop/p.Pro639Leu** wurde bei zwei Geschwistern mit einer kongenitalen Hypothyreose mit Hypoplasie der Schilddrüse identifiziert.

Die *in vitro* Untersuchungen der beiden TSHR-Patientenmutationen ergaben:

- Die Oberflächenexpression von p.Cys636Arg ist im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöht, p.Pro639Leu ist dem Wildtyp ähnlich exprimiert.
- Die Mutation p.Cys636Arg resultiert in einer 8-fach gesteigerten, konstitutiven Aktivierung des $G_{\alpha s}$ -vermittelten Signalisierungsweges und gleichzeitig eine leichte Reduzierung der Maximalaktivität nach Stimulation. Diese konstitutive Aktivierung könnte auch hier die Ursache der Hyperthyreose sein. Bei der $G_{\alpha q/11}$ -Signalisierung führt die Mutante hingegen zu einer starken Abschwächung der Aktivierungsfähigkeit des Rezeptors, wobei jedoch die Basalaktivität leicht erhöht ist.

Die Mutation p.Pro639Leu führt, wie auch die Mutation p.Trp546Stop [25] zu einem kompletten Verlust der $G_{\alpha s}$ - und $G_{\alpha q/11}$ -Signalisierung des Rezeptors und könnte deshalb die Ursache für die kongenitale Hypothyreose mit Hypoplasie der Schilddrüse der Patienten sein. Die Mutation p.Pro639Leu ist die erste inaktivierende Mutation die im Bereich der TMH6, einem „hot-spot“ von konstitutiv aktivierenden Mutationen, gefunden wurde.

Beide Wildtyp-Aminosäuren, Cystein⁶³⁶ und Prolin⁶³⁹, befinden sich in einer hoch konservierten Region der GPCRs (Cys⁶³⁶-Trp(Met)⁶³⁷-X-Pro⁶³⁹ Motif) und sind in enger hydrophober Wechselwirkung zu benachbarten Aminosäureresten der TMH7, wodurch der inaktive Zustand des Rezeptors stabilisiert wird. Die funktionellen Untersuchungen machen deutlich, dass die Regulation der $G_{\alpha s}$ - und $G_{\alpha q/11}$ -Signalisierung an Positionen der TMH6 stark von den Seitenketteneigenschaften abhängig ist. Große (z.B. Leucin,

Phenylalanin) und geladene (z.B. Arginin) Aminosäurereste können das hydrophobe Umfeld zerstören und eine Inaktivierung des Rezeptors für die bTSH induzierte Aktivierung auslösen, indem sie die aktivierungsrelevante Bewegung der Helizes verhindern. Andere Aminosäuren, wie Tryptophan, Serin, Alanin oder Glycin, führen zu einer selektiv gesteigerten, konstitutiven Aktivierung, die höchstwahrscheinlich durch eine Neuorientierung der beteiligten Helizes hervorgerufen wird.

Die beiden konstitutiv aktivierenden Mutationen Cys636Trp und Cys636Arg, sowie die inaktivierende Mutation Cys636Leu, wurden dahingehend untersucht, ob sie Auswirkungen auf die Dimerisierungsfähigkeit des Rezeptors haben. Im Sandwich-ELISA, bei dem der TSHR-WT mit den jeweiligen Mutanten bzw. die Mutanten untereinander co-exprimiert wurden, ist für jede Rezeptorkombination eine eindeutige Interaktion nachweisbar. Dies bedeutet, dass weder die konstitutiv aktivierenden Mutationen Cys636Trp und Cys636Arg, noch die inaktivierende Mutation Cys636Leu den Oligomerstatus des TSHR beeinflussen bzw. zu einem Zerfall des Oligomers führen.

6. Diskussion

6.1 TSHR-Mutationen als molekulare Ursache für Schilddrüsenerkrankungen

Im TSHR-Gen wurden bisher an zahlreichen Aminosäurepositionen aktivierende und inaktivierende Mutationen identifiziert und als molekulare Ursache für Schilddrüsenerkrankungen, wie der nicht-autoimmunen Hyperthyreose oder kongenitalen Hypothyreose, beschrieben.

Drei der hier untersuchten Patienten wiesen klinische Symptome einer nicht-autoimmunen Hyperthyreose auf. Im Mutationsscreening wurde in den Patienten jeweils eine neue Mutationen identifiziert: 1) **p.Ile486Asn**, 2) **p.Cys636Trp** und 3) **p.Cys636Arg**. Die Auswertungen der funktionellen Charakterisierungen ergaben, dass alle drei Mutationen eine erhöhte, konstitutive Aktivierung des $G_{\alpha s}$ -Signalisierungsweges auslösen. Da die Funktion der Schilddrüse hauptsächlich über die $G_{\alpha s}$ -Signalisierung des TSHRs erfolgt [4,9,21], kann die Ursache für die Hyperthyreose der Patienten durch ihre konstitutive $G_{\alpha s}$ -Aktivierung erklärt werden. Die Mutationen p.Ile486Asn und p.Cys636Trp zeigten im $G_{\alpha q/11}$ -vermittelten Signalweg keine Beeinflussung der Basalaktivität, p.Cys636Arg jedoch eine leichte Erhöhung der ligandenunabhängigen Aktivität. Nach TSH-Induzierung waren die Maximalaktivitäten aller drei Mutanten deutlich reduziert. Neue Untersuchungen der $G_{\alpha q/11}$ -Signalisierung in Mausmodellen ergaben, dass durch einen gezielte knock-out dieses Signalweges die Strumaentwicklung der Schilddrüse nach bTSH-Stimulation ausbleibt [11,12]. Dieses Phänomen könnte das Fehlen der Struma bei den zwei Patienten mit den Mutationen p.Ile486Asn und p.Cys636Trp erklären.

Eine vierte, neue TSHR-Mutation wurde bei einem Geschwisterpaar, die an einer kongenitaler Hypothyreosen leiden, identifiziert. Beide Kinder sind gemischt (compound) heterozygote Träger von zwei Mutationen (**p.Trp546Stop/p.Pro639Leu**) im TSHR-Gen, wobei die väterlicherseits vererbte heterozygote Mutation p.Trp546Stop bereits in [25] beschrieben wurde und zu einem kompletten Funktionsverlust des Rezeptors führt. Die Mutation p.Pro639Leu wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals funktionell charakterisiert. Diese Mutation führt zu einem kompletten Funktionsverlust der $G_{\alpha s}$ - und $G_{\alpha q/11}$ -Signalisierung und kann damit als molekulare Ursache für die Hypothyreose der Patienten angesehen werden.

6.2 Seitenkettenveränderungen beeinflussen die Rezeptorkonformation und Funktionsfähigkeit

Zusätzlich ergibt sich aus den natürlichen Mutationen und deren funktionellen Charakterisierungen die Möglichkeit, Einblicke in strukturelle Aspekte und die Signaltransduktion des TSHRs zu gewinnen. Die neuen Mutationen p.Cys636Trp, p.Cys636Arg und p.Pro639Leu sind in einer hoch konservierten Region der GPCR TMH6 zu finden, die Mutation p.Ile486Asn ist im ECL1 an einer wichtigen Region der Rezeptoraktivierung des TSHR lokalisiert.

An Position Ile⁴⁸⁶ wurden bereits drei somatische Mutationen beschrieben: p.Ile486Phe [25], p.Ile486Met [25] und p.Ile486Asn [26] sowie eine Mutation an der benachbarten Position Ala⁴⁸⁵ (p.Ala485Val [35]), die alle zu einer konstitutiven G_{αs}-Aktivierung des TSHR führen. Die extrazellulären Schleifen stehen in enger Wechselwirkung mit der extrazellulären Hinge-Region und sind besonders wichtig für die Rezeptoraktivierung nach Ligandenbindung [36]. Dabei ist der ECL1 einer der entscheidendsten Bereiche des Rezeptors in diesem Prozess [37,38]. Der Austausch von Isoleucin gegen die hydrophoben Aminosäuren Methionin bzw. Phenylalanin führte zur konstitutiven Aktivierung des G_{αs}- und G_{αq/11}-Signalweges, wobei der Austausch gegen das hydrophile Asparagin, wie in dieser Arbeit gezeigt, die konstitutive G_{αq/11}-Signalisierung nicht beeinflusst. Abhängig von der Eigenschaft der Seitenkette, scheint diese Position ein selektiver Schalter für die Aktivierung des Rezeptors darzustellen.

Auch für die TMH6 sind zahlreiche pathogene Mutationen beschrieben, die den Rezeptor konstitutiv aktivieren [13]. Während des Aktivierungsprozesses des Rezeptors kommt es zu Verschiebungen der Helizes zueinander, vor allem der TMH6 in Relation zu TMH3 und TMH7. An TSHR Strukturmodellen wird sichtbar, dass die Seitenkette des Cystein⁶³⁶ im basalen Zustand des Rezeptors in Richtung TMH7 orientiert ist, wo es mit weiteren Aminosäuren sehr enge hydrophobe Kontakte eingeht und den basalen Zustand des Rezeptors stabilisiert. Diese Stabilisierung kann durch die verzweigte Seitenkette des Leucins verstärkt werden, was zur kompletten Inaktivierung des Rezeptors führt, da aktivierungsrelevante Bewegungen der Helizes verhindert werden. Der Austausch von Cystein⁶³⁶ gegen die aromatische und große Aminosäureseitenkette des Tryptophans oder das lange, verzweigte und geladene Arginin, führt hingegen zu einer Aktivierung des Rezeptors, da höchstwahrscheinlich der hydrophobe Kontakt zur TMH7 gestört wird.

Bisher sind keine inaktivierenden Mutationen an der TMH6 berichtet worden. Zudem ist das Prolin⁶³⁹ an dieser Position hoch konserviert innerhalb der GPCRs. Es unterstützt eine geknickte („kink“) Konformation der Helix 6 aufgrund einer fehlenden Wasserstoffbrücke. Diese Konformation ist ein relevantes Strukturelement der Familie A der GPCRs, da er einen Drehpunkt für die Bewegung der TMH6 relativ zu den benachbarten Helizes darstellt und mit der Aktivierung des Rezeptors und Initiierung der Signaltransduktion in Verbindung steht. Der Aminosäureaustausch von Prolin⁶³⁹ gegen Leucin ist die erste Mutation, die in diesem Bereich des Rezeptors zu einem kompletten Funktionsverlust führt. Es ist zu vermuten, dass die verzweigte und lange aliphatische Seitenkettenstruktur des Leucins neue Interaktionen mit der TMH7 ausbildet und damit eine Bewegung am „kink“ der TMH6 verhindert. Außerdem könnte die lange Leucin-Seitenkette auch den Abstand zwischen TMH6 und TMH7 verändern oder die „kink“-Konformation modifizieren, was zu einem Verlust der aktivierungsrelevanten Bewegung und Signalisierungsfunktion führen könnte. Weitere Substitutionen von Prolin⁶³⁹, wie z.B. zu Alanin, Serin oder Glycin, verändern die räumliche Umgebung des Rezeptors leicht, erhalten aber die Rezeptorkonformation und damit die Funktionsfähigkeit aufrecht. Eine Folge dieser Substitutionen ist eine leicht konstitutive Aktivierung der G_{αs}-Signalisierung und eine partielle Inaktivierung der maximalen G_{αq/11}-Signalisierung. Die Insertion von zwei Glycinen an Position Pro⁶³⁹ führte bei beiden Signalwegen zu einer starken, konstitutiven Aktivität mit gleichzeitigem Verlust weiterer Stimulierbarkeit durch TSH. Vermutlich kommt es durch die Insertionen zu einer Rotation der TMH6, was eine Aktivierung des Rezeptors darstellt. Allerdings werden auch Seitenketten anderer Positionen der TMH6 und ihrer Orientierung zu benachbarten Helizes verändert und damit die weitere Stimulierbarkeit verhindert.

6.3 Einfluss von Mutationen auf die TSHR-Dimerisierung

Die Rezeptordimerisierung stellt einen wichtigen, strukturellen Aspekt für die Funktionalität des Rezeptors dar [39]. Es ist bekannt, dass sich innerhalb der Transmembranhelizes mögliche Kontaktpunkte des TSHR Dimerkomplexes befinden [24]. Mutationen an Position Cystein⁶³⁶ wurden dahingehend untersucht, ob sie zu einem Zerfall des Dimers führen. Die Ergebnisse der Sandwich-ELISA-Analysen bewiesen, dass weder die untersuchten konstitutiv aktivierenden Mutationen C636W und C636R, noch die inaktivierende Mutation C636L der TMH6 das Dimerisierungsverhalten beeinflussen. Im Kontext der allgemeinen TSHR-Aktivierung

könnte dies heißen, dass die Aktivierung des TSHRs zumindest nicht mit einer Auflösung von Dimeren verbunden ist, wie es für die durch TSH ausgelöste Aktivierung diskutiert wurde.

Schlussfolgerung

Anhand der hier betrachteten Mutationen p.Cys636Trp, p.Cys636Arg und p.Pro639Leu wird deutlich, dass die TMH6 in dem Aktivierungs- bzw. Inaktivierungsprozess des TSHR involviert ist, die Dimerisierung aber nicht beeinflusst wird. Die beiden Wildtyp-Aminosäuren der Positionen Cystein⁶³⁶ und Prolin⁶³⁹ befinden sich in einer hoch konservierten Region (Cys⁶³⁶-Trp(Met)⁶³⁷-X-Pro⁶³⁹ Motif) der TMH6 und sind im basalen Zustand des Rezeptors in enger hydrophober Wechselwirkung zu benachbarten Aminosäureresten der TMH7. Räumliche Veränderungen der TMH6 zur TMH3 und TMH7 des TSHRs können die Signaltransduktion stark beeinflussen und ferner krankheitsverursachende Auswirkungen auf den Organismus haben.

7. Literaturverzeichnis

1. **Wexler JA, Sharretts J.** Thyroid and bone. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2007 Sep;36(3):673-705, vi.
2. **Ahmed OM, El-Gareib AW, El-Bakry AM, Abd El-Tawab SM, Ahmed RG.** Thyroid hormones states and brain development interactions. *Int J Dev Neurosci.* 2008 Apr;26(2):147-209.
3. **Eisenberg M, Samuels M, DiStefano JJ, 3rd.** Extensions, validation, and clinical applications of a feedback control system simulator of the hypothalamo-pituitary-thyroid axis. *Thyroid.* 2008 Oct;18(10):1071-85.
4. **Vassart G, Dumont JE.** The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocr Rev.* 1992 Aug;13(3):596-611.
5. **Kleinau G, Krause G.** Thyrotropin and homologous glycoprotein hormone receptors: structural and functional aspects of extracellular signaling mechanisms. *Endocr Rev.* 2009 Apr;30(2):133-51.
6. **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 Jan 9;93(1):116-20.
7. **Van Sande J, Raspe E, Perret J, et al.** Thyrotropin activates both the cyclic AMP and the PIP2 cascades in CHO cells expressing the human cDNA of TSH receptor. *Mol Cell Endocrinol.* 1990 Nov 12;74(1):R1-6.
8. **Allgeier A, Offermanns S, Van Sande J, Spicher K, Schultz G, Dumont JE.** The human thyrotropin receptor activates G-proteins Gs and Gq/11. *J Biol Chem.* 1994 May 13;269(19):13733-5.
9. **Davies T, Marians R, Latif R.** The TSH receptor reveals itself. *J Clin Invest.* 2002 Jul;110(2):161-4.
10. **Grasberger H, Van Sande J, Hag-Dahood Mahameed A, Tenenbaum-Rakover Y, Refetoff S.** A familial thyrotropin (TSH) receptor mutation provides in vivo evidence that the inositol phosphates/Ca²⁺ cascade mediates TSH action on thyroid hormone synthesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Jul;92(7):2816-20.
11. **Van Sande J, Dequanter D, Lothaire P, Massart C, Dumont JE, Erneux C.** Thyrotropin stimulates the generation of inositol 1,4,5-trisphosphate in human thyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Mar;91(3):1099-107.
12. **Kero J, Ahmed K, Wettschureck N, et al.** Thyrocyte-specific Gq/G11 deficiency impairs thyroid function and prevents goiter development. *J Clin Invest.* 2007 Sep;117(9):2399-407.
13. **Biebermann H, Winkler F, Kleinau G.** Genetic defects, thyroid growth and malfunctions of the TSHR in pediatric patients. *Front Biosci.* 2010;15:913-33.
14. **Parma J, Duprez L, Van Sande J, et al.** Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature.* 1993 Oct 14;365(6447):649-51.
15. **Supornsilchai V, Sahakitrungruang T, Wongjitrat N, Wacharasindhu S, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V.** Expanding clinical spectrum of non-autoimmune hyperthyroidism due to an activating germline mutation, p.M453T, in the thyrotropin receptor gene. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2009 Apr;70(4):623-8.
16. **Duprez L, Parma J, Van Sande J, et al.** Germline mutations in the thyrotropin receptor gene cause non-autoimmune autosomal dominant hyperthyroidism. *Nat Genet.* 1994 Jul;7(3):396-401.

17. **Neumann S, Krause G, Chey S, Paschke R.** A free carboxylate oxygen in the side chain of position 674 in transmembrane domain 7 is necessary for TSH receptor activation. *Mol Endocrinol.* 2001 Aug;15(8):1294-305.
18. **Parma J, Van Sande J, Swillens S, Tonacchera M, Dumont J, Vassart G.** Somatic mutations causing constitutive activity of the thyrotropin receptor are the major cause of hyperfunctioning thyroid adenomas: identification of additional mutations activating both the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and inositol phosphate-Ca²⁺ cascades. *Mol Endocrinol.* 1995 Jun;9(6):725-33.
19. **Biebermann H, Gruters A, Schoneberg T, Gudermann T.** Congenital hypothyroidism caused by mutations in the thyrotropin-receptor gene. *N Engl J Med.* 1997 May 8;336(19):1390-1.
20. **Latif R, Graves P, Davies TF.** Oligomerization of the human thyrotropin receptor: fluorescent protein-tagged hTSHR reveals post-translational complexes. *J Biol Chem.* 2001 Nov 30;276(48):45217-24.
21. **Davies TF, Ando T, Lin RY, Tomer Y, Latif R.** Thyrotropin receptor-associated diseases: from adenomata to Graves disease. *J Clin Invest.* 2005 Aug;115(8):1972-83.
22. **Persani L, Calebiro D, Bonomi M.** Technology Insight: modern methods to monitor protein-protein interactions reveal functional TSH receptor oligomerization. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2007 Feb;3(2):180-90.
23. **Urizar E, Montanelli L, Loy T, et al.** Glycoprotein hormone receptors: link between receptor homodimerization and negative cooperativity. *EMBO J.* 2005 Jun 1;24(11):1954-64.
24. **Kursawe R, Paschke R.** Modulation of TSHR signaling by posttranslational modifications. *Trends Endocrinol Metab.* 2007 Jul;18(5):199-207.
25. **Clifton-Bligh RJ, Gregory JW, Ludgate M, et al.** Two novel mutations in the thyrotropin (TSH) receptor gene in a child with resistance to TSH. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Apr;82(4):1094-100.
26. **Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:263-73.
27. **Aaij C, Borst P.** The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta.* 1972 May 10;269(2):192-200.
28. **Heckman KL, Pease LR.** Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat Protoc.* 2007;2(4):924-32.
29. **Sanger F, Air GM, Barrell BG, et al.** Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature.* 1977 Feb 24;265(5596):687-95.
30. **Cohen SN, Chang AC, Hsu L.** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972 Aug;69(8):2110-4.
31. **Tarnow P, Rediger A, Brumm H, et al.** A heterozygous mutation in the third transmembrane domain causes a dominant-negative effect on signaling capability of the MC4R. *Obes Facts.* 2008;1(3):155-62.
32. **Winkler F, Kleinau G, Tarnow P, et al.** A New Phenotype of Nongoitrous and Nonautoimmune Hyperthyroidism Caused by a Heterozygous Thyrotropin Receptor Mutation in Transmembrane Helix 6. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 May 25.

33. **Biebermann H, Schoneberg T, Hess C, Germak J, Gudermann T, Gruters A.** The first activating TSH receptor mutation in transmembrane domain 1 identified in a family with nonautoimmune hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Sep;86(9):4429-33.
34. **Staubert C, Tarnow P, Brumm H, et al.** Evolutionary aspects in evaluating mutations in the melanocortin 4 receptor. *Endocrinology.* 2007 Oct;148(10):4642-8.
35. **Akcurin S, Turkkahraman D, Tysoe C, et al.** A family with a novel TSH receptor activating germline mutation (p.Ala485Val). *Eur J Pediatr.* 2008 Nov;167(11):1231-7.
36. **Kleinau G, Jaeschke H, Worth CL, et al.** Principles and determinants of G-protein coupling by the rhodopsin-like thyrotropin receptor. *PLoS One.* 5(3):e9745.
37. **Peeters MC, van Westen GJ, Guo D, et al.** GPCR structure and activation: an essential role for the first extracellular loop in activating the adenosine A2B receptor. *FASEB J.* Feb;25(2):632-43.
38. **Peeters MC, van Westen GJ, Li Q, Ijzerman AP.** Importance of the extracellular loops in G protein-coupled receptors for ligand recognition and receptor activation. *Trends Pharmacol Sci.* Jan;32(1):35-42.
39. **Maggio R, Vogel Z, Wess J.** Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular "cross-talk" between G-protein-linked receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Apr 1;90(7):3103-7.
40. **Williams Textbook of Endocrinology;** Henry M. Kronenberg, Shlomo Melmed, Kenneth S. Polonsky; Erschienen bei: Saunders W B Co; 11. Edition, Oktober 2007

8. Anteilserklärung

Grundlage für die kumulative Promotionsarbeit von Frau Franziska Winkler sind folgende Publikationen:

- 1 H Biebermann, **F Winkler**, D Handke, A Grütters, H Krude, G Kleinau
Molecular description of non-autoimmune hyperthyroidism at a neonate caused by a new thyrotropin receptor germline mutation.
Thyroid Research 2011 Aug 3; 4 Suppl 1:S8

33 Prozent

Frau Winkler hatte einen großen Anteil an den experimentellen Arbeiten sowie deren detaillierter Auswertungen. Die Abbildung 1 wurde gänzlich von ihr erstellt. An der Ausarbeitung des Manuskriptes hat Frau Winkler mitgewirkt.

- 2 **F Winkler**, G Kleinau, P Tarnow, L Grohmann, I Gaetjens, D L'Allemand, A Grütters, G Krause, H Krude, H Biebermann
A new phenotype of nongoitrous and nonautoimmune hyperthyroidism caused by a heterozygous thyrotropin receptor mutation in transmembrane helix 6.
Journal of Clinical Endocrinology and Metababolism 2010 Aug; 95(8):3605-10

65 Prozent

Frau Winkler war maßgeblich am Versuchsaufbau, Versuchsdurchführung und der statistische Auswertung beteiligt. Die Abbildung 1 wurde vollends von ihr erstellt. Bei der Anfertigung und Einreichung des Manuskriptes hat sie anteilig mitgewirkt.

- 3 Biebermann H, **Winkler F**, Handke D, Teichmann A, Gerling B, Cameron F, Eichhorst J, Grütters A, Wiesner B, Kühnen P, Krude H, Kleinau G
New Pathogenic Thyrotropin Receptor Mutations Decipher Differentiated Activity Switching at a Conserved Helix 6 Motif of Family A GPCR.
Journal of Clinical Endocrinology and Metababolism 2012 Feb; 97(2):E228-32

25 Prozent

Frau Winkler hatte 50%igen Anteil an den experimentellen Arbeiten sowie deren detaillierter Auswertungen. Die Abbildungen 1A, 1B und 4 sowie die Tabelle 1 hat Frau Winkler erstellt. Bei der Anfertigung des Manuskriptes hat sie anteilig mitgewirkt.

Franziska Winkler

PD Dr. H. Biebermann

9. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10. Publikationsliste

- 1 H Biebermann, **F Winkler**, D Handke, A Grütters, H Krude, G Kleinau
Genetic defects, thyroid growth and malfunctions of the TSHR in pediatric patients.
Frontiers in Bioscience 2010 Jun 1;15:913-33
- 2 **F Winkler**, G Kleinau, P Tarnow, L Grohmann, I Gaetjens, D L'Allemand, A Grütters, G Krause, H Krude, H Biebermann
A new phenotype of nongoitrous and nonautoimmune hyperthyroidism caused by a heterozygous thyrotropin receptor mutation in transmembrane helix 6.
Journal of Clinical Endocrinology and Metababolism 2010 Aug; 95(8):3605-10
- 3 H Biebermann, **F Winkler**, A Grütters, H Krude, G Kleinau
Molecular description of non-autoimmune hyperthyroidism at a neonate caused by a new thyrotropin receptor germline mutation.
Thyroid Research 2011 Aug 3; 4 Suppl 1:S8
- 4 Calebiro D, Gelmini G, Cordella D, Bonomi M, **Winkler F**, Biebermann H, de Marco A, Van Durme J, Marelli F, Libri D, Antonica F, Vigone M.C., Cappa M, Mian C, Sartorio A, Beck-Peccoz P, Radetti G, Weber G, Persani L
Frequent TSH receptor genetic alterations with variable signaling impairment in a large series of children with non-autoimmune isolated hyperthyrotropinemia.
Journal of Clinical Endocrinology and Metababolism 2012 Jan; 97(1):E156-60
- 5 Biebermann H, **Winkler F**, Handke D, Teichmann A, Gerling B, Cameron F, Eichhorst J, Grütters A, Wiesner B, Kühnen P, Krude H, Kleinau G
New Pathogenic Thyrotropin Receptor Mutations Decipher Differentiated Activity Switching at a Conserved Helix 6 Motif of Family A GPCR.
Journal of Clinical Endocrinology and Metababolism 2012 Feb; 97(2):E228-32

11. Selbstständigkeitserklärung

„Ich, Franziska Winkler, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Nicht-autoimmune Hyperthyreose: „Neue Einblicke in Struktur und Funktion des Thyreotropin Rezeptors durch die Charakterisierung natürlich vorkommender Mutationen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 22.02.2012

Franziska Winkler

12. Danksagung

Diese Arbeit beruht auf Forschungsarbeiten, die am Institut für experimentelle pädiatrische Endokrinologie der Charité Berlin in Zusammenarbeit mit dem Institut für molekulare Pharmakologie (FMP) durchgeführt wurden. Deshalb möchte ich mich zum Abschluss bei allen bedanken, die mich in den letzten Jahren unterstützt haben.

Frau PD Dr. Heike Biebermann und Herrn Dr. Gunnar Kleinau danke ich herzlich für die gemeinsame interessante Themenfindung, sowie für die gute Betreuung und tatkräftige Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Bei Frau Prof. Dr. Annette Grüters und Herrn Prof. Dr. Heiko Krude möchte ich mich für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und Bereitstellung der Patientendaten bedanken.

Prof. Dr. Josef Köhrle danke ich für die Assoziation im Graduierten Kolleg 1208, für die Vermittlung des endokrinologischen Grundlagenwissens und für die Betreuung meiner Arbeit als Co-Mentor.

Ebenso danke ich auch Herrn Dr. Gerd Krause vom FMP, der mir als kompetenter Ansprechpartner auf dem Gebiet der GPCRs zur Verfügung stand.

Ein spezieller Dank geht an alle Mitarbeiter des Instituts für die sehr gute Zusammenarbeit und die angenehme und schöpferische Atmosphäre. Das gilt besonders für Leonie, deren Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft mir von Anfang an eine große Unterstützung war. Auch bei Anne, Daniela, Daniela, Inge, Jessica, Juliane, Mona und Pamela möchte ich für die produktive und schöne gemeinsame Forschungszeit bedanken. Ich bin gespannt, was die Zukunft für uns alle bereit hält. Gleichzeitig danke ich Agnes, Cigdem, Marc, Peter, Rita und Sabine, die mit ihren vielen praktischen und organisatorischen Ratschlägen zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Ein riesiges Dankeschön gilt meinen Eltern, Großeltern, meiner Schwester und ihrer kleinen Familie, die mich nun schon seit 8 Jahren auf meinem wissenschaftlichen Werdegang begleiten und mir stets viel Interesse, Unterstützung, und vor allem 100%igen Rückhalt schenken.