

# **Struktur-Funktions-Untersuchungen zur Hinge-Region in Glykoproteinhoromon-Rezeptoren**

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

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Paul Grzesik

aus Wroclaw

Berlin, 2013



Diese Arbeit wurde von September 2008 bis März 2013 unter der Leitung von Dr. Gerd Krause am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie angefertigt.

1. Gutachter: Dr. Gerd Krause

2. Gutachter: Prof. Dr. Hartmut Oschkinat

Disputation am 28.08.2013



## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie in Berlin-Buch, in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Gerd Krause angefertigt.

Ich möchte mich zu allererst bei Herrn Dr. Gerd Krause für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit, seine wissenschaftliche Unterstützung und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Hartmut Oschkinat danke ich für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit in der Abteilung Strukturbioogie und die Übernahme des Gutachtens.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn PD Dr. Ralf Schüle in für die Möglichkeit der Mitarbeit in seiner Arbeitsgruppe, sowie für die gute wissenschaftliche Beratung.

Ein besonderer Dank geht an Frau Dr. Anne Diehl und Frau Dr. Claudia Rutz für die sehr freundliche Aufnahme in ihr Laborteam, die sehr gute Betreuung und die vielen anregenden wissenschaftlichen Diskussionen.

Bei Herrn Dr. Jens Furkert und Frau Dr. Anke Teichmann möchte ich mich sehr herzlich für die Hilfe bei der experimentellen Durchführung, der Datenauswertung und die vielen anregenden Diskussionen über die experimentelle Umsetzung bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Gunnar Kleinau für die fachkundige Unterstützung, das stetige Interesse an meiner Arbeit sowie die gute Zusammenarbeit.

Der Arbeitsgruppe um Herrn Dr. Peter Schmieder und insbesondere Frau Brigitte Schlegel danke ich für die Aufnahme und Bereitstellung der NMR-Spektren.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Burkhard Wiesner danke ich herzlich für die Möglichkeit der Messung in ihrem Mikroskopie-Labor und die stetige Hilfsbereitschaft.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Darren Hart und seinem Team am EMBL in Grenoble, für die Möglichkeit des Aufenthalts und der Durchführung der Experimente in dessen Labor bedanken. In diesem Zusammenhang danke ich Frau Dr. Anne Diehl sehr herzlich für das hohe Engagement bei diesem Projekt.

Der gesamten Arbeitsgruppe Krause danke ich für die vielen schönen Momente am Institut sowie für die sehr freundschaftliche und familiäre Atmosphäre.

Darüber hinaus danke ich allen hier nicht namentlich genannten Kolleginnen und Kollegen für die alltägliche Unterstützung und ihre Hilfsbereitschaft.

Im besonderen Maße möchte ich mich bei meiner Familie, bei meinen Eltern und vor allem bei meiner Frau für den stetigen Rückhalt bedanken. Ohne ihre Unterstützung wäre die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>Summary.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>7</b>
2.1 Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR).....	7
2.2 Die Glykoprotein-hormon-Rezeptoren (GPHR).....	9
2.3 Die Topologie und Struktur der GPHR.....	11
2.3.1 Die <i>Leucine-rich repeat</i> Domäne (LRRD) .....	13
2.3.2 Die transmembranäre Serpentin-domäne (SD).....	14
2.3.3 Die Hinge-Region.....	15
2.4 Die Signalisierungseigenschaften der GPHR .....	20
2.4.1 Rezeptoraktivierung und Modulation .....	20
2.4.2 Rezeptoroligomerisierung und intermolekulare Kooperativität.....	23
<b>3. Zielsetzung .....</b>	<b>26</b>
<b>4. Material &amp; Methoden .....</b>	<b>29</b>
4.1 Material.....	29
4.1.1 Reagenzien .....	29
4.1.2 Geräte .....	30
4.1.3 Kits.....	31
4.1.4 Antikörper .....	31
4.1.5 Software.....	32
4.2 Oligonukleotide.....	32
4.3 Puffer und Lösungen .....	33
4.4 Plasmide.....	33
4.5 Organismen.....	35
4.6 Allgemeine Methoden .....	36
4.6.1 Molekularbiologische Methoden .....	36
4.6.1.1 Präparation von Plasmid-DNA .....	36
4.6.1.2 Präparation von genomischer DNA aus <i>Pichia pastoris</i> ( <i>P. pastoris</i> ) .....	36
4.6.1.3 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	37
4.6.1.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	37
4.6.1.5 Nukleinsäureaufreinigung .....	37
4.6.1.6 Restriktionsverdau und Ligation von Plasmid-DNA .....	37
4.6.1.7 Sequenzierung .....	37
4.6.1.8 <i>Polymerase chain reaction</i> (PCR).....	38
4.6.1.9 <i>Splicing by overlap extension PCR</i> (SOE-PCR).....	38
4.6.1.10 Zielgerichtete Mutagenese.....	39
4.6.1.11 Kolonie-PCR .....	40
4.6.2 Mikrobiologische Methoden.....	40
4.6.2.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) .....	40

4.6.2.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> .....	41
4.6.2.3	Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i> .....	41
4.6.2.4	Herstellung chemisch kompetenter <i>P. pastoris</i> .....	42
4.6.2.5	Transformation kompetenter <i>P. pastoris</i> .....	42
4.6.2.6	Determinierung des <i>P. pastoris</i> X-33 Phänotyps Mut <sup>+</sup> / Mut <sup>s</sup> .....	43
4.6.2.7	Selektion von <i>P. pastoris</i> X-33 <i>multicopy</i> Transformanten.....	43
4.6.2.8	Heterologe Proteinexpression in <i>P. pastoris</i> .....	43
4.6.3	Zellbiologische Methoden.....	44
4.6.3.1	Kultivierung von HEK 293-Zellen .....	44
4.6.3.2	Transiente Transfektion von HEK 293-Zellen.....	44
4.6.3.3	Durchflusszytometrie (FACS) .....	45
4.6.4	Pharmakologische Methoden .....	45
4.6.4.1	cAMP-Akkumulations-Assay .....	45
4.6.5	Mikroskopische Methoden .....	47
4.6.5.1	Konfokale Laser-scanning -Mikroskopie (LSM) .....	47
4.6.5.2	Membranquantifizierung.....	47
4.6.5.3	Fluorescence cross-correlation-Spektroskopie (FCCS) .....	48
4.6.6	Proteinchemische Methoden.....	49
4.6.6.1	Proteinpräparation für die strukturellen Voruntersuchungen .....	49
4.6.6.2	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	50
4.6.6.3	SDS-PAGE .....	51
4.6.6.4	Proteinnachweis mittels Immunoblot (Western Blot).....	52
4.7	<i>Expression of Soluble Proteins by Random Incremental Truncation System (ESPRIT-System)</i> .....	53
4.7.1	Generierung der DNA-Konstruktbibliothek.....	53
4.7.2	Transformation der DNA-Konstruktbibliothek in BL21 ( <i>DE3</i> )-Bakterien.....	55
4.7.3	Überführung der Bakterienkolonien auf die Nitrozellulosemembran und Replikation .....	55
4.7.4	Detektion des Membran-Scans .....	56
4.7.5	Expressionstest der validierten Bakterienklone.....	57
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>58</b>
5.1	Heterologe Expression der Hinge-Region des humanen Thyreotropinrezeptors (TSHR) für weiterführende Strukturuntersuchungen.....	58
5.1.1	Herstellung geeigneter Hinge-Region-Konstrukte des TSHR für die heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i> .....	58
5.1.2	Expressionsvektoren für die zytosolische Proteinexpression in <i>E. coli</i> .....	59
5.1.3	Expressionsvektoren für die periplasmatische Proteinexpression in <i>E. coli</i> .....	59
5.1.4	Expressionsstudien der Hinge-Region-Konstrukte des TSHR in <i>E. coli</i> .....	60
5.1.5	Herstellung geeigneter Hinge-Region-Konstrukte für die heterologe Proteinexpression in <i>P. pastoris</i> .....	61
5.1.6	Expressionsstudien der Hinge-Region-Konstrukte des TSHR in <i>P. pastoris</i> .....	62
5.1.7	Das <i>ESPRIT</i> -System und dessen Anwendung auf die Hinge-Region des TSHR zur Auffindung stabiler Proteinkonstrukte .....	62
5.1.7.1	Generierung der TSHR Hinge-Region-DNA-Konstruktbibliothek .....	63
5.1.7.2	Primärscreen der Hinge-Region-DNA-Konstruktbibliothek .....	65
5.1.7.3	Sekundärscreen und Validierung der Hinge-Region-Konstrukte .....	67
5.1.7.4	Heterologe Proteinexpression und Proteinpräparation des TSHR Hinge-Region-Konstrukts <i>ESPRIT</i> -4CED in <i>E. coli</i> .....	68

5.2	Struktur-Funktions-Untersuchungen an der Hinge-Region des humanen Lutropinrezeptors (LHR) .....	71
5.2.1	Herstellung von LHR-Mutanten für zellbiologische Untersuchungen.....	71
5.2.2	Partiell defiziente LHR-Mutanten.....	71
5.2.3	Untersuchung zur intra-und intermolekularen Rezeptoraktivierung am LHR .....	73
5.2.3.1	Oberflächenexpression und Kolo-kalisation der partiell defizienten LHR-Mutanten.....	73
5.2.3.2	Oligomerisierung der LHR-Mutanten .....	74
5.2.3.3	Intermolekulare Signalisierungseigenschaften kotransfizierter LHR-Konstrukte.....	76
5.2.4	Generierung der Rezeptor-Mutanten zur Struktur-Funktions-Studie an der Hinge-Region des LHR ..	80
5.2.4.1	Oberflächenexpression und Kolo-kalisation der für die Strukturuntersuchung verwendeten LHR-Mutanten .....	81
5.2.4.2	Signalisierungseigenschaften der LHR-Polyalaninblock- und -Prolin-Konstrukte.....	82
<b>6.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>84</b>
6.1	Die Hinge-Region, ein nicht strukturautonomer signalisierungssensitiver Bereich der GPHR .....	84
6.1.1	Expressionsstudien zur Isolierung eines TSHR Hinge-Region-Fragments für strukturelle Voruntersuchungen .....	84
6.1.2	Die Konstruktauswahl mittels <i>ESPRIT</i> -Systems ermöglicht eine verbesserte Proteinstabilität .....	87
6.2	Struktur-Funktions- Studien an der Hinge-Region des LHR liefern neue Erkenntnisse zum Aktivierungsmechanismus der GPHR.....	91
6.2.1	Untersuchungen der intra-und intermolekularen Signalisierungseigenschaften des LHR decken unterschiedliche Aktivierungsprofile bei LH- und CG-Stimulation auf.....	91
6.2.2	Strukturelemente im signalisierungssensitiven Exon10-Bereich fungieren als strukturelle Plattform für die CG-vermittelte Signalamplifikation.....	100
<b>7.</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>108</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>120</b>
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	120
8.2	Abkürzung der Aminosäuren .....	123
8.3	Themenrelevante Publikationen, Vorträge, Poster und Abstracts .....	124
8.3.1	Themenrelevante Publikationen.....	124
8.3.2	Vorträge .....	124
8.3.3	Poster und Abstracts .....	124
<b>9.</b>	<b>Erklärung.....</b>	<b>125</b>



### 1. Zusammenfassung

Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) stellen eine konservierte Gruppe von membranständigen, signalvermittelnden Proteinen beim Menschen dar. Die größte Hauptklasse der GPCR bilden die rhodopsinähnlichen Rezeptoren. Zu der sogenannten Familie-A der GPCR gehören auch der Thyreotropinrezeptor (TSHR), der Follitropinrezeptor (FSHR) und der Lutropinrezeptor (LHR). Diese drei Rezeptoren werden unter dem Subtyp der Glykoproteinrezeptoren (GPHR) zusammengefasst. Neben der aus 7 Helizes zusammengesetzten transmembranären Serpentin-domäne (SD), die allen GPCR gemeinsam ist, sind die GPHR durch einen großen extrazellulären Bereich gekennzeichnet. Dieser besteht aus der ligandbindenden *leucine-rich repeat* Domäne (LRRD) und der Hinge-Region. Diese aus etwa 100 bis 120 Aminosäuren bestehende Region verbindet die LRRD und die SD und spielt eine bedeutende Rolle bei der Signalvermittlung. Physiologisch greifen die GPHR und deren Hormone in die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse (TSHR) bzw. in die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse (FSHR und LHR) ein, in welcher sie an der Regulation der Schilddrüsenfunktion bzw. der gonadalen Reifung beteiligt sind. Krankheiten, die im Zusammenhang mit endokrinen Störungen stehen, sind häufig mit der Fehlfunktion der entsprechenden GPHR assoziiert. Die Untersuchung genetischer Veränderungen in der Hinge-Region mit selektiver Störung der Rezeptoraktivität dient in der vorliegenden Arbeit als ein Ausgangspunkt, um die Ursachen der funktionalen Beeinflussung und die unklaren Mechanismen der Signalvermittlung auf molekularer Ebene zu verstehen.

Es ist bekannt, dass die GPHR in einem oligomeren Verbund als Signalisierungseinheit funktionieren. Funktionelle Daten deuten darauf hin, dass die Weiterleitung der Rezeptorsignalisierung über intermolekulare Interaktionen mit benachbarten Protomeren und den endogenen Liganden vermittelt wird. Dabei wird eine Beteiligung der Hinge-Region an den oben genannten kooperativen Effekten vermutet. Die Rezeptoraktivierung und Signalweiterleitung stellen somit einen komplexen Prozess dar, welcher den Einbezug der Hinge-Region fordert und welcher mit der bisher gängigen Betrachtung monomerer Rezeptoren nicht ausreichend beschrieben wird. Um die ablaufenden Prozesse während der intra- bzw. intermolekularen Signalisierung mechanistisch zu verstehen, ist es notwendig, die Struktur-Funktions-Zusammenhänge innerhalb der Hinge-Region zu beschreiben. Dies scheiterte bisher an den experimentell wenig zugänglichen strukturellen Informationen über die Hinge-Region der GPHR.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf drei Schwerpunkte. Einer besteht darin, das strukturelle Profil der Hinge-Region der GPHR zu erfassen und zu klären, ob es

sich bei der Hinge-Region um einen strukturautonomen Bereich mit definierten Strukturelementen handelt oder ob die strukturelle Ausrichtung der Hinge-Region intrinsisch durch räumliche intra- und intermolekulare Interaktion mit benachbarten Elementen erfolgt. Grundlage für diese Untersuchung bildeten Expressionsstudien, die zum Ziel hatten, Hinge-Region-Fragmente darzustellen, die sich für weiterführende strukturelle Untersuchungen eignen. Den Ausgangspunkt für die Generierung der Hinge-Region-Fragmente bildeten Sequenz- und Sekundärstrukturanalysen der TSHR Hinge-Region. In einem weiteren Schritt wurden unterschiedliche Expressionsstrategien, nämlich die Anwendung von funktionalen Fusionsproteinen und unterschiedliche Lokalisation des Zielproteins, sowie verschiedene Expressionswirte (*E. coli* und *P. pastoris*) genutzt, um ein geeignetes Hinge-Region-Konstrukt zu isolieren. Für breiter angelegte Expressionsstudien wurde ein konstruktbibliothekbasierendes Hochdurchsatz-Screening (*Expression of soluble proteins by random incremental truncation (ESPRIT)*) angewandt, welches es ermöglichte, aus einer eigens für die Hinge-Region generierten Konstruktbibliothek mit über 25.000 Konstrukten eine verbesserte Auswahl an stabilen Hinge-Region-Fragmenten für die weitere Proteinpräparation zu treffen. Erst die durch das *ESPRIT*-System aufgefundenen Hinge-Region-Konstrukte, welche eine stark verbesserte Stabilität aufwiesen, ermöglichten die Durchführung erster struktureller Voruntersuchungen. Dabei konnte festgestellt werden, dass es sich bei der Hinge-Region um einen sequentiellen Bereich der GPHR handelt, welcher nicht als isolierte strukturautonome Domäne darstellbar ist. Dies lässt vermuten, dass die Hinge-Region, welche direkt an die LRRD und an die SD grenzt, für die Ausbildung einer aktiven Konformation zusätzliche stabilisierende intra- oder sogar intermolekulare Kontakte mit benachbarten Strukturelementen benötigt.

Ergänzend dazu wurde ein zweiter Schwerpunkt bearbeitet, dessen Ziel es war, Struktur-Funktions-Zusammenhänge der Hinge-Region während der hormon-induzierten Rezeptoraktivierung zu analysieren. Im Besonderen wurden die funktionellen Unterschiede des humanen LHR, der durch die beiden humanen Hormone Lutropin (LH) und Choriogonadotropin (CG) stimuliert werden kann, beleuchtet. Es ist bekannt, dass beide Hormone unterschiedliche Sensitivitäten aufweisen und unterschiedliche Signalkaskaden (PKA durch CG und ERK1/2 durch LH) anstoßen. Eingangs wurde vermutet, dass die Unterschiede zwischen LH- und CG-induzierter Rezeptorsignalisierung im Zusammenhang mit sequentiellen Abschnitten der Hinge-Region stehen. Als Ausgangspunkt der Untersuchungen stand eine natürlich vorkommende LHR-Mutante, die eine Deletion eines Bereichs von 27 Aminosäuren (Exon10) innerhalb der Hinge-Region aufwies. Diese Mutation führte zu veränderten Signalisierungseigenschaften bei LH-Stimulation. Um die

mechanistischen Unterschiede sowie die molekulare Ursache der Rezeptorfehlfunktion aufzuklären, wurden durch Einführung von Mutationen in den wildtypischen Rezeptor potentielle Strukturelemente innerhalb der Hinge-Region imitiert (Alaninblockmutationen) bzw. gestört (Prolinmutationen) und die resultierenden Effekte in zellbiologischen Studien begutachtet. Unter diesem Aspekt konnten mit Hilfe eines Polyalaninblock-Scans zwei potentielle Strukturelemente sowie ein signalisierungssensitiver Bereich (Tyr331-Region) innerhalb der Hinge-Region gefunden werden, welche im direkten Zusammenhang mit dem Mechanismus der hormoninduzierten Rezeptoraktivierung stehen. Das potentielle Strukturelement des exponierten Exon10-Bereichs interagiert dabei mit dem CG, während die korrekte LH-induzierte Rezeptorfunktion maßgeblich von der signalisierungssensitiven Tyr331-Region abhängig ist. Da Prolinmutationen und nicht Alaninmutationen zur funktionellen Beeinflussung des LHR führten, ist aus den Daten zu schließen, dass potentielle Strukturelemente anstatt spezifischer Seitenketteneigenschaften für die Signalübertragung in diesem Bereich der Hinge-Region verantwortlich sind. Diese Daten unterstützen die Beobachtung anderer Gruppen, dass die Hinge-Regionen in den GPHR trotz unterschiedlicher funktioneller Ausrichtung bis zu einem gewissen Grad untereinander austauschbar sind.

Der dritte Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bestand darin zu untersuchen, ob die Hinge-Region einen Einfluss auf die kooperativen Effekte während der Rezeptoraktivierung hat. Ausgangspunkt dieser Studien war ebenfalls der LHR, von dem bekannt ist, dass er als Signalisierungseinheit in einem oligomeren Verbund funktioniert und bei dem funktionelle Unterschiede zwischen der LH- und der CG-vermittelten Rezeptoraktivierung beobachtet wurden. Unklar war bisher jedoch, ob zwischen den unterschiedlichen Aktivierungsprofilen beider Hormone und der intermolekularen Kooperativität ein Zusammenhang besteht und inwieweit die Hinge-Region bei diesen Prozessen involviert ist. Um diese Frage zu beantworten, wurde innerhalb der Studie auf die oben genannte LHR-Exon10-Deletionsmutante zurückgegriffen, bei der im Gegensatz zur CG-Stimulation, eine Störung der LH-vermittelten intermolekularen Kooperativität vermutet wurde, welche durch die Deletion des signalisierungssensitiven Bereichs (Exon10) zustande kommt. Die ursprüngliche Hypothese, dass die Deletion des Exon10-Bereichs zu einer inhibierten intermolekularen Rezeptoraktivierung führt, während der CG-induzierte intermolekulare Aktivierungsmechanismus unbeeinflusst bleibt, musste revidiert werden. Ergänzend dazu konnte durch Oligomerisierungsstudien mittels *fluorescence cross-correlation spectroscopy* (FCCS) ein Einfluss des Exon10-Bereichs auf die Rezeptoroligomerisierung ausgeschlossen werden. Die Untersuchung der intermolekularen Rezeptoraktivierung, bei der eine

signalisierungsdefekte mit einer hormonbindungsdefekten LHR-Mutante kombiniert wurde, zeigte bei Verwendung von Konstrukten mit intakter Hinge-Region einen unterschiedlichen Aktivierungsmechanismus für die LH- und CG-Induktion. Während bei CG-Stimulation eine intermolekulare Rezeptoraktivierung (Trans-Aktivierung) nachgewiesen wurde, konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Rezeptoraktivierung bei LH-Stimulation ausschließlich intramolekular verläuft (Cis-Aktivierung). Diese Daten belegen, dass bei Stimulation des LHR unterschiedliche Aktivierungsmechanismen initiiert werden können, welche vom jeweiligen Hormon abhängig sind. Während bei der LH-induzierten intramolekularen Rezeptoraktivierung strukturelle Voraussetzungen des Exon10-Bereichs vorgegeben sein müssen, ist bei der intermolekularen LHR-Aktivierung durch CG eine Überbrückung des fehlenden Exon10-Bereichs möglich. Die Fehlfunktion der LHR-Deletionsmutante kann somit durch den Einbezug beider Aktivierungsmechanismen plausibel erklärt werden.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig das strukturelle Profil der Hinge-Region des humanen TSHR und des LHR untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Hinge-Region funktionell essentielle strukturierte Abschnitte aufweist, diese jedoch aber nicht strukturautonom als Domäne vorliegen. Vielmehr führen intra- und intermolekulare Kontakte von benachbarten Domänen zur Ausbildung aktiver Konformationen, welche zur Signalamplifikation führen. Weiterhin konnten zwei potentiell helikale Strukturelemente sowie eine signalisierungssensitive Region innerhalb der LHR Hinge-Region gefunden werden, welche offensichtlich in unterschiedlicher Weise mit den Hormonen LH und CG interagieren. Es konnte durch Mutationen und Deletionen gezeigt werden, dass in diesem Teil der Hinge-Region nicht spezifische Aminosäureeigenschaften, sondern eher die Strukturelemente funktionsrelevant sind und im Fall einer Störung (Deletion) strukturelle Funktionen im Signalisierungsmechanismus kompensiert werden. Für den LHR konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass für die beiden Hormone unterschiedliche molekulare Aktivierungsmechanismen im Zusammenhang mit der Hinge-Region vorliegen. Dabei wurde die intramolekulare Aktivierung durch LH- und die intermolekulare Aktivierung durch CG-Stimulation nachgewiesen. Die beleuchteten molekularen Determinanten für die Rezeptoraktivierung liefern ebenfalls eine plausible Erklärung für die Fehlfunktion der Exon10-deletierten LHR-Mutante. Diese Arbeit zur Hinge-Region der GPHR bietet somit eine Grundlage für die Formulierung eines erweiterten Aktivierungsmodells für den LHR unter Einbezug kooperativer Effekte und beschreibt zum ersten Mal den Einfluss der Hinge-Region in dem ablaufenden Aktivierungsprozess.

### Summary

The G-protein coupled receptors (GPCR) comprise a large superfamily of signal mediating membrane bound proteins in mammalian genomes. Together with the thyroid stimulating hormone receptor (TSHR), the follitropin receptor (FSHR) and the lutropin receptor (LHR) constitutes the subgroup of glycoprotein-hormone receptors (GPHR), which belongs to the largest subfamily of family A GPCR, the rhodopsin like GPCR. A specific feature of GPHR is the large N-terminal extracellular region which interacts with the hormone and can be subdivided into two parts, the leucine-rich repeat domain (LRRD) and the hinge region, which is a key participant for signal transduction and connects the LRRD and the transmembrane spanning region (SD). The importance of the GPHR function is demonstrated by naturally occurring mutations, linked to specific disorders of the thyroid gland or the gonadal function. Mutations within the hinge region leading to receptor dysfunction are used in this work to elucidate open questions on the receptor activation mechanism on the molecular level.

The GPHR acts as signaling units in an oligomeric composition. Functional data indicate that the signal transduction is mediated by intermolecular interaction of the receptor with their neighboring protomers and endogenous ligands. It is also speculated that the intermolecular cooperativity is mainly influenced by the hinge region. Thus the receptor activation represents a complex molecular process which is not fully understood yet. To understand the role of the hinge region in this process it is necessary to describe the structure-function relationship within this region during the signal initiation and transduction.

Since structural data of the hinge region are less accessible, one goal of this work is the exploration of its structural profile by structure-function studies. To reveal insights in the folding properties of extracellular TSHR fragments, different expression strategies and different expression systems (*E. coli* and *P. pastoris*) has been performed. For extensive expression studies a library based on high throughput-screens was performed, in which 25.000 TSHR hinge region fragments has been screened. Using this technology, TSHR hinge region fragments with an enhanced stability could be isolated and prepared for further structural investigations. Initial experiments revealed that the hinge region cannot be isolated as an autonomously self-folding domain. It is likely that the hinge region bordered in the TSHR by the LRRD and the SD needs additional parameters like tight intra- or intermolecular contact partners to achieve the correct fold.

A second goal is the elucidation of the structure-function relationship within the hinge region of the human lutropin receptor (LHR). To reveal the molecular reasons for the different signaling behavior between human lutropin (LH) and choriongonadotropin (CG) induced LHR activity, a natural occurring LHR mutant which lacks 27 amino acids (exon10) within the hinge region and in which LH but not CG signaling is inhibited, was investigated. Since proline but not alanine mutations impair the LHR function it is causative that signal transduction is mediated rather by two structural elements (likely helical) than by specific amino acid motifs. Moreover it could be shown, that the potential structure elements within the hinge region are compatible and therefore able to overtake functional properties in the case of structural disturbance of one of the structural elements. Different signaling behavior between LH and CG could also be assigned to the hinge region. Receptor activation mediated by sulfated tyrosine (Tyr331 region) is strongly related to LH induction. While LH mediated receptor activation is strongly related to the Tyr331 region and the deletion of exon10, CG activation is less dependent from the sulfated tyrosin Tyr331 and activates the receptor by interacting with the structural element within exon10 of the LHR hinge region. This data underline the observation that to a certain extend the hinge region is exchangeable among the different GPHR.

A third goal of this work is the elucidation of the intermolecular cooperativity effects during the activation of the LHR, to unravel the molecular differences in activation of LHR between both hormones LH and CG. For this purpose the reported LHR mutant lacking the signaling sensitive segment exon10 within the hinge region, has been investigated in an experimental setup, in which the combination of signal deficient LHR mutants and hormone binding deficient ones were tested for intermolecular receptor activation. The initial hypothesis, that the lack of exon10 might disturb the intermolecular receptor activation of LH, had to be revised, since a rescue of the signaling unit could not be achieved with LH even by use of LHR constructs containing the complete hinge region. Moreover fluorescence cross-correlation spectroscopy (FCCS) confirmed oligomerization in all combinations, excluding monomerization of LHR-delEx10 as reason for functional differences. Thus, the present data indicate that differences between LH and CG at LHR mutant lacking exon10 are unlikely to be related to modified intermolecular receptor activation. In conclusion, in this work it could be shown for the first time that LH may exclusively stimulate the targeted LHR by intramolecular activation, while CG is capable of inducing intermolecular activation too. This fits to recent findings that LHR is able to differentiate the activities of LH and CG and is involved in the activation of different pathways depending on its effector.

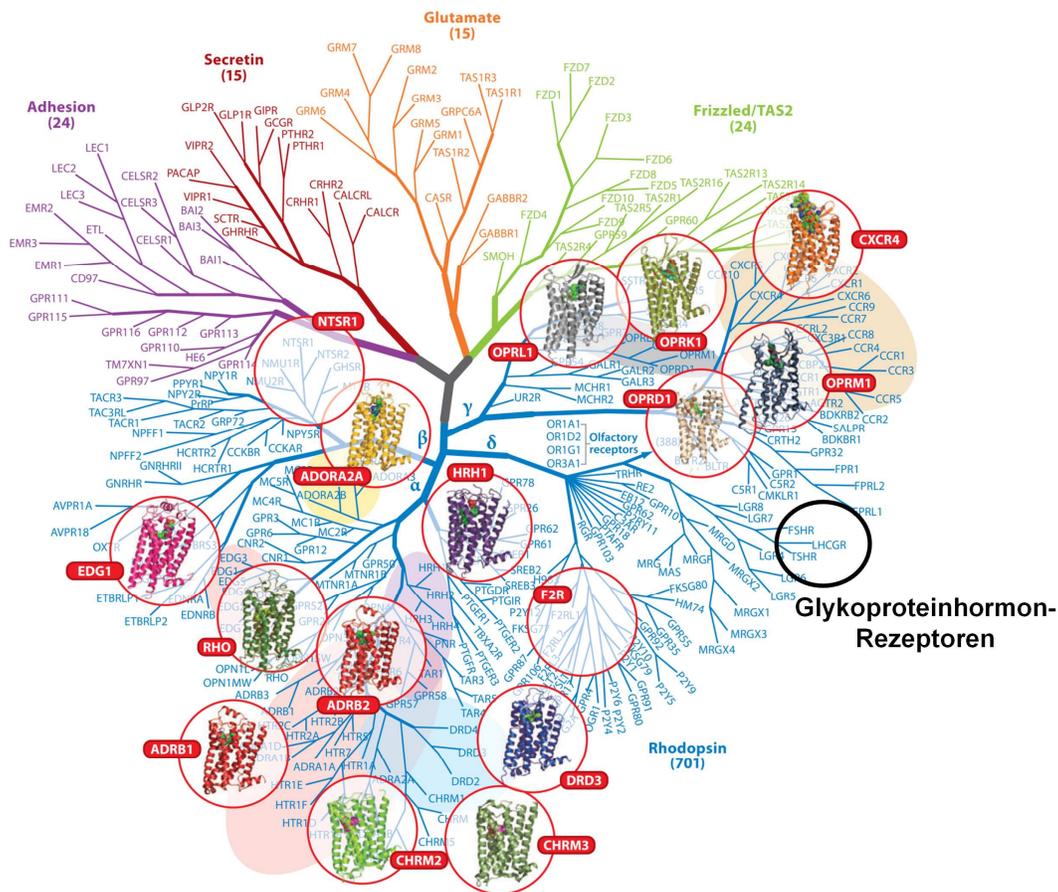
## 2. Einleitung

### 2.1 Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR)

Die GPCR stellen eine Klasse von signalvermittelnden Biomolekülen in eukaryotischen Zellen dar. Sie umfassen dabei die größte bekannte Gen-Superfamilie im menschlichen Genom und vermitteln etwa 80% der Signaltransduktion durch die Plasmamembran der Zellen (Jacoby et al., 2006; Millar and Newton, 2010).

Die extrazellulären Signale, die zur Aktivierung der GPCR führen, sind äußerst vielfältig. Ihre Diversität reicht von Photonen, Ionen, über biogene Amine, Purine, Pheromone und Peptide bis hin zu Proteinen, welche als Rezeptorliganden dienen (Katritch et al., 2012). Eine Fehlfunktion der GPCR führt in den meisten Fällen zu physiologischen Störungen und Krankheitsbildern (Misrahi et al., 1997; Schöneberg et al., 2004; Tao, 2006). Die GPCR bilden daher eine bevorzugte therapeutische Zielgruppe. Rund 30% aller vermarkteten Wirkstoffe sind auf die Manipulation der GPCR-Funktionalität in Form von signalauslösenden Agonisten oder inhibierenden Antagonisten bzw. inversen Agonisten abgestimmt (Jacoby et al., 2006; Millar and Newton, 2010). Zusätzlich konzentriert sich die moderne Wirkstoffforschung auf die Entwicklung allosterischer und funktionell selektiver Modulatoren, welche auf spezifische G-Protein- oder Arrestin-vermittelte Signalwege ausgerichtet sind (Valant et al., 2012).

In den letzten Jahrzehnten wurden die GPCR systematisch untersucht und anhand ihrer Sequenzhomologie in drei Klassen geordnet. Für humane GPCR erfolgte eine phylogenetische Re-Klassifizierung in das GRAFS-System (IUPHAR, 2000). Das Akronym steht für die folgenden fünf GPCR-Untergruppen: Glutamat-, rhodopsinähnliche, Adhäsions-, Frizzled- und Sekretin-Rezeptoren. Die größte Klasse bilden die rhodopsinähnlichen GPCR, sie entspricht 701 Rezeptoren, von denen lediglich 62 orphan sind. Die Hauptklasse der rhodopsinähnlichen Rezeptoren ist in vier Untergruppen geteilt. Das sind die  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, und  $\delta$ - Gruppe. Trotz der großen Anzahl an Rezeptoren in dieser Hauptklasse ist bisher nur ein geringer Teil als Ziel für Wirkstoffe erkannt (Jacoby et al., 2006; Millar and Newton, 2010). Die vier anderen Hauptklassen umfassen eine wesentlich kleinere Anzahl von Rezeptoren, 15 Glutamat-, 15 Sekretin-, 24 Adhäsions- und 14 Frizzled/TAS2- Rezeptoren. Strukturbioologisch erfuhr die GPCR-Forschung erst im letzten Jahrzehnt eine rasante Entwicklung. Im Jahr 2007 existierten nur für das bovine Rhodopsin sowie für einige



**Abb.1: Phylogenetische Analyse der GPCR modifiziert nach Katritch et al. (2012)**

Die phylogenetische Analyse der GPCR zeigt nach der Re-Klassifizierung der humanen GPCR die Unterteilung in fünf Hauptklassen. Das sind die Familien der rhodopsinähnlichen Rezeptoren, der Sekretin- und der Adhäsions-Rezeptoren, der Glutamat-Rezeptoren sowie der Frizzled/TAS2-Rezeptoren. Die Hauptklasse der rhodopsinähnlichen Rezeptoren besteht aus vier Gruppen, der  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und der  $\delta$ -Gruppe, zu der auch die Glykoproteinhoron-Rezeptoren gehören. Weiter sind Rezeptorgruppierungen in Cluster unterteilt oder werden als individuelle Subtypen dargestellt. Rot umkreist sind die im Jahr 2012 veröffentlichten Kristallstrukturen der jeweiligen GPCR-Gruppen (Katritch et al., 2012).

extrazelluläre Domänen der Sekretin- und Glutamat-Rezeptoren strukturelle Informationen, welche eine erste mechanistische Interpretation der Rezeptoraktivierung zuließen (Archbold et al., 2011; Kniazeff et al., 2011). Bis heute wurden 16 weitere Rezeptorstrukturen aufgeklärt, 9 davon im Jahr 2012. Die Hälfte der aufgeklärten Rezeptorstrukturen gehört zu der  $\alpha$ -Klasse der rhodopsinähnlichen Rezeptoren. Darunter fallen die monoamin- oder die neurotransmitter-bindenden Rezeptoren, die eine hohe pharmakologische Relevanz haben.

Besonders für die  $\gamma$ -Klasse der rhodopsinähnlichen Rezeptoren wächst die Anzahl der aufgeklärten Strukturen für Rezeptordomänen stetig (Katritch et al., 2012). Für die Rezeptoren der  $\delta$ -Klasse, zu denen auch die Glykoprotein-hormon-Rezeptoren (GPHR) zählen, liegen weiterhin nur wenige strukturelle Informationen vor. Zwar konnten für den Thyreotropinrezeptor (TSHR) und den Follitropinrezeptor (FSHR) Domänen des großen extrazellulären Bereiches, welche für die Ligandenbindung verantwortlich sind, Kristallstrukturen generiert werden, dennoch fehlen reale Strukturdaten für die signalisierungssensitiven Bereiche. Dazu gehören die transmembranäre Serpentin-domäne (SD), dessen Konformationsänderung das G-Protein freisetzt, sowie die Hinge-Region, an der die Signalinitiation und -amplifikation nach Bindung eines endogenen Liganden stattfindet. Die Analyse struktureller Informationen nimmt in der Wirkstoffforschung eine besondere Rolle ein. Sie dient als Grundlage für ein rationales Wirkstoffdesign, mit welcher die Selektivität und die Sensitivität therapeutischer Ansätze verbessert werden kann. Im Fall der SD greift man auf 3D-Homologiemodelle zurück, welche in Kombination mit funktionellen Daten mechanistische Erkenntnisse liefern. Für die Hinge-Region scheiterte dieser Ansatz jedoch aufgrund fehlender struktureller und sequenzieller Vorlagen, sodass bisher über mechanistische Zusammenhänge nur spekuliert werden kann. Die strukturelle Aufklärung dieses Bereichs stellt somit ein bevorzugtes Ziel in der GPHR-Forschung dar.

### **2.2 Die Glykoprotein-hormon-Rezeptoren (GPHR)**

Einen kleinen Teil der rhodopsinähnlichen GPCR stellen die GPHR dar. Zu den GPHR gehören drei homologe Rezeptoren, der TSHR, der LHR und der FSHR (Ascoli et al., 2002; Kristiansen, 2004; Simoni et al., 1997; Szkudlinski et al., 2002; Vassart and Costagliola, 2004). Zusammengefasst sind diese drei Rezeptoren als Untergruppe GPHR in der  $\delta$ -Klasse der rhodopsinähnlichen Rezeptoren, welche die größte Klasse der GPCR bildet (Ascoli et al., 2002; Kosugi et al., 1996). Ihre Aufgabe besteht in der Aktivierung von G-Protein-abhängigen Signalwegen.

Die Aktivierung der intrazellulär gekoppelten heterotrimeren G-Proteine erfolgt dabei durch die Interaktion der Rezeptoren mit ihren spezifischen, endogenen Liganden. Dies sind das Hormon Thyreotropin (TSH) und die Gonadotropin Lutropin (LH), Choriogonadotropin (CG) und Follitropin (FSH), welche jeweils aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Einheit bestehen (Stockell Hartree and Renwick, 1992).

Zu bemerken ist, dass alle Glykoprotein hormone (GPH) die gleiche  $\alpha$ -Untereinheit besitzen und die Unterschiede in der Spezifität und Sensitivität auf Seiten der Hormone durch die  $\beta$ -Untereinheit vermittelt werden. Trotzdem ist die Sequenzhomologie der humanen Hormone untereinander sehr hoch und liegt für das TSH, LH und FSH bei 40% und zwischen den Hormonen LH und CG, welche beide den LHR aktivieren sogar bei 80% (Costagliola et al., 2005). Zwischen dem LH und dem CG besteht ein wesentlicher Unterschied in der  $\beta$ -Untereinheit. Während die  $\beta$ -Untereinheit des LH homolog zum FSH und TSH aufgebaut ist, besitzt das CG einen verlängerten C-Terminus, welcher vier potentielle O-Glykosylierungsstellen aufweist (Gromoll et al., 2004).

Eine funktionelle Konsequenz wird einerseits in der Bindungsposition zur LRRD, andererseits in einer veränderten Wechselwirkung mit potentiellen Interaktionspunkten innerhalb der Hinge-Region vermutet. Die vermuteten Unterschiede in der Positionierung und den Interaktionspunkten gewährleisten, trotz der hohen Sequenzhomologie die Bindungsspezifität, welche für die Regulation unterschiedlicher physiologischer Funktionen notwendig ist. In der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse ist die Hauptaufgabe des TSHR die Regulation der Schilddrüsenaktivität, welche für die Sekretion der peripheren Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (T3) und Thyroxin (T4) verantwortlich ist (Kopp, 2001). Dies erfolgt über die Rezeptoraktivierung mittels des in der Hypophyse ausgeschütteten TSH. Ein negativer Rückkopplungsmechanismus ermöglicht es, einen konstanten Hormonspiegel zu erhalten, indem die Hormone T3 und T4 hemmend auf die Produktion von TSH wirken (Lezoualc'h et al., 1992).

Der humane FSHR und der LHR sind Teil der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse. Sie nehmen physiologisch eine essentielle Rolle in der Reproduktion ein. Bei der Frau steuert der FSHR die Ausreifung der Follikel im Ovar. Während der LHR, aktiviert durch das LH, die Progesteronausschüttung reguliert und die Ovulation einleitet. Die Aktivierung des LHR durch das CG erfolgt nur während der Schwangerschaft und ist durch die Aufrechterhaltung des erhöhten Progesteronspiegels für die Erhaltung der Schwangerschaft verantwortlich. Beim Mann stimuliert die LHR Aktivierung durch LH die Testosteronproduktion sowie die Spermatogenese. Auch hier findet ein Rückkopplungsmechanismus statt, welcher durch das Östrogen bzw. Testosteron vermittelt wird.

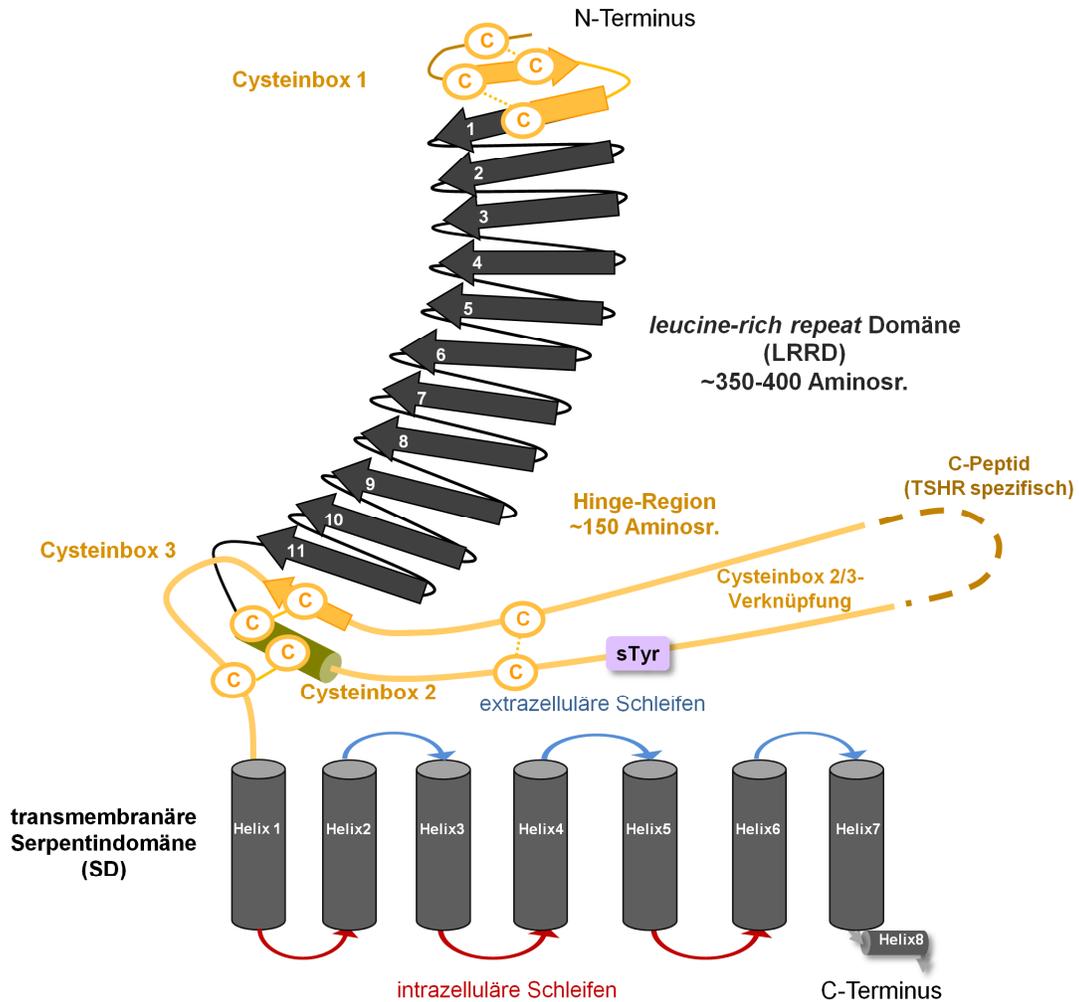
Mutationen in den GPHR verursachen oftmals schwere physiologische Störungen und Krankheitsbilder. Für den TSHR sind zahlreiche aktivierende (53) und inaktivierende Mutationen (23) bekannt. Im Vergleich dazu wurden für den LHR 14 aktivierende und 13 inaktivierende Mutationen beschrieben. Für den FSHR konnten

7 aktivierende und 9 inaktivierende Positionen gefunden werden (Datenbank: [www.ssfaGPHR.de](http://www.ssfaGPHR.de); Kleinau et al., 2010). Der Phänotyp äußert sich in vielen Fällen durch Hypo- oder Hyperplasien der betroffenen Organe z.B. der Schilddrüse oder der Leydigzellen (Kopp, 2001; Misrahi et al., 1997; Themmen and Huhtaniemi, 2000). Die Untersuchung von Struktur-Funktions-Abhängigkeiten der natürlich vorkommenden Mutationen, sowie die molekularbiologische Einführung von artifiziellen Punktmutationen stellt eine effiziente Vorgehensweise dar, um Funktionsmechanismen und damit mögliche Ursachen von Rezeptorfehlfunktionen auf molekularer Ebene zu ergründen.

### **2.3 Die Topologie und Struktur der GPHR**

Der strukturelle Aufbau der homologen GPHR ähnelt dem der übrigen GPCR. Charakteristisch ist die SD, welche maßgeblich an der Freisetzung des heterotrimeren G-Proteins beteiligt ist. Sie besteht aus sieben transmembranären Helizes (TMH), die durch jeweils drei extrazelluläre (ECL) und drei intrazelluläre (ICL) Schleifen verbunden sind. Die SD besitzt zudem eine allosterische Bindungsregion, welche für Modulatoren zugänglich ist und damit einen zweiten therapeutischen Angriffspunkt bietet. Auffällig an den GPHR ist der große N-terminale extrazelluläre Bereich, bestehend aus der LRRD, welche die primäre Bindungsregion für das Hormon darstellt und der Hinge-Region, welche als Verbindungsstück zwischen LRRD und SD eine sekundäre Bindungsstelle für das Hormon bereit stellt und als signalisierungssensitiver Bereich die Signaltransduktion initiiert (Kleinau and Krause, 2009) (siehe Abb.2).

Während die Sequenzhomologie des extrazellulären Bereichs aufgrund der vorausgesetzten Ligandenspezifität nur 40% beträgt, weisen die SD der drei GPHR sehr hohe Sequenzhomologien (70%) auf, was auf einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung hindeutet (Szkudlinski et al., 2002; Vassart et al., 2004).

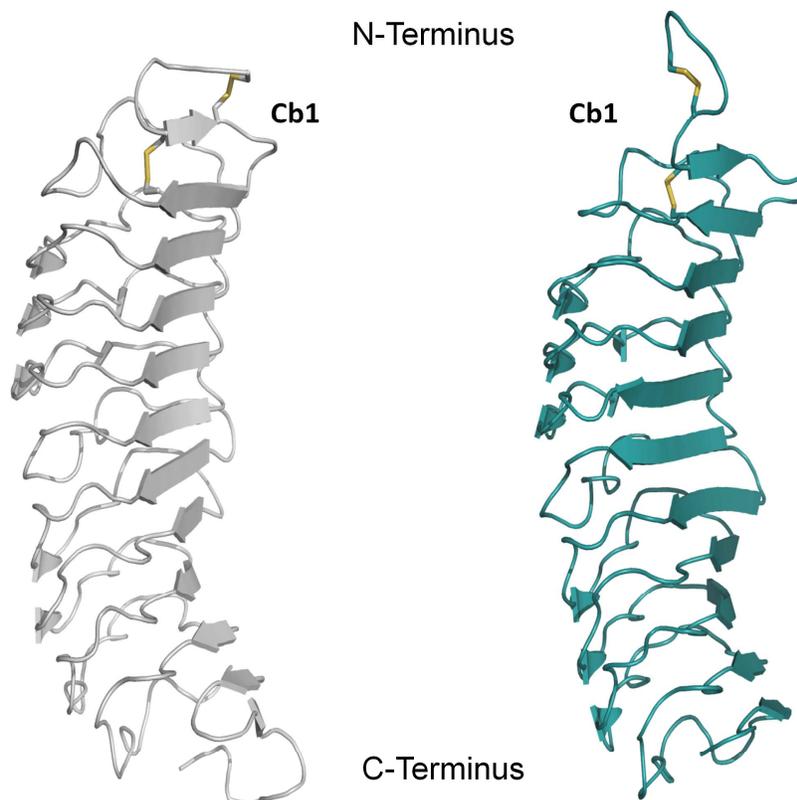


**Abb.2: Topologie und Struktur der Glykoprotein-hormon-Rezeptoren**

Die Glykoprotein-hormon-Rezeptoren bestehen aus einem extrazellulären Bereich, der sich aus der LRRD und der Hinge-Region zusammensetzt, sowie einer SD, an der das G-Protein gekoppelt und freigesetzt wird. Die LRRD besteht aus 10 Wiederholungen. Darüber hinaus beinhaltet die Domäne eine Cysteinebox (Cb1) welche vier Cysteine enthält. Die Hinge-Region besteht aus der Cysteinebox 2 (Cb2) und Cysteinebox 3 (Cb3), welche durch zwei Disulfidbrücken strukturell gekoppelt sind. Das Cysteinebox2/3-Verbindungsstück besitzt in den drei GPHR unterschiedliche Längen und liegt im TSHR als abspaltbares C-Peptid vor (Vassart and Costagliola, 2004). Darüber hinaus beinhaltet die Hinge-Region eine signalisierungssensitive Sulfatierungsstelle (sTyr). Die SD besteht aus 7 TMH, welche durch jeweils drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen verbunden sind. Intrazellulär schließt sich eine potentielle achte Helix an.

### 2.3.1 Die *Leucine-rich repeat* Domäne (LRRD)

Die LRRD der GPHR stellt die primäre Bindungsstelle für die GPH bereit und besteht aus der Cysteinbox1 (Cb1) und dem *Leucine-rich repeat* Motiv, welches 10 Wiederholungen aufweist. Die Kristallstruktur der LRRD konnte sowohl für den FSHR im Komplex mit dem Hormon (Fan and Hendrickson, 2005), als auch für den TSHR im Komplex mit einem aktivierenden Autoimmunantikörper (Sanders et al., 2007) und einem blockierenden Autoimmunantikörper (Sanders et al., 2011) dargestellt werden. Die LRRD nimmt dabei eine sensenförmige Struktur mit einem hydrophoben Kern ein, in welchem aromatische Aminosäurekontakte (Phe-Ladder) erkannt werden konnten (Kleinau and Krause, 2009).



**Abb.3: Kristallstruktur der FSHR- und der TSHR-LRRD**

Zu sehen ist die Kristallstruktur der FSHR-LRRD (grau, Kristallstruktur: 1XWD) und der TSHR-LRRD (cyan, Kristallstruktur: 2XWT) welche aus jeweils 10 Wiederholungen bestehen. In Gelb eingefärbt ist die unterschiedliche Cysteinverbrückung in der Cysteinbox1 (Cb1) beider GPHR. Während die vier Cysteine der Cb1 beim FSHR (grau) über Kreuz verbrückt sind, liegen die beiden Disulfidbrücken beim TSHR (cyan) in Reihe vor. Am C-Terminus erfolgt der Übergang in die Hinge-Region.

Die Cysteinbox 1 (Cb1) beinhaltet sowohl im FSHR als auch im TSHR vier Cysteine und repräsentiert ein flankierendes *N-cap-motif* für die LRRD (Bella et al., 2008; Kajava, 1998; Kleinau and Krause, 2009). Die Cysteine liegen dabei in zwei Disulfidverbrückungen vor. Während beim FSHR die Verbrückung über Kreuz erfolgt (Cys18 und Cys25 sowie Cys23 und Cys32), zeigt die Struktur des TSHR zwei Disulfidbrücken in Reihe (Cys31 und Cys41) (siehe Abb.3). Durch Struktur-Funktions-Untersuchungen konnte außerdem gezeigt werden, dass die Cysteinverbrückung Cys31 Cys41 essentiell für die Faltung der LRRD und damit für die Funktion des Rezeptors ist (Alberti et al., 2002).

Die primäre Bindung des GPH erfolgt über die LRRD, indem das Hormon mit den *leucine-rich repeats* (LRR) auf der konkaven Innenseite der LRRD interagiert (Dias, 2005; Fan and Hendrickson, 2007, 2008). Die Hormon-Rezeptor-Interaktion beschränkt sich dabei auf selektive Motive exponierter Aminosäureketten, die eine spezifische Ligandenerkennung gewährleisten (Bhowmick, 1996; Bhowmick et al., 1999; Bogerd, 2007; Costagliola et al., 2005; Dias, 2005; Vischer et al., 2003, 2006).

Bestimmte Krankheitsbilder konnten mit natürlich auftretenden Mutationen innerhalb der LRRD assoziiert werden, welche auf molekularer Ebene zu einer Fehlfaltung der LRRD führen oder die Interaktion zwischen Hormon und Rezeptor mindern (Kleinau and Krause, 2009). Auch sind Mutationen bekannt, welche die Interaktion verstärken. Diese führen zu einem Phänotyp mit Rezeptorhyperfunktion (Caltabiano et al., 2008; De Leener et al., 2008; Rodien et al., 1998).

### **2.3.2 Die transmembranäre Serpentin-domäne (SD)**

Die SD, welche maßgeblich an der Freisetzung des heterotrimeren G-Proteins beteiligt ist, besitzt unter den GPHR eine hohe Sequenzhomologie von 70%. (Vassart et al., 2004). Variablere Bereiche befinden sich in den extra- und intrazellulären Schleifen. Um bessere Einsicht in die molekularen Aktivierungsprozesse zu erhalten, wurden Homologiemodelle auf Basis der Struktur des bovinen Rhodopsins als inaktive Konformation bzw. des bovinen Opsins als aktive Konformation erstellt (Haas et al., 2011; Kleinau et al., 2010b). Diese dreidimensionalen Homologiemodelle sind die Voraussetzung für die Ausarbeitung von Struktur-Funktions-Untersuchungen, die der Aufklärung molekularer Aktivierungsmechanismen dienen. Zudem ermöglichen die Modelle die Interpretation der funktionellen Daten und ein besseres Verständnis für die Ursachen von auftretenden Rezeptordysfunktionen. Für alle drei GPHR konnten allosterische Agonisten gefunden werden, welche den Rezeptor in eine aktive Konformation überführen und

somit seine Funktion steigern (van Straten et al., 2002, 2005). Mit Hilfe von Verdrängungsexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass ihr Angriffspunkt am Rezeptor allosterischer Natur ist. Die GPHR besitzen, wie auch andere GPCR, innerhalb der SD eine allosterische Bindungsregion, welche den Einsatz von funktionell selektiven Modulatoren ermöglicht (Gershengorn and Osman, 2001; Stenkamp et al., 2005). Besonders gut untersucht ist die allosterische Bindungsregion für den TSHR. Mittels Dockingstudien am THSR- und LHR-Strukturmodell wurde die allosterische Bindungsregion in der Nähe der zweiten extrazellulären Schleife vermutet (Jaeschke et al., 2006). In diesem Zusammenhang wurden die auskleidenden Aminosäuren der Bindungsregion des TSHR systematisch durch die Einführung von Punktmutationen untersucht (Haas et al., 2011; Kleinau et al., 2010b). Dabei konnten zahlreiche konstitutiv aktivierende sowie inaktivierende Positionen identifiziert werden. Im Besonderen gelang es durch rationale Substitution der, an der Bindungsregion beteiligten Aminosäuren Met527 und Tyr676, die antagonistische Wirkung eines Modulators in eine agonistische umzuwandeln (Haas et al., 2011). Die gerichtete Funktionalisierung geeigneter Modulatoren stellt damit einen innovativen therapeutischen Ansatz zur selektiven Manipulation der Rezeptorfunktion dar.

### **2.3.3 Die Hinge-Region**

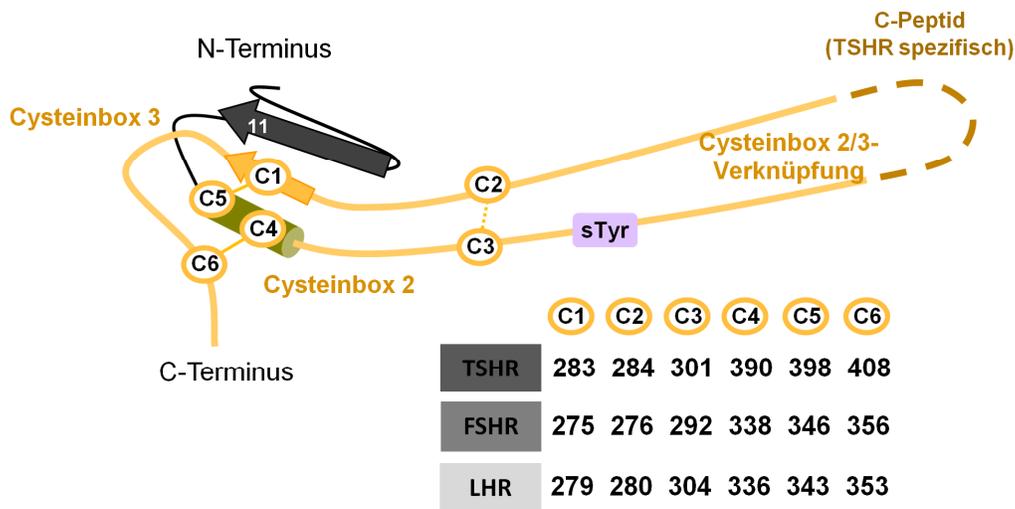
Den Übergang zwischen der hormonbindenden LRRD und der heptahelikalen SD bildet die cysteinreiche Hinge-Region. Im Vergleich zu der LRRD und der SD weisen die Hinge-Regionen der GPHR die geringsten Sequenzhomologien auf und unterscheiden sich in der Länge sowie im Anfangs- und Endpunkt. Der Bereich der Hinge-Region wurde zunächst für den TSHR zwischen den Aminosäuren Lys261 und Arg418 und für den FSHR zwischen Lys260 und Arg366 festgelegt (Mueller et al., 2009a). In Sequenzanalysen und angefertigten Homologiemodellen der extrazellulären Domäne konnte im Anschluss an die 10 Wiederholungen ein Sequenzmotiv gefunden werden, welches auf ein 11 LRR hinweist (Kleinau and Krause, 2009). In Folgearbeiten wurde ein alternativer Vorschlag für den Bereich der Hinge-Region formuliert. Danach erstreckt sich die Hinge-Region für den TSHR von der Position Pro280 bis Asp410, für den FSHR von Pro272 bis Asp358 und für den LHR von Pro276 bis Asp355 (Jaeschke et al., 2011). Damit besitzt der TSHR mit 130 Aminosäuren die längste Hinge-Region, was hauptsächlich auf das verlängerte Cysteinbox 2/3-Verbindungsstück zurückzuführen ist. Weiter konnte die Hinge-Region in breiten funktionellen Studien als hormonbindungs- und signalisierungssensitive Plattform erkannt werden, die als Verbindung zwischen

LRRD und SD dient und an welcher die intramolekulare Signaltransduktion initiiert und weitergeleitet wird. Die Regulation erfolgt an allen drei GPCR unterschiedlich, sodass man annehmen kann, dass die Hinge-Region durch intra- und intermolekulare Interaktionen die individuelle Rezeptorfunktion differenziert moduliert (Bernard et al., 1998; Costagliola et al., 2002; Kleinau and Krause, 2009; Kosugi et al., 1991; Mizutori et al., 2008; Mueller et al., 2008; Nagayama and Rapoport, 1992; Nagayama et al., 1991; Nurwakagari et al., 2007). Unter anderem ist die Hinge-Region in der Stabilisierung der basalen Rezeptorkonformation involviert, die vor allem für den TSHR eine wichtige Funktion darstellt. Während beim LHR und FSHR die Hinge-Region eine nicht aktivierte Rezeptorkonformation in ligandenfreiem Zustand stabilisiert und bei der Interaktion mit dem endogenen Ligand eine Aufhebung dieses Zustands erfolgt, wirkt im ligandengebundenen Zustand die Hinge-Region beim TSHR als interner inverser Agonist, welcher die Rezeptorfunktion auf den Basalwert reduziert. Damit besitzt die Hinge-Region einen inhibierenden Einfluss auf die Interaktion zwischen Ektodomäne und SD. Bei Rezeptorstimulation wird der invers-agonistische Effekt aufgehoben und in eine aktive Konformation überführt. Dieses Modell wird durch Daten unterstützt, bei dem die Deletion der TSHR-Ektodomäne zu einer Erhöhung der Basalaktivität und damit zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors führt (Vlaeminck-Guillem et al., 2002; Zhang et al., 2000). Andererseits konnte gezeigt werden, dass die Einführung von Mutationen in den C-terminalen Bereich der Hinge-Region zu einer Rezeptorinaktivierung bei versuchter Effektorinduktion führt (Nurwakagari et al., 2007). Dies lässt die Interpretation zu, dass es zu einer kooperativen Wechselwirkung zwischen potentiell strukturierten Bereichen der Hinge-Region und den extrazellulären Schleifen der SD bei der Rezeptoraktivierung kommen muss. Die Hinge-Region fungiert somit als inverser Agonist, wodurch der Rezeptor im basalen Zustand gehalten wird. Bei Stimulation mittels endogenen Liganden oder durch die Einführung einer aktivierenden Punktmutation wird die invers-agonistische Wirkung in eine agonistische umgewandelt, indem die Hinge-Region als interner Agonist auf die SD wirkt (Vlaeminck-Guillem et al., 2002). Dieser Mechanismus konnte im LHR und im FSHR nicht bestätigt werden. In funktionellen Studien, konnte kein Hinweis auf eine invers-agonistische Wirkung der Hinge-Region im LHR gefunden werden (Nurwakagari et al., 2007; Sangkuhl et al., 2002). Deletionen innerhalb der Ektodomäne führten zu keiner konstitutiven Aktivierung. Was bedeutet, dass die Hinge-Region eine andere mechanistische Ausrichtung als im TSHR haben muss. Analog zum TSHR konnte eine hormoninduzierte Rezeptoraktivierung der deletierten Konstrukte ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Nurwakagari et al., 2007). Die Funktion der Hinge-Region beschränkt sich beim LHR also auf die agonistische Wirkung, welche durch

Interaktion mit den extrazellulären Schleifen nach Bindung des Effektors oder durch Einführung von aktivierenden Punktmutationen stattfindet (Sangkuhl et al., 2002). Die durch die Hinge-Region vermittelten mechanistischen Unterschiede sind somit auf die unterschiedlichen Interaktionen potentieller Strukturelemente mit internen (Ektodomäne bzw. extrazelluläre Schleifen der SD) oder externen (exponierte Bereiche des endogenen Liganden) Aktionspunkten zu beziehen. Interessanterweise zeigten Versuche mit LHR-TSHR- bzw. FSHR-TSHR- Chimären, dass die LHR/FSHR Hinge-Region die invers-agonistische Funktion beim TSHR kompensieren kann und dem Rezeptor eine basale Funktion ermöglicht (Jaeschke et al., 2011). Darüber hinaus konnte in den LHR-TSHR- und FSHR-TSHR-Chimären ebenfalls der superagonistische Effekt durch bovines TSH erreicht werden, für den eine Interaktion der ersten und dritten Schleife der bTSH- $\alpha$ -Untereinheit mit polaren Motiven der TSHR Hinge-Region prognostiziert wird (Mueller et al., 2011). Das führt zu der Schlussfolgerung, dass potentielle Strukturelemente der Hinge-Region variabel einsatzfähig sein könnten und durch differenzierte Interaktionspunkte interne Funktionen übernehmen.

Die Hinge-Region besitzt ihre größte sequentielle Variabilität im Bereich zwischen der N-terminalen und der C-terminalen Cysteinbox (Cb2 und Cb3). Das Cysteinbox 2/3- Verbindungsstück unterscheidet sich bei den GPHR in der Aminosäuresequenz sowie in ihrer Länge. Beim TSHR findet zudem eine Modifikation des Rezeptors statt, indem das Verbindungsstück, auch C-Peptid genannt, enzymatisch abgetrennt wird, sodass der TSHR aus einer durch Disulfidbrücken verbundenen Einheiten besteht (Chazenbalk et al., 1997; Loosfelt et al., 1992; Tanaka et al., 1999a, 1999b). Während die komplette Abwesenheit des C-Peptids (Ala317 bis Phe366) keinen Einfluss auf die Funktionalität aufweist, hat eine schrittweise Deletion des Aminosäurebereichs Lys371 bis His384 eine Absenkung des invers-agonistischen Effekts und damit eine konstitutive Aktivierung des TSHR zur Folge (Mizutori et al., 2008).

Die beiden Cysteinboxen Cb2 und Cb3 spielen mit ihren jeweils drei Cysteinen somit eine entscheidende strukturelle Rolle beim TSHR, indem sie den modifizierten Zwei-Komponenten-Rezeptor zusammenhalten. Eine weitere Aufgabe besteht in der Generierung einer signalisierungssensitiven Struktureinheit, welche sich aus dem N-terminalen Bereich der Cb2 sowie dem C-terminalen Bereich der Cb3 zusammensetzt. Sowohl im Cb2- als auch im Cb3-Bereich konnten mehrere konstitutiv aktivierende Mutationen identifiziert werden, welche den Einfluss dieses Bereichs der Hinge-Region in der Stabilisierung der nicht aktiven Konformation vermuten lässt (Kleinau and Krause, 2009).



**Abb.4: Schema der Cysteinerverknüpfungen innerhalb der Hinge-Region der GPHR**

Zu sehen ist das Schema der Cysteinerverknüpfungen zwischen der Cb2 und der Cb3 innerhalb der Hinge-Region der GPHR. Die Nummerierung der Cysteine entspricht der Position innerhalb der Proteinsequenz des humanen TSHR, FSHR und des LHR.

Unter anderem bildet die Hinge-Region in diesem Bereich, mit der am N-Terminus der Cb2 lokalisierten Mikrodomäne, welche das konservierte und signalisierungssensitive Serin (TSHR: Ser281, LHR: Ser277, FSHR: Ser273) beinhaltet, eine kompakte Einheit, die sich in räumlicher Nähe zur TMH1 und TMH2 befindet (Kleinau and Krause, 2009). Die strukturelle Integrität dieser Region wird durch eine Disulfidverbrückung innerhalb der Hinge-Region gewährleistet. Diese ist für die korrekte Rezeptorfunktion essentiell. Beim TSHR liegt eine doppelte Cysteinerverbrückung vor. In funktionellen Studien konnte gezeigt werden, dass die Cysteine Cys283 und Cys398 sowie Cys284 und Cys408 verknüpft sind (siehe Abb.4). Analog zum TSHR konnte diese doppelte Cysteinerverbrückung auch beim LHR mittels zellbiologischer Experimente nachgewiesen werden. Demnach bilden die Cysteine Cys279 und Cys343 sowie Cys280 und Cys353 eine Disulfidbrücke aus. Dies unterstützt die These, dass diese Cysteine an der Erhaltung der strukturellen Einheit innerhalb der Hinge-Region beteiligt sind (siehe Abb.4). Die zwei inneren der sechs Cysteine innerhalb der TSHR Hinge-Region (Cys301 und Cys390) zeigten in einer Doppelmutation keine signifikanten Unterschiede im Ligandenbindungsverhalten, was angesichts der räumlichen Lage der beiden Cysteine in einem Zweikomponenten-Rezeptor plausibel ist (Ho et al., 2008). Auch für den LHR konnte an analoger Stelle (Cys304 und Cys336) eine solche Verbrückung für den LHR nicht

nachgewiesen werden (Bruysters et al., 2008). Daraus kann geschlossen werden, dass eine Verbrückung an dieser Stelle für die Funktionalität des LHR nicht essentiell ist. Das wird durch die Tatsache untermauert, dass der entsprechende LHR der Neuweltaffen (z.B. *Callithrix jacchus*) zwar auch alle restlichen Cysteine besitzt, jedoch an Stelle des Cys336 ein Histidin aufweist (Gromoll et al., 2003), womit eine Disulfidverbrückung ausgeschlossen werden kann.

Ein weiterer signalisierungssensitiver Bereich der Hinge-Region umfasst ein konserviertes Tyr-Glu/Asp-Tyr-Motiv, in welchem eines der Tyrosine im TSHR, LHR und FSHR sulfatiert vorliegt. Das sulfatierte Tyrosin ist als sekundäre Bindungsregion für die entsprechenden Hormone für alle GPHR identifiziert worden. Mutagenesestudien offenbarten eine räumliche Flexibilität für die Position des sulfatierten Tyrosins bei den GPHR. Während beim FSHR das C-terminale Tyrosin (Tyr335) sulfatiert ist, sind beim TSHR und LHR jeweils das N-terminale Tyrosin Tyr385 (TSHR) (Bonomi et al., 2006) Tyr331 (LHR) (Bruysters et al., 2008) sulfatiert. Beim LHR ist die Notwendigkeit der Tyrosin-Sulfatierung bivalent. Während für die LH-induzierte Signalisierung das sulfatierte Tyrosin Tyr331 essentiell ist, ist die Rezeptorfunktion bei einer Substitution des Tyr331 und anschließender Stimulation mit CG nur mäßig eingeschränkt (Bruysters et al., 2008). Die unterschiedliche Sensitivität dieser Position lässt vermuten, dass bei den drei GPHR unterschiedliche Aktivierungsprofile auch im unmittelbaren Umfeld des gemeinsamen Sulfatierungsmusters existieren. Neben der Sulfatierung ist auch die Glykosylierung innerhalb der Hinge-Region für eine korrekte Rezeptorfunktion von Bedeutung. Während der TSHR nur eine Glykosylierungsstelle innerhalb der Hinge-Region besitzt (Asp302) (Nagayama et al., 2000), benötigt der FSHR zur korrekten Rezeptorfaltung und -funktion die Glykosylierung von mindestens einer der vorhandenen Glykosylierungsstellen (Asp293, Asp318) innerhalb der Hinge-Region (Davis et al., 1995). Im Vergleich dazu besitzt der LHR innerhalb der Hinge-Region drei putative Glykosylierungsstellen (Asp291, Asp299 und Asp313), wobei die Relation der Glykosylierung und der Rezeptorfunktion nicht vollständig untersucht ist (Davis et al., 1997).

Der Exon10-Bereich (Gln290 bis Leu316) des LHR wurde ebenfalls als signalisierungssensitive Region erkannt. Die bei einem männlichen Patienten gefundene Exon10-Deletionsmutante führt zu einer Verkürzung der LHR Hinge-Region um 27 Aminosäuren und zeigte in zellbiologischen Studien eine verminderte Rezeptorfunktionalität bei LH-Stimulation, was phänotypisch mit einer Leydigzellen-Hypoplasie assoziiert ist (Gromoll et al., 2000; Mueller et al., 2003).

Interessanterweise wird diese Fehlfunktion des deletierten Hinge-Bereiches nur bei LH- und nicht bei CG-Stimulation beeinflusst. Es ist deshalb anzunehmen, dass auch in diesem speziellen Bereich der Hinge-Region molekulare Determinanten vorliegen, welche mechanistisch in den Prozess der Signalisierungsamplifikation eingreifen. Die Hinge-Region stellt somit ein divergierendes *Interface* zur Initiierung der Signaltransduktion dar. Sie stellt zudem eine sekundäre Hormonbindungsstelle bereit und erfüllt die Funktion der Justierung der endogenen Liganden an der LRRD. Da im Fall der Hinge-Region fast ausschließlich auf funktionelle Daten zurückgegriffen werden kann, ist die Formulierung eines mechanistischen Modells zur Signalinitiation und -amplifikation bisher nicht möglich gewesen. Die kürzlich veröffentlichte Kristallstruktur der FSHR-Ektodomäne im Komplex mit FSH bestätigte die Existenz vereinzelter Strukturelemente innerhalb der FSHR Hinge-Region (Jiang et al., 2012). Für den exponierten Bereich der Hinge-Region, welcher dem Exon10-Bereich im LHR entspricht, fehlen jedoch strukturelle Informationen auch in dieser Kristallstruktur. Wenig geklärt ist außerdem, welcher Zusammenhang zwischen den potentiellen Strukturelementen der Hinge-Region und den genannten Funktionen besteht und unter welchen Bedingungen die unterschiedlichen signalisierungssensitiven Bereiche miteinander interagieren. Zu diskutieren ist ebenfalls, ob die Interaktion der strukturellen Elemente intrinsisch erfolgt.

## 2.4 Die Signalisierungseigenschaften der GPHR

### 2.4.1 Rezeptoraktivierung und Modulation

Die Aktivierung der GPHR kann durch ein mehrstufiges Modell beschrieben werden. Zunächst befindet sich der Rezeptor im nicht ligandengebundenen Grundzustand  $R_0$ . Eine aktivierte Konformation des Rezeptors  $R^*$  kann durch die Ligandenbindung an der primären Bindungsstelle oder an der allosterischen Bindungsregion stabilisiert werden. Ebenso kann die Einführung von konstitutiv aktivierenden Mutationen zu der Stabilisierung einer aktivierenden Konformation beitragen (Ascoli et al., 2002).

In Abwesenheit des Liganden befinden sich die meisten Rezeptoren im inaktiven  $R^0$  Zustand. Einige Rezeptoren besitzen jedoch die Eigenschaft der basalen Aktivität, welche durch eine erhöhte Aktivität des Systems im Grundzustand ohne Ligandenstimulation charakterisiert ist. In der Klasse der GPHR trifft das auf den TSHR und den LHR zu. Dabei handelt es sich um ligandenungebundene Rezeptoren, die sich im Equilibrium mit einer aktiven Rezeptorkonformation befinden. Die Stärke der basalen Aktivität nimmt dabei mit der Erhöhung der Rezeptordichte zu (Samama et

al., 1993). Die aktivierte Konformation R\*, welche durch basale-, liganden- oder mutation-induzierte Rezeptoraktivierung erreicht wird, muss nicht zwingend die gleiche sein, dennoch geht man bei allen drei Aktivierungsarten von einem ähnlichen Konformationswechsel aus (Ascoli et al., 2002). Erst der Konformationswechsel ermöglicht die Freisetzung des heterotrimeren G-Proteins, welches die weitere Signalkaskade auslöst.

Fasst man die vorhandenen strukturellen und funktionellen Daten zusammen, können für die Rezeptoraktivierung der homologen GPHR drei grundlegende Phasen formuliert werden. Zunächst erfolgt die primäre Bindung des endogenen Liganden (TSH, FSH, LH oder CG) an die LRRD des korrespondierenden Rezeptors. Dann folgt die Justierung und sekundäre Bindung des Hormons an die Hinge-Region, sowie die intramolekulare Signaltransduktion über mehrere Triggerpunkte des N-terminalen Bereichs der Hinge-Region und schließlich eine Veränderung der TMH-Interaktion und Freisetzung des G-Proteins. Eine besondere Bedeutung für die extrazelluläre Konformationsänderung und die Signaltransduktion spielt das hoch konservierte Serin (TSHR Ser281, LHR Ser277, FSHR Ser273), welches als Kopplungsstelle zwischen LRRD, Hinge-Region und ECL fungiert. (Ho et al., 2001; Jaeschke et al., 2006; Kleinau et al., 2004). Die ECL amplifizieren das Signal anschließend synergetisch über die TMH (Kleinau and Krause, 2009).

In einem Ein-Hormon-Ein-Rezeptor Modell für den TSHR, erfolgt die Interaktion zwischen dem Hormon (bTSH) und der Hinge-Region über komplementär geladene Motive während der primären Interaktion mit der LRRD. Eine alternative simultane Interaktion des Hormons mit den ECL sieht das Modell jedoch nicht vor (Bernard et al., 1998; Kosugi et al., 1991; Nagayama and Rapoport, 1992). Der N-terminale Cb2- und der C-terminale Cb3-Bereich ist als signalisierungssensitive kompakte Einheit der Hinge-Region direkt an der Signalweiterleitung über die ECL und an der Konformationsänderung beteiligt (Bruysters et al., 2008; Kleinau et al., 2008; Mizutori et al., 2008; Vlaeminck-Guillem et al., 2002). Dabei ist das signalisierungssensitive Tyrosin (TSHR Tyr385, FSHR Tyr335 und LHR Tyr331) (Costagliola 2002, Bruysters 2008, Bonomi 2006) innerhalb des flexibleren Bereichs der Hinge-Region im Wesentlichen für die korrekte Positionierung der GPH an die LRRD verantwortlich (Bruysters et al., 2008).

Die ECL stabilisieren die aktive Konformation durch die Interaktion von Aminosäureseitenketten mit den transmembranären Helices (ECL2 und TMH6) (Kleinau et al., 2007). Die Signalamplifikation geschieht durch kooperative Effekte aller drei ECL (Kleinau et al., 2008).

Trotz der wenigen strukturellen Informationen über die Hinge-Region ist die essentielle Funktion bei der Hormoninteraktion und Signalamplifizierung sowie ein genereller Funktionsmechanismus, der für die drei homologen GPCR ähnlich zu erwarten ist, über Struktur-Funktions-Untersuchungen bestätigt. Zu diskutieren bleibt das genaue Zusammenspiel möglicher, innerhalb der Hinge-Region vorhandener, Strukturelemente bei der Signalamplifikation und der Stabilisierung der aktiven/inaktiven Konformation. Im Vergleich dazu ist die Konformationsänderung innerhalb der SD, sowohl für den LHR als auch für den TSHR gut untersucht (Ascoli et al., 2002; Kleinau et al., 2011a). Die Verwendung von 3D-Homologiemodellen auf Basis des bovinen Rhodopsins und Opsins (Palczewski et al., 2000), in Kombination mit experimentellen Daten aus Struktur-Funktions-Untersuchungen, zeigte einen essentiellen Einfluss des ICL3 und der TMH5/TMH6-Interaktion für die G-Protein-Freisetzung beim LHR (Kudo et al., 1996).

Andererseits wird eine Interaktion zwischen den transmembranären Helizes TMH3 und TMH6, sowie TMH3 und TMH7 und TMH6 und TMH7 vorgeschlagen, die eine essentielle Rolle in der Stabilisierung der inaktiven Rezeptorkonformation spielen. Untermauert wird der Einfluss durch Mutagenesestudien am LHR und rLHR (Angelova et al., 2000; Fernandez and Puett, 1996; Kudo et al., 1996).

Der Vergleich mit homologen Strukturen zeigt, dass der Unterschied zwischen inaktiver und aktiver Konformation in einer Neigung der TMH5 und TMH6 und einer Orientierung der TMH7 zur intrazellulären Seite besteht (Standfuss et al., 2011). Dies eröffnet den Raum auf zytoplasmatischer Seite für die Anbindung des G-Proteins, welches GDP-vermittelt zur Aktivierung freigesetzt werden kann und die weitere Signalkaskade auslöst.

Beim LHR konnte als einer der ersten GPCR eine unabhängige Aktivierung zweier G-protein-abhängiger Signalkaskaden gezeigt werden.  $G_{\alpha_s}$ , welches die cAMP-Bildung durch die Adenylatzyklase initiiert und  $G_{\alpha_q/11}$ , welches durch die Anregung der Phospholipase C zu einer Erhöhung der Konzentrationen von Diacylglycerol und Inositol-1,4,5-triphosphat führt (Gudermann et al., 1992). Ein weiterer *in vitro* entdeckter Signalweg für den LHR erfolgt über die MAPK-Kaskade (Faure et al., 1994; Hirakawa et al., 2002).

Eine physiologische Funktion konnte für den TSHR nur für die Signalisierungswege über  $G_{\alpha_s}$  und  $G_{\alpha_q/11}$  ermittelt werden (Grasberger et al., 2007; Kero et al., 2007). Der Hauptsignalisierungsweg des TSHR verläuft über die Aktivierung von  $G_{\alpha_s}$ . Dieser Signalweg ist an der Regulation und der Differenzierung der folliculären Schilddrüsenzellen beteiligt. Es wird ebenfalls die Jodaufnahme und Hormonsekretion der Schilddrüsenzellen reguliert (Vassart and Dumont, 1992). Die

funktionelle Bedeutung des  $G_{\alpha q/11}$  liegt in der Stimulation der Produktion und Jodierung des Thyreoglobulins als Vorläuferprotein für die Schilddrüsenhormone (Kero et al., 2007). Auch beim TSHR gibt es Hinweise auf eine cAMP-unabhängige Aktivierung der MAPK-Kaskade (Saunier et al., 1995; Tournier et al., 1995).

#### **2.4.2 Rezeptoroligomerisierung und intermolekulare Kooperativität**

Das klassische Modell, welches die Signalisierungseigenschaften von GPCR beschreibt, sieht eine 1:1-Interaktion zwischen dem Liganden und dem Rezeptor vor. Dieses Modell scheitert jedoch bei der Erklärung bestimmter Eigenschaften, welche im Zusammenhang mit der Rezeptoraktivierung stehen. Dazu gehören die Rezeptoroligomerisierung und -dissoziation sowie allosterische und kooperative Effekte. Neuste Studien konnten in allen drei GPCR-Klassen Interaktionen von gleichartigen bzw. unterschiedlichen GPCR miteinander feststellen (Devi, 2001). Nach diesem erweiterten Modell können GPCR als kleinste interagierende Einheit als Monomere, Homo- oder Heterodimere oder sogar im größeren Verbund als Homo- oder Heterooligomere vorliegen. Zur Zeit ist eine Differenzierung der Verbundgröße methodisch nicht ohne weiteres möglich (Devi, 2001). Interaktionsstudien werden biochemisch mittels Immunopräzipitation und anschließender Detektion durchgeführt. Biophysikalisch erfolgt die Interaktionsstudie mittels Fluoreszenz-/Biofluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET/BRET). Dabei kann die Interaktion auf einer räumlichen Distanz der Rezeptoren zwischen 50 Å und 100 Å erkannt werden.

Seit der ersten Veröffentlichung zur Heterooligomerisierung des GABA-B-Rezeptors und der Relevanz für die Rezeptorfunktion, konnte für eine Vielzahl von GPCR die Existenz im Verbund als Homo- oder Heterooligomere nachgewiesen werden (Bouvier, 2001; George et al., 2002; Vilardaga et al., 2008). Der oligomere Zustand der Rezeptoren steht nachweislich im Zusammenhang mit den Eigenschaften der Rezeptorexpression, der Ligandenbindung, der G-Protein-Kopplung an den Rezeptor und der Rezeptorinternalisierung (Terrillon et al., 2004). Auch die GPHR konnten abhängig von ihrem Aktivierungszustand als Homooligomere nachgewiesen werden (Horvat et al., 2001; Osuga et al., 1997).

Für den FSHR konnte eine konstitutive Oligomerisierung mittels BRET-Studien gezeigt werden (Costagliola et al., 2005; Guan et al., 2010). Ein Einfluss der Rezeptoraktivierung durch den Liganden FSH auf die Oligomerisierung wurde nicht beobachtet, was darauf schließen lässt, dass eine Konformationsänderung der Hinge-Region und der SD zumindest keinen aufhebenden Einfluss auf die Rezeptor-Homooligomerisierung hat. Diese Annahme wird durch Daten aus Oligomerisierungsstudien mit konstitutiv aktiviertem FSHR unterstützt. Nicht geklärt ist in dieser Studie der Zusammenhang zwischen Ligandenbindung und

Kooperativität. Spekuliert wird ein Zwei-Hormon-Ein-Rezeptor-Szenario, wonach die Bindung des FSH an die LRRD erfolgt und die konformationelle Änderung die sekundäre Bindungsregion in der Hinge-Region für weitere GPH freigibt (Kleinau and Krause, 2009). Die Kombination von partiell defizienten Mutanten, bei dem in einem Konstrukt die Hormonbindung und bei einem zweiten die Signalisierung gestört wurde, zeigte in Studien zur intermolekularen Kooperativität bei Stimulation eine Rettung der, durch die Kombination gebildeten partiell defizienten Signalisierungseinheit, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Jeoung et al., 2007; Ji et al., 2002; Rivero-Muller et al., 2010). Dies spricht für ein Ein-Hormon-Zwei-Rezeptoren-Modell, bei dem die Hormonbindung an einem Protomer, die Signalisierung jedoch an einem benachbarten erfolgt. In diesem Zusammenhang konnte jedoch keine Korrelation zwischen Ligandenzugabe und Oligomerisierung beim FSHR festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass die Rezeptoroligomerisierung bereits im basalen Zustand stattfindet (Guan et al., 2009, 2010).

Ähnliche experimentelle Daten wurden auch für den TSHR erhoben. Es wird vermutet, dass die Oligomerisierung, wie für das Rhodopsin und das Opsin primär über die Interaktion zwischen den SD erfolgt (Liang et al., 2003). Ein Einfluss des extrazellulären Bereichs und speziell der Hinge-Region auf die Rezeptoroligomerisierung konnte zusätzlich durch den Einsatz von Deletionsmutanten nachgewiesen werden. Dabei wird die Beteiligung einzelner Regionen in der Serpentindomäne auf den allosterischen *cross-talk* des hormonbindenden extrazellulären Bereichs diskutiert (Urizar et al., 2005). Andererseits ist auch ein Szenario denkbar, indem der Ligand einerseits mit der primären Bindungsregion des ersten Protomers interagiert, andererseits mit der sekundären Bindungsregion in der Hinge-Region des benachbarten Protomers wechselwirkt (Kleinau and Krause, 2009). Dies stünde zumindest nicht im Widerspruch mit der, bei TSHR-Chimären beobachteten, negativen Kooperativität nach Ligandenzugabe (Urizar et al., 2005).

Wie auch beim FSHR konnte beim TSHR kein Zusammenhang zwischen Ligandenzugabe und Oligomerisierung festgestellt werden, was für die Rezeptoroligomerisierung im nichtaktiven Zustand an der Plasmamembran spricht. Kontrovers wird in diesem Zusammenhang der Vorgang der Rezeptordissoziation betrachtet, welcher beim TSHR nach Ligandenzugabe erfolgen soll (Latif et al., 2002).

Auch für den LHR konnte die Rezeptoroligomerisierung an der Plasmamembran nachgewiesen werden (Guan et al., 2009). Da es sich beim LHR um ein Zwei-Hormon-Ein-Rezeptor-System handelt, wurde der Einfluss beider Hormone LH und CG auf die Rezeptoroligomerisierung überprüft. Wie auch bei den übrigen GPHR

konnte kein Einfluss des Liganden auf die Rezeptoroligomerisierung festgestellt werden. Andererseits wurde gezeigt, dass im Gegensatz zu LH, die Inkubation mit CG zu einer Stabilisierung des oligomeren Zustands führt (Tao et al., 2004). Die funktionelle Oligomerisierung wurde beim LHR ausgiebig untersucht. Studien zur intermolekularen Kooperativität wurden sowohl *in vitro* (Ji et al., 2002) als auch *in vivo* (Rivero-Muller et al., 2010) durchgeführt. Die intermolekulare Kooperativität, auch als Trans-Aktivierung beschrieben, konnte für das CG nachgewiesen werden (Ji et al., 2002). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Bindung des CG an einem Protomer, die Signalisierung hingegen an dem benachbarten Protomer der Signalisierungseinheit erfolgt. Darüber hinaus wird auf der Basis von Verdrängungsstudien eine allosterische Regulation des LH innerhalb der Signalisierungseinheit diskutiert (Guan et al., 2009).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass alle drei GPHR der Oligomerisierung im basalen Zustand unterliegen. Ein direkter Einfluss des Aktivierungszustands auf den Oligomerisierungsprozess konnte nicht nachgewiesen werden. Es bleibt jedoch zu diskutieren, ob die Ligandenzugabe den oligomeren Zustand stabilisiert. Eine funktionelle Homooligomerisierung konnte für alle drei GPHR gezeigt werden. Es ist davon auszugehen, dass die GPHR als Signalisierungseinheiten funktionieren, in denen sowohl die intra- als auch intermolekulare Kooperativität für die Signalisierung eine Rolle spielt. Unklar ist weiterhin der genaue Mechanismus der intermolekularen Rezeptoraktivierung sowie der Einfluss und das Zusammenspiel des extrazellulären Bereiches und im Speziellen der Hinge-Region in diesen Prozess.

### 3. Zielsetzung

Die GPCR repräsentieren beim Menschen die größte Gruppe der signalvermittelnden Proteine. Die Rezeptoren TSHR, FSHR und LHR bilden dabei einen Subtyp der GPCR und werden als GPHR zusammengefasst. Krankheitsbilder welche durch die Beeinträchtigung der Schilddrüsenfunktion oder gonadaler Entwicklungsprozesse in Erscheinung treten, stehen in enger Relation zur Dysfunktion der entsprechenden GPHR. Die noch unklaren Ursachen einer funktionalen Störung sind der Ausgangspunkt für die Untersuchung der Rezeptoraktivierung auf molekularer Ebene.

Die Aktivierung der GPCR durch endogene Liganden wurde bislang in einem monomeren Modell beschrieben. Für die Klasse der GPCR konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass diese als Homo- oder Heterooligomere in einem Rezeptorverbund vorliegen. Auch für die GPHR konnte eine Rezeptor-homooligomerisierung zu einer gemeinsamen funktionellen Signalisierungseinheit dokumentiert werden. Der Großteil der dabei erhobenen funktionellen Daten deutet auf Rezeptorfunktionen hin, welche durch mögliche intermolekulare Interaktionen mehrerer Protomere untereinander bestimmt sind und möglicherweise auch Liganden-vermittelt erfolgen. Solche kooperativen Effekte sind mit einem monomeren Rezeptormodell nicht erklärbar.

Für die Signalinitiierung und -amplifikation während der Rezeptoraktivierung ist nachweislich der extrazelluläre Bereich und im Speziellen die Hinge-Region essentiell. Welchen Einfluss die Hinge-Region auf die intermolekularen Prozesse hat, ist unklar. Aufgrund fehlender struktureller Informationen über die Hinge-Region war eine genaue Charakterisierung der ablaufenden Prozesse während der intra- bzw. intermolekularen Signalisierung bisher nur fragmentarisch möglich.

Das generelle Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, einen detaillierteren Mechanismus für die Signalinitiierung und -amplifikation, insbesondere unter Einbezug der Hinge-Region als signalisierungssensitiven Bereich, für die GPHR abzuleiten. Dazu sollen die molekularen Determinanten für die intermolekularen Wechselwirkungen während der Rezeptoraktivierung aufgedeckt werden. In diesem Zusammenhang soll geklärt werden, inwieweit potentielle Strukturelemente der Hinge-Region in diesem Prozess involviert sein können. Es werden im Speziellen drei Hauptziele verfolgt: Ein Schwerpunkt besteht darin, Erkenntnisse über das strukturelle Profil der Hinge-Region zu gewinnen. Vordergründig soll geklärt werden, ob es sich bei der Hinge-Region um einen strukturautonomen, domänenähnlichen Bereich handelt, oder eine funktionelle Konformation intrinsisch eingenommen wird.

Dazu sollen stabile Hinge-Region Fragmente verschiedener Länge und mit unterschiedlichen Anfangs- und Endpunkten generiert werden, welche in weiterführenden Strukturuntersuchungen auf ihre strukturellen Eigenschaften hin analysiert werden können. Die Basis dieses Schwerpunktes bilden Expressionsstudien, in denen unterschiedliche Expressionsstrategien sowie Expressionswirte ausgenutzt werden sollen.

Der zweite Schwerpunkt konzentriert sich auf die Analyse der Hinge-Region hinsichtlich der Struktur-Funktions-Zusammenhänge während der hormoninduzierten Rezeptoraktivierung. Diese Untersuchung soll in zellbiologischen Studien am Beispiel des LHR erfolgen, welcher ein Zwei-Hormon-Ein-Rezeptor-System darstellt und bei dem funktionelle Unterschiede bei LH- und CG-Induktion bekannt sind. Dabei wird vermutet, dass unterschiedliche Mechanismen, vermittelt durch beide Hormone, im Zusammenhang mit strukturellen Abschnitten der Hinge-Region stehen können. Im Mittelpunkt der Studie steht eine natürlich vorkommende LHR-Mutante, in welcher die Deletion eines potentiell strukturierten Bereiches (Exon10) von 27 Aminosäuren Länge innerhalb der Hinge-Region zu unterschiedlichen funktionellen Effekten bei LH- und CG-Stimulation führt. Um den Einfluss dieser Region auf die bivalente LH- und CG-induzierte Signalisierung zu untersuchen und eine mechanistische Erklärung für die Dysfunktion der LHR-Deletionsmutante zu liefern, sollen durch geeignete Mutationen des Rezeptors potentielle Strukturelemente einerseits imitiert, andererseits gestört werden, um von den daraus resultierenden Effekten auf die Rezeptorfunktionalität zu schließen.

Das dritte Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist es, zu klären, ob die Hinge-Region einen Einfluss auf die intermolekulare Rezeptoraktivierung hat. Dies soll ebenfalls am Beispiel des LHR erfolgen, der in einem oligomeren Verbund als Signalisierungseinheit vorliegt und bei dem funktionelle Unterschiede bei der LH- und CG-induzierten Signalisierung bekannt sind. Es ist jedoch unklar, ob ein Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Aktivierungsprofilen beider Hormone und der intermolekularen Kooperativität besteht und inwieweit die Hinge-Region in diese Prozesse involviert ist. Die Studien zu dieser Fragestellung sollen unter Einbezug der oben genannten LHR-Deletionsmutante erfolgen, bei der eine Störung der LH-vermittelten intermolekularen Kooperativität vermutet wird. Im Detail soll die Frage beantwortet werden, ob die Deletion des signalisierungssensitiven Bereiches (Exon10) der Hinge-Region eine Auswirkung auf die intermolekulare Kooperativität oder die Rezeptoroligomerisierung hat und was die molekulare Ursache für den funktionellen Unterschied beider Hormone LH und CG ist.

Dies soll einerseits eine plausible Erklärung für die Rezeptorfehlfunktion der LHR-Deletionsmutante und die damit verbundenen unterschiedlichen molekularen Effekte auf LH und CG liefern und soll andererseits helfen, ein erweitertes LHR-Aktivierungsmodell zu formulieren, welches für die Weiterentwicklung gerichteter therapeutischer Eingriffe in die Funktion von LH und CG auf den LHR auf molekularer Ebene von Nutzen sein kann.

## 4. Material & Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
7-AAD	BD Biosciences, Heidelberg, D
Acrylamid 30% (Acrylamid-Bisacrylamid 37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Agar	Peqlab, Erlangen, D
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe, D
Aquasafe 300 Plus Szintillator	Zinsser Analytics, Frankfurt am Main, D
BSA	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ameisensäure	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumformiat (HCOONH <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
APS (H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe, D
BCIP (Brom-Chloro-Indolyl-Phosphat)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Biotin	Pierce, Rockford, USA
Bromphenolblau-Na-Salz	Carl Roth, Karlsruhe, D
Kalziumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Casyton (isotonische Kochsalzlösung)	CASY@ton, Innovatis AG, Reutlingen, D
Chlorwasserstoffsäure	VWR BDH Prolabo, Leuven, B
D-(+)-Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe, D
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, D
DMEM	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe, D
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe, D
Essigsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Essigsäureanhydrid	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ethanol	J.T.Baker, Deventer, NL
FKS	Invitrogen, California, US
Glyzerin	Carl Roth, Karlsruhe, D
Glyzin	Carl Roth, Karlsruhe, D
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe, D
IBMX	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Isopropanol	VWR International, Darmstadt, D
125J-cAMP-Tryrosylester	IBL, Hamburg, D
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid	J.T.Baker, Deventer, NL
Methanol	VWR International, Darmstadt, D
Natriumchlorid	VWR International, Darmstadt, D

## Material & Methoden

Natriumformiat (HCOONa)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Natriumhydrogencarbonat	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Natriumhydroxid	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
NBT(Nitroblau-Tetrazoliumchlorid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell, Dassel, D
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot, D
Pepton	AppliChem, Darmstadt, D
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Fluka, Basel, CH
Poly-L-Lysinhydrobromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
ProteinA-Sepharose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Sac-Cel anti-Kaninchen	IBL, Hamburg, D
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva, Heidelberg, D
TEMED ( <i>N,N,N,N</i> -Tetramethylethylenediamine)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Triethylamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Tris-HCl	Carl Roth, Karlsruhe, D
TritonX-100	Carl Roth, Karlsruhe, D
Trypton	AppliChem, Darmstadt, D
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe, D
Lambda DNA	New England Biolabs, GB
Protein Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot, D

### 4.1.2 Geräte

Geräte	Hersteller
Blotkammern	Biorad, D
Brutschränke	Binder, Camariilo, USA
Clean-Bench	BDK Luft- und Reinraumtechnik,
Deckgläser	Menzel, Braunschweig, D
Durchflusszytometer FACSCanto II	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Elektrophorese Kammern	Bio-Rad Laboratories, München, D
Feinwaage	Mettler Toledo, Greifensee, CH
Fluoreszenzmikroskop Leica DMLB	Leica Camera, Solms, D
Gefrierschränke -80°C	New Brunswick Sciences, Nürtingen, D
Gefrierschränke -20°C	Liebherr, Biberach an der Riß, D
Glaswaren (Kolben, Pipetten, etc.)	Schott, Mainz, D
Heizplatte	Kiko Werke, Staufen, D
Horizontalschüttler	New Brunswick Sciences, Nürtingen, D
Kühlschränke	Liebherr, Biberach an der Riß, D
Magnetrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen, D
Mikroskop	Carl Zeiss, Göttingen, D
Mikrowelle	Tefal
Objektträger	Menzel GmbH, Braunschweig, D
Parafilm	Laboratory Film, Chicago, USA
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
pH-Messgerät	
Pipettierhilfe	Integra Biosciences, Fernwald, D

## Material & Methoden

Pipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Pipetten (5, 10, 25 ml)	TPP, Zürich, CH
Pipettenspitzen (10, 200, 1.000 µl)	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettierroboter Plato	Zinsser Analytics, Frankfurt am Main, D
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, D
Reinstwasseranlage, Typ MilliQ plus	Fa. Millipore, Schwalbach, D
Kartuschen	Waters GmbH, Eschborn, D
Spannungsquellen	Pharmacia Biotech
Thermocycler	Eppendorf, Hamburg, D
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifugen: MiniSpin plus	Eppendorf, Hamburg, D
Vakuumpzentrifugen	Christ, Osterode, D
Vortexer	Janke & Kunkel, Staufen, D
Waage	Sartorius AG, Göttingen, D
Wasserbad	GFL, Burgwedel, D
Zellkultur Testplatte	TPP, Zürich, CH
Zellkulturflaschen	TPP, Zürich, CH
Zellkulturschalen (10 cm)	Greiner bio-one, Frickenhause, D
Zellzählgerät	Casy®1, Stuttgart, D
Zentrifugen	Beckman, Biomedical Research, Krefeld, D
Zentrifugengefäße	Beckman, Biomedical Research, Krefeld, D
Äkta FPLC	GE Healthcare, GB
Nanodrop	Thermo Scientific, CH
UV Transilluminator	INTAS Science Imaging, Göttingen, D
SDS GEL Dokumentationsanlage	INTAS Science Imaging, Göttingen, D

### 4.1.3 Kits

Kits	Hersteller
Mini Kit	Macherey & Nagel, Düren, D
Midi Kit	Macherey & Nagel, Düren, D
<i>Pichia P. expressions Kit</i>	Invitrogen, California, US
<i>EasySelect Pichia Expression Kit</i>	Invitrogen, California, US
<i>Ampli Kit</i>	Novazym, Poznan, PL
<i>Quick ligase Kit</i>	New England Biolabs, GB

### 4.1.4 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Primärer Maus Anti-Penta-His-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, California, US
Sekundärer Kaninchen Anti-Maus Antikörper (HRP)	Santa Cruz Biotechnology, California, US
Kaninchen-anti-cAMP-Succinimidyl-Protein-Konjugat	Hauseigener Antikörper
Ziege-Anti-Kaninchen IgG, AP-konjugiert	Clontech, Heidelberg, D

### 4.1.5 Software

Software
MS-Office, Vector-NTI, Gene Runner, Graphpad Prism v.5.0, FCS Express, Photofilter, Pymol

### 4.2 Oligonukleotide

Die zur Sequenzierung oder zur Klonierung verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma BioTez Berlin-Buch GmbH bezogen.

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
39_40_HL8_fw	AGT ACT TAC CCC AGC CAC TGC TGT GCT
39_40_HL8_rev	CTC GAG CTA ATC TTC ACA GGG ATT AAA AGC
22_HL8_fw	GGA TCC TAC TTA CCC CAG CCA CTG CTG T
22_HL8_rev	CTC GAG ATC TTC ACA GGG ATT AAA AGC
PICaATSHREH_fw	ATA CTC GAG AAG AGA ATG AGG CCG GCG GAC TTG CTG
PICbTSHREH_fw	ATA GAATC ATG AGG CCG GCG GAC TTG CTG
PICB/aATSHREH_rev	CGG TCT AGA at ACT ACC ACG AGG AAC CAA CTT GTA GCC CAT TAT GTC TTC
TSHR_gen_fw	CTA GCT CGA GAA AAG AAT GAG GCC GGC GGA C
single_Tm_rev	CTA GTC TAG ATG GGT GAG GAG AAT AAG CAG G
TSRH_GFP_rev	CTA GTC TAG ATG CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC
TSHR_rev	CTA GCT CGA GAA AAG AAT GAG GCC GGC GGA C
TSHR_TMD_GFP_fw	CTT ATT CTC CTC ACC GCC GTT GGG GAT CCA C
TSHR_TMD_GFP_rev	TGG ATC CCC AAC GGC GGT GAG GAG AAT AAG CAG GA
PICZBTSHREH_Mut_fw	GAA GGA ACT GAT AGC AAG AAA CAC CAT TGA TGG TAG AAA ACT TCC ACT TTC CTT GAG TTT CC
PICZBTSHREH_Mut_rev	GGA AAC TCA AGG AAA GTG GAA GTT TTC TAC CAT CAA TGG TGT TTC TTG CTA TCA GTT CCT TC
PICBTSHREH_SOE_rev	TTT TCT ACC ATC AAT GGT GTT TCT TGC TAT
PICbTSHREH_SOE_fw	ACC ATT GAT GGT AGA AAA CTT CCA CTT TCC
GFP_rev	TTG TTC TAG AAT CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC
GFP_SOE_fw	TTG GTT CCT CGT GGT AGT GGA GTT GGG GAT CCA
TSHRXA_fw	CTA GCT CGA GAA AAG AAT GAG GCC GGC GGA C
TSHRXA_rev	CTA GTC TAG ATG TCT ACC TTC GAT CAA AAC CGT TTG CAT ATA C
TSHRTMD_fw	CTA GCT CGA GAA AAG AAT GAG GCC GGC GGA C
TSHRTMD_rev	CTA GTC TAG ATG GGT GAG GAG AAT AAG CAG G
LHCGR_fw	GAC GGT ACC ATG AAG CAG CGG TTC TCG
LHCGR_rev	GGT GGA TCC GTA CAC TCT GTG TAG CGA GT
LHCGRSt_rev	GGT GGA TCC CTA ACA CTC TGT GTA GCG AGT
LHCGR_Ex10_fw	TAT TCT TCC ATG CTT GCT GAG AGT GAA CTG
LHCGR_Ex10_rev	CAT GGA AGA ATA TTC TTT TGT TGG CAA GTT
LHCGR_TMDmut_fw	CTT ATC ACA GTA <u>ACG</u> AAC TCT <u>GAG</u> GTT TTA CTG GTT CTT
LHCGR_TMDmut_rev	AAG AAC CAG TAA AAC <u>CTC</u> AGA GTT <u>CGT</u> TAC TGT GAT AAG
LHCGR_C131R_fw	AAA ATA CTT GAG CAT <u>CAG</u> GAA CAC AGG CAT CAG AA
LHCGR_C131R_rev	TTC TGA TGC CTG TGT <u>TCC</u> TGA TGC TCA AGT ATT TT
LHCGR_K605E_fw	TTA TCA CAG <u>TGA</u> CCA ACT CT <u>G</u> <u>AGG</u> TTT TAC TGG TTC TTT TTT A

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
LHCGR_K605E_rev	TAA AAA AGA ACC AGT AAA ACC <u>TCA</u> GAG TTG <u>GTC</u> ACT GTG ATA A
LHCGR1296P_fw	CAG AAT TTT TCA CAT TCC <u>CCT</u> TCT GAA AAC TTT TCC AA
LHCGR1296P_rev	TTG GAA AAG TTT TCA GAA <u>GGG</u> GAA TGT GAA AAA TTC TG
LHCGRV308P_fw	CCA AAC AAT GTG AAA GCA <u>CAC</u> <u>CCA</u> GGA AAG TGA ATA ACA AAA C
LHCGRV308P_rev	GTT TTG TTA TTC ACT TTC CT <u>G</u> <u>GGT</u> GTG CTT TCA CAT TGT TTG G
LHR_303P305P_fw	AAC TTT TCC AAA <u>CCA</u> TGT <u>CCA</u> AGC ACA
LHR_303P305P_rev	TGT GCT <u>TGG</u> ACA <u>TGG</u> TTT GGA AAA GTT
LHR_M320P_fw	TAT TCT TCC <u>CCC</u> CTT GCT GAG AGT
LHR_M320P_rev	CAG TTC ACT CTC AGC AAG <u>GGG</u> GGA
LHR_Ala-6_fw	GCT GCA GCA GCC GCG GCC GCA GAA CTG AGT GGC TGG
LHR_Ala-6_rev	TGC GGC CGC GGC TGC TGC AGC ATA AAG TGT TTT GTT
E10_V308P_fw	AAA CAA TGT GAA AGC ACA <u>CCC</u> AGG AAA
E10_V308P_rev	GTT ATT CAC TTT CCT <u>GGG</u> TGT GCT TTC
hTSHR xNsil for 2	GAC AGT TAT TGA CAA AGA CGC GTT TGG AGG AGT ATA CAG
hTSHR xNsil rev 1	CTG TAT ACT CCT CCA <u>AAC</u> <u>GCG</u> TCT TTG TCA ATA ACT GTC
hTSHR for 1	ATG CAT GCG GCG CGC CGT TCA ATC CCT GTG AAT GCT TTT CAG GGA CTA TGC
hTSHR rev 2	ATG CAT GCG CGG CCG CGT CAA TAC ACC GAT AAC TCG CTT GCA AAG ACA GTG AAG AAA C
LHCGR_MCS_fw	TTT AGT GAA CCG TCA
LHCGR_Sec_2	TTC CGT GGG GCC ACA GGG
LHCGR_Sec_3	GAA CTT TCT GTC TAC ACC
5'AOX1	GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC
3'AOX1	GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC

### 4.3 Puffer und Lösungen

Alle routinemäßig verwendeten Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, nach (Sambrook and Russell, 2001) oder nach Herstellerangaben in doppelt destilliertem Wasser angesetzt.

### 4.4 Plasmide

Der für die Klonierungen verwendete *Shuttlevektor p79* wurde in eigener Arbeit hergestellt.

Bezeichnung	Merkmale	Hersteller
<i>p79</i>	pUC 19 Derivat; Ampicillin-/Kanamycin-Resistenz	eigene Anfertigung

Die Ausgangsplasmide für die heterologe Proteinexpression in *E. coli* liegen dem *pET*-Expressions-System zugrunde und wurden von der Firma Novagen bezogen.

## Material & Methoden

Bezeichnung	Merkmale	Hersteller
<i>pET-22b</i>	T7lac Promoter; <i>peB</i> Signalsequenz; C-term.6xHis-Tag; Ampicillin-Resistenz	Novagen, D
<i>pET-30 EK/LIC</i>	T7 promoter; N-term.6xHis-Tag; Kanamycin-resistenz	Novagen, D
<i>pET-32 EK/LIC</i>	T7lac promoter; Thioredoxin Fusion; N-term.6xHis-Tag; Ampicillin-Resistenz	Novagen, D
<i>pET-39</i>	T7lac promoter; <i>DsbA</i> fusion; 6xHis-Tag Kanamycin-resistenz	Novagen, D
<i>pET-40</i>	T7lac promoter; <i>DsbC</i> fusion; N-term.6xHis-Tag; Kanamycin-Resistenz	Novagen, D
<i>pET-41 EK/LIC</i>	T7lac promoter; GST fusion; N-term.6xHis-Tag; Kanamycin-Resistenz	Novagen, D

Die Ausgangsplasmide für die heterologe Proteinexpression in *P. pastoris* liegen dem *Easy Select Pichia Pastoris Expression Kit* zugrunde (Invitrogen).

Bezeichnung	Merkmale	Hersteller
<i>pPICZαA</i>	AOX promoter; α-Faktor Signalsequenz; C-term.6xHis-Tag; Zeocin-Resistenz	Invitrogen, US
<i>pPICZB</i>	AOX promoter; C-term.6xHis-Tag; Zeocin-Resistenz	Invitrogen, US

Die Ausgangsplasmide für zellbiologische Applikationen wurden von der Firma Clontech erworben.

Bezeichnung	Merkmale	Hersteller
<i>pEGFP-N1</i>	GFP fusion, Kanamycin-Resistenz CMV promotor; SV40	Clontech, US
<i>pmCherry-N1</i>	mCherry fusion; Kanamycin-Resistenz CMV promotor; SV40	Clontech, US

## 4.5 Organismen

### Bakterien-Stämme

#### *Escherichia coli*-Stämme

Bezeichnung	Genotyp	Hersteller
DH5 $\alpha$	supU44 DU169 [fi 80 lacZ D M15], <i>hsdR1, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	Novagen, D
BL21(DE3)	F– <i>ompT hsdSB (rB– mB–) gal dcm (DE3)</i>	Novagen, D
BL21(DE3)pLysS	F– <i>ompT hsdSB (rB– mB–) gal dcm (DE3)</i> pLysS (CamR)	Novagen, D
Rosetta™2(DE3)	F– <i>ompT hsdSB (rB– mB–) gal dcm (DE3)</i> pRARE2 (CamR)	Novagen, D
Rosetta-gami B(DE3)	F– <i>ompT hsdSB(rB– mB–) gal dcm lacY1</i> <i>aphC (DE3) gor522::Tn 10 trxB pRARE2</i>	Novagen, D
SHuffle T7	F- <i>lac pro lacI<sup>f</sup> / <math>\Delta</math>(ara-leu)7697 araD13 fhuA2</i> <i>lacZ::T7 gene1 <math>\Delta</math>(phoA)Pvull phoR ahpC*</i> <i>galE (or U) galK <math>\lambda</math>att::pNEB3-r1-cDsbC</i> (Spec <sup>R</sup> , <i>lacI<sup>f</sup></i> ) $\Delta$ <i>trxB rpsL 150(Str<sup>R</sup>)<math>\Delta</math>gor<math>\Delta</math>(malF)3</i>	New England Biolabs, GB

#### *Pichia pastoris*-Stämme

Bezeichnung	Genotyp	Hersteller
X-33	<i>Pichia Pastoris</i> Wildtyp	Invitrogen, US

### Zelllinien

Bezeichnung	Merkmale	Hersteller
HEK 293	Humane embryonale Nierenzellen, transformiert mit dem Adenovirus Typ 5, (DSMZ-Nr. ACC 305)	DSMZ, D

## 4.6 Allgemeine Methoden

### 4.6.1 Molekularbiologische Methoden

#### 4.6.1.1 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Plasmidisolierung wurde das Plasmid-Extraktions Kit *NucleoSpin Plasmid* bzw. für größere Plasmid-DNA Mengen das *NucleoBond Xtra Midi* von Macherey Nagel, Düren verwendet. Während die Plasmidisolierung beim Mini-Kit *NucleoSpin Plasmid* auf der Verwendung von Silicamatrix Säulchen beruht, wird die Plasmid-DNA beim Midi-Kit *NucleoBond Xtra Midi* weitgehend durch Ethanolfällung gewonnen. Die Plasmidisolierung erfolgte stets gemäß den Angaben des Herstellers.

#### 4.6.1.2 Präparation von genomischer DNA aus *Pichia pastoris* (*P. pastoris*)

Die Isolierung genomischer DNA aus *P. pastoris* erfolgte nach dem Protokoll von Hoffman und Winston, 1987. 10 ml YPD Medium wurden mit einer *P. pastoris* Kolonie beimpft und über Nacht bei 30°C und 250 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Zellen geerntet und in 0,5 ml *aqua dest.* gewaschen. Der Überstand wurde bei  $4 \times 10^3 \times g$  zentrifugiert. Zu den Zellen wurde 200 µl Lysis-Puffer, 200 µl Phenol-Chlorophorm-Lösung (Phenol:Chlorophorm:Isoamylalkohol 25:24:1) sowie 0,3 g säurebehandelte Glasperlen hinzugefügt und 3-5 mal 3 min gevortext. Anschließend wurde 200 µl TE-Puffer hinzugefügt, vorsichtig durchmischt und die wässrige Phase abgenommen. Zur wässrigen Phase wurde 1 ml 100% Ethanol hinzugefügt und vorsichtig durchmischt. Die Probe wurde 2 min bei  $2 \times 10^4 \times g$  zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 400 µl TE Puffer und 4 µl RNase (25 mg/ml) aufgelöst.

Lysis-Puffer:		TE-Puffer		YPD Medium	
SDS	1%	Tris-HCL (pH 7.6)	10 mM	Pepton	2%
NaCl	1 M	EDTA	1 mM	Hefeextrakt	1%
EDTA	1 mM			Dextrose	2%
Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM				
	20				
Triton X-100	ml/Liter				

#### 4.6.1.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Ermittlung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch mittels NanoDrop. Es wurde die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen. Dabei entspricht die gemessene Amplitude der DNA-Menge. Das Verhältnis der Absorption 260 nm zu 280 nm gibt den Grad der Reinheit der DNA wieder. Der Wert 1,8 ist anzustreben.

#### 4.6.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse von DNA-Fragmenten wurde mittels Gelelektrophorese (1% Agarose) in 1 x TAE-Puffer bei 80 V und 220 mA durchgeführt.

Die Anfärbung der Gele erfolgte mit Ethidiumbromid (10 mg/ml), die Visualisierung durch ultraviolette Illumination. Die Länge der DNA-Fragmente wurde mit Hilfe eines eigens angefertigten und mitgeführten Größenstandards ( $\lambda$ -*EcoRI/HindIII*) ermittelt.

##### TAE-Puffer (50x)

Essigsäure	1 M
EDTA	50 mM
Tris-HCl (pH 8.5)	2 M

#### 4.6.1.5 Nukleinsäureaufreinigung

Die Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Extraktion aus dem Agarosegel nach Heery et al. (1990) und anschließender Aufkonzentrierung durch Ethanolfällung.

#### 4.6.1.6 Restriktionsverdau und Ligation von Plasmid-DNA

Die Restriktion von DNA erfolgte gemäß Herstellerangaben im 15  $\mu$ l Ansatz. Für präparative Anwendungen erfolgte die Restriktion im 50  $\mu$ l Ansatz. Die Ligationen wurden in einem 20  $\mu$ l Ansatz mit einem Vektor-Insert-Verhältnis von 1 : 3 durchgeführt. Die Ligationsreaktion erfolgte gemäß Herstellerangaben für das *NEB Quick-Ligation Kit*, eine Stunde bei RT. Der Ligationsansatz wurde anschließend unmittelbar zur Transformation verwendet.

#### 4.6.1.7 Sequenzierung

Die zur Sequenzüberprüfung durchgeführten Plasmidsequenzierungen wurden von der Firma Stratec Molecular (Berlin) durchgeführt. Dazu wurden ein *ABI Prism-Dye-*

Terminator-System (Big Dye / FS-Kit, Perkin Elmer) und ein *TrioThermoblock* (Biometra) benutzt. Die Auswertung der Sequenzierungsdaten erfolgte mit den Programmen *Chromas* und *Vector NTI*.

#### 4.6.1.8 Polymerase chain reaction (PCR)

Die Amplifizierung aller in dieser Arbeit erwähnten DNA-Fragmente wurde in einem *Thermocycler* der Firma Eppendorf durchgeführt. Die PCR wurde, falls nicht anders erwähnt, in einem 50 µl Ansatz durchgeführt.

Reaktionsansatz		Programm		
Komponente	Volumen (µl)	Temperatur [°C]	Zeit [min]	
Template-DNA	50 ng	94	2	x 5
Puffer (10x)	5	60	1	
dNTPs(25 mM mix)	1	72	1.000 kb/min	
Primer1 (50 µM)	1	94	0,30	x 15
Primer2 (50 µM)	1	55	1	
DMSO	3	72	1.000 kb/min	
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3	72	10	
Taq Polymerase	1	4	end	
Wasser	34			
Total	50			

#### 4.6.1.9 Splicing by overlap extension PCR (SOE-PCR)

Zur Konstruktion von Deletionsmutanten bzw. Insertion oder Austausch mehrerer Aminosäuren wurde die *SOE-PCR* verwendet. In dieser Zwei-Schritt-PCR wurden zunächst zwei Amplifikate mittels konventioneller PCR hergestellt. Die Primer der ersten Reaktion wurden jeweils so gewählt, dass die entstehenden Amplifikate am 3' bzw. 5'-Ende einen sich überlappenden Bereich vorweisen. Die Amplifikate der ersten Reaktion wurden anschließend isoliert und als Starter in der zweiten PCR verwendet, indem die, durch die Hybridisierung der überlappenden Region resultierenden 3'OH-Enden, mit Desoxynukleotiden verlängert wurden. Das entstandene rekombinante DNA-Molekül konnte dann durch die konventionellen Primer im Reaktionsansatz vervielfältigt werden.

**Reaktionsansatz**

Komponente	Volumen (µl)
SOE-Amplif.1	100 ng
SOE-Amplif.2	100 ng
Puffer (10x)	5
dNTPs(25 mM mix)	1
Primer1 (50 µM)	1
Primer2 (50 µM)	1
DMSO	3
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3
Taq Polymerase	1
Wasser	32
Total	50

**Programm**

Temperatur [°C]	Zeit [min]	
94	0,30	x 16
94	0,30	
55	1	
72	1.000 kb/min	
72	10	
4	end	

**4.6.1.10 Zielgerichtete Mutagenese**

Zur Einführung von Punktmutationen in die Gensequenz wurde die *Invers-PCR* verwendet. Dabei wurde ein komplementäres Primerpaar generiert, welches die Mutation trägt. Anschließend wurde in einer PCR das gesamte Plasmid synthetisiert. Zu beachten ist die Verwendung einer Polymerase ohne 5'-3' Exonukleaseaktivität. Das Template, welches methyliert im Reaktionsansatz vorliegt, wurde nach der PCR mit dem Restriktionsenzym *DpnI* 3 Stunden bei 37°C verdaut und anschließend in den *E. coli*-Stamm DH5α transformiert.

**Reaktionsansatz**

Komponente	Volumen (µl)
template-DNA	50 ng
Puffer (10x)	5
dNTPs(25 mM Mix)	1
Primer1 (50 µM)	1
Primer2 (50 µM)	1
DMSO	3
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3
KOD Polymerase	1
Wasser	34
Total	50

**Programm**

Temperatur [°C]	Zeit [min]	
94	2	x 16
94	0,30	
55	1	
68	1.000 kb/min	
72	10	
4	end	

#### 4.6.1.11 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung der nach der Transformation erhaltenen Klone, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dabei wurden die gesamten Transformanten (*E. coli*) oder die zugehörige DNA isoliert (*P. pastoris*). Der PCR-Ansatz (25 µl) wurde hinzugefügt und die Kolonie-PCR nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Reaktionsansatz		Programm		
Komponente	Volumen (µl)	Temperatur [°C]	Zeit [min]	
Kolonie		94	5	
Puffer (10x)	2,5	94	0,30	x 16
dNTPs (25 mM Mix)	0,5	55	1	
Primer1 (50 µM)	0,5	72	1.000 kb/min	
Primer2 (50 µM)	0,5	72	10	
DMSO	1,5	4	end	
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5			
Taq Polymerase	0,5			
Wasser	17,5			
Total	25			

#### 4.6.2 Mikrobiologische Methoden

##### 4.6.2.1 Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli* (*E. coli*)

Die kompetenten *E. coli* wurden nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode hergestellt. Aus einem Bakterien-Glycerinstock wurde ein Reinheitsausstrich auf einer LB-Agarplatte vorgenommen und diese anschließend bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. 0,3 Liter LB-Medium wurden am darauf folgenden Tag mit 2 ml Übernachtskultur beimpft. Die Kultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,02 unter Schütteln (165 rpm) bei 37°C inkubiert, dann 5 min auf Eis gekühlt und anschließend 10 min bei 3.500 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 20 ml eiskalter glyzerinfreier CaCl<sub>2</sub>-Lösung (100 mM) resuspendiert. Die Zellen wurden 90 s auf Eis stehen gelassen und anschließend 10 min bei 3.500 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zellpellet in 2 ml eiskalter, glyzerinhaltiger CaCl<sub>2</sub>-Lösung (15% v/v)

resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### 4.6.2.2 Transformation kompetenter *E. coli*

Die Transformation von kompetenten *E. coli* erfolgte mittels Hitzeschock. 50 µl CaCl<sub>2</sub>-kompetenter Zellen wurden mit dem Ligationsansatz bzw. 50 ng Plasmid-DNA vermennt und 30 min auf Eis stehen gelassen. Die Zellen wurden 90 s einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und mit 500 µl vorgewärmtem LB-Medium versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurden jeweils 100 µl des Transformationsansatzes auf den entsprechenden LB-Selektionsplatten ausplattiert. Diese wurden bei 37°C über Nacht inkubiert.

##### **LB-Medium (1 Liter)**

---

Bacto-Trypton	1%
NaCl	1%
Hefeextrakt	0,5%

#### 4.6.2.3 Heterologe Proteinexpression in *E. coli*

Für die heterologe Proteinexpression in *E. coli* wurden zunächst Expressionsstudien im 5 ml-Maßstab in LB-Medium durchgeführt. Für präparative Zwecke wurde wahlweise in LB-Medium bzw. für die <sup>15</sup>N-Markierung in Minimalmedium in einem 1 Liter Maßstab gearbeitet. Zunächst wurde eine Übernachtskultur angesetzt, indem frisches selektierendes Medium mit einer entsprechenden transformierten Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C und 175 rpm geschüttelt wurde. Die Übernachtskultur wurde 100-fach in frischem selektierendem Medium verdünnt und bis zur einer OD<sub>600</sub> von 0,6 kultiviert. Anschließend wurde die Proteinexpression mittels Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Die Proteinexpression erfolgte 16 Stunden lang bei 175 rpm. Bei den Expressionsstudien wurden verschiedene IPTG-Konzentrationen (0,1 mM bis 1 mM) sowie verschiedene Expressionstemperaturen (16°C-37°C) getestet. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation bei 4.500 x g geerntet und das Zellpellet bei -80°C eingefroren.

M9 Salz (10x)		Minimal M9-Medium		Spurenelemente	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,5)	450 mM	Spurenelemente	1%	EDTA	17 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,5)	150 mM	MgSO <sub>4</sub>	1 mM	Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3 mM
NaCl	85 mM	CaCl <sub>2</sub>	0,3 mM	ZnCl <sub>2</sub>	0,3 mM
		M9-Salz (10x)	10%	Cu <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,03 mM
		Thiamin	4.5 µM		
		Biotin	6 µM		
		Glukose	0,4%		
		NH <sub>4</sub> Cl	0,1%		

#### 4.6.2.4 Herstellung chemisch kompetenter *P. pastoris*

Die Herstellung von chemisch kompetenten *P. pastoris* wurde mittels *EasyComp Kit* von Invitrogen nach Herstellerangaben durchgeführt.

Aus einem *P. pastoris* X-33 Glycerinstock wurde zunächst ein Reinheitsausstrich auf einer YPD-Agarplatte vorgenommen und für 2 Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 10 ml YPD-Medium mit einer Einzelkolonie des *P. pastoris* Stammes X-33 beimpft und über Nacht bei 30°C und 250 rpm geschüttelt.

Die Zellen wurden dann auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1-0,2 in 10 ml YPD Medium eingestellt und bis zur einer OD<sub>600</sub> von 0,6-1,0 bei 30°C und 250 rpm kultiviert. Die Zellen wurden anschließend durch 5-minütige Zentrifugation bei 500 x g geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml *Solution I* resuspendiert.

Die Zellsuspension wurde aliquotiert und in einer Styroporbox langsam auf -80°C abgekühlt und gelagert.

**Solution I:** *Easy Select Pichia pastoris Expressions Kit*, Invitrogen

#### 4.6.2.5 Transformation kompetenter *P. pastoris*

Für die Transformation chemisch kompetenter *P. pastoris* wurde das *EasyComp Kit* von Invitrogen nach Herstellerangaben verwendet.

Für die Transformation mit Plasmid-DNA wurden 50 µl kompetenter *P. pastoris* X-33 Zellen bei RT aufgetaut. 3 µg des linearisierten Expressionsvektors wurde zu den Zellen beigemischt. Nach anschließender Zugabe von 1 ml *Solution II* wurde das Reaktionsgefäß kurz durchmischt. Der Reaktionsansatz wurde dann 1 Stunde bei

30°C inkubiert, wobei nach jeweils 15 min der Ansatz erneut kurz gemischt wurde. Die Zellen wurden anschließend einem Hitzeschock von 10 min und 42°C ausgesetzt. Nach dem Hitzeschock wurde dem Reaktionsansatz 2 ml YPD Medium hinzugefügt und für eine Stunde bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden dann bei 3.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml *Solution III* gewaschen und anschließend in 150 µl *Solution III* aufgenommen und auf YPDSZ Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden anschließend für 3-10 Tage bei 30°C inkubiert.

**Solution II:** *Easy Select Pichia pastoris Expressions Kit*, Invitrogen

**Solution III:** *Easy Select Pichia pastoris Expressions Kit*, Invitrogen

#### **4.6.2.6 Determinierung des *P. pastoris* X-33 Phänotyps Mut<sup>+</sup>/ Mut<sup>S</sup>**

Zur Determinierung des Phänotyps der *P. pastoris* X-33-Transformanten wurden diese, jeweils auf Minimal-Dextrose (MD)- und Minimal-Methanol (MM)-Agarplatten ausgestrichen und für weitere zwei Tage bei 30°C inkubiert. Die durch rekombinante Geninsertion entstandenen Mut<sup>+</sup> Transformanten zeigen auf beiden Medien gleich gutes Wachstum, während die durch rekombinanten Genaustausch entstandenen Mut<sup>S</sup> Transformanten auf MM-Agarplatten sehr eingeschränktes Wachstum zeigen.

#### **4.6.2.7 Selektion von *P. pastoris* X-33 multicopy Transformanten**

Um einen Hochproduzenten für die heterologe Proteinexpression zu finden, wurden die *P. pastoris* X-33 Transformanten auf YPD-Agarplatten mit ansteigender Zeocin-Konzentration (bis 2.000 µg/ml) ausplattiert. Die drei Klone, die das stärkste Wachstum zeigten, wurden für die weitere heterologe Proteinexpression ausgewählt.

#### **4.6.2.8 Heterologe Proteinexpression in *P. pastoris***

Die heterologe Proteinexpression in *P. pastoris* erfolgte nach Angaben des *Easy Select Pichia Expression Kit* von Invitrogen.

In einer Vorkultur wurden die transformierten *P. pastoris* Klone in BMGY-Medium bei 30°C und 250 rpm bis auf eine Zelldichte von OD<sub>600</sub> 2-6 kultiviert. Die Zellen wurden

anschließend mit BMMY-Medium auf eine Zelldichte von  $OD_{600}=1$  verdünnt. Die Induktion erfolgte mit 0,5% Methanol als Endkonzentration, alle 24 Stunden.

Die Proteinexpression erfolgte über 3 Tage, wobei nach regelmäßigen Abständen (alle 8 Stunden) Proben für die SDS-PAGE entnommen wurden. Nach drei Tagen wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Der Überstand wurde aufkonzentriert und bis zur Präparation bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

BMGY-Medium		BMMY-Medium	
Pepton	2%	Pepton	2%
Hefeextrakt	1%	Hefeextrakt	1%
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 6,0)	100 mM	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 6,0)	100 mM
<i>Yeast-Nitrogen-Base</i>	1.34%	<i>Yeast-Nitrogen-Base</i>	1.34%
Biotin	$4 \times 10^{-5}\%$	Biotin	$4 \times 10^{-5}\%$
Glyzerin	1%	Methanol	0.5%

### 4.6.3 Zellbiologische Methoden

#### 4.6.3.1 Kultivierung von HEK 293-Zellen

HEK 293-Zellen wurden in *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) und 10% zugewasstem fetalen Kälberserum (FKS) bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  kultiviert. Die Umsetzung erfolgte durch Ablösen der Zellen mittels Trypsin/EDTA-Lösung und anschließender Aufnahme im Kultivierungsmedium. Je nach Experiment wurde die benötigte Zelldichte in die entsprechenden Kultivierungsschalen ausgesät.

DMEM-Medium		Trypsin/EDTA-Lösung	
$\text{Na}_2\text{HCO}_3$	20 mM	Trypsin	0,05%
FKS	10%	EDTA	0,02%
in DMEM (pH 7,2)		in PBS	

#### 4.6.3.2 Transiente Transfektion von HEK 293-Zellen

Die transiente Transfektion der HEK 293-Zellen erfolgte 24 Stunden nach der Zellaussaat mittels Polyethylenimin (PEI) gemäß der Herstellerangaben. Das

Transfektionsreagenz (PEI) wurde in einem Mengenverhältnis 2:1 mit der zu transfizierenden DNA vermengt und nach 30 min Inkubationszeit bei RT auf die Zellen gegeben. Folgender Transfektionsmaßstab wurde verwendet:

Kultivierungsgefäß	Zellanzahl	DNA-Menge (Total)
100 mm	$8,0 \times 10^6$	12 µg
35 mm	$2,0 \times 10^5$	2,0 µg
12 mm	$7,5 \times 10^4$	0,8 µg

#### 4.6.3.3 Durchflusszytometrie (FACS)

Zur Überprüfung der Gesamtexpression der mit Fluoreszenzprotein- (GFP oder mCherry) fusionierten Rezeptorvarianten wurden die transfizierten *HEK 293*-Zellen mittels FACS vermessen. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die *HEK 293-Zellen* mittels 1 mM EDTA in PBS abgelöst. Die Zellen wurden 3 min bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Nach dreimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen zur Messung in PBS resuspendiert. Zum Ausschluss toter Zellen wurde 7-AAD zur Lösung hinzugefügt. Die Fluoreszenzintensität von mindestens  $1 \times 10^4$  Zellen wurde pro Probenansatz am Durchflusszytometer *FACS Canto II* von *Becton Dickinson* gemessen. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Programm *FCS Express* aus mindesten drei unabhängigen Experimenten.

PBS-Puffer		FACS-Puffer
NaCl	137 mM	PBS + 0,5% BSA
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,1 mM	

#### 4.6.4 Pharmakologische Methoden

##### 4.6.4.1 cAMP-Akkumulations-Assay

Zur Bestimmung der Signalisierungseigenschaften der verwendeten Rezeptorvarianten wurde ein cAMP-Akkumulations-Assay durchgeführt. Um eine konstante Expression in transient-transfizierten Zellen zu erreichen, wurde folgendes Protokoll zur Transfektion und Expression verwendet: Für den cAMP-Akkumulations-

Assay wurden  $8 \times 10^6$  HEK 293-Zellen je 100 mm Zellkulturgefäß mit 12 µg Gesamt-DNA transfiziert. Nach 24 Stunden erfolgte die Zellaussaat in mit Poly-L-Lysin beschichteten 24-well-Platten zu je 75.000 Zellen pro well. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen zunächst mit DMEM gewaschen und anschließend in einem Inkubator eine Stunde lang bei 37°C mit Stimulationspuffer alleine bzw. mit ansteigender Konzentration des entsprechenden Hormons (LH 14.000 IU/mg oder CG 5.000 IU/mg) stimuliert. Daraufhin wurde das Medium entfernt und die Zellen mit Extraktionspuffer für 30 min bei 4°C inkubiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und für 10 min bei 95°C erhitzt. Die Proben wurden in einem Rotationsverdampfer getrocknet und für den Radioimmunoassay (RIA) im RIA-Puffer aufgenommen und für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (15 min, 23.000 x g, 4°C) wurden die Überstände abgenommen und vorverdünnt. Die vorverdünnten Proben sowie die cAMP-Standards wurden zur Erhöhung der Sensitivität der Messung acetyliert. Die acetylierten Proben sowie cAMP-Standards wurden mit  $^{125}\text{J}$ -cAMP-Tyrosylmethylester (10.000 cpm) und polyklonalem Kaninchen-anti-cAMP-Antiserum (Endverdünnung 1:160.000) versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Trennung von freien und antikörpergebundenen cAMP wurde den Proben Zellulose-konjugiertes Schaf-anti-Kaninchen-IgG (Sac-Cel anti-Kaninchen) beigefügt und der Ansatz für 40 min bei 4°C inkubiert. Das Präzipitat wurde mit RIA-Puffer gewaschen und bei 4.200 x g und 4°C zentrifugiert. Die Stärke der Radioaktivität des Bodensatzes wurde in einem  $\gamma$ -Counter gemessen.

Die Daten wurden anschließend mit dem Programm *GraphPad Prism* analysiert, indem eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve nach iterativer nicht linearer Regression erstellt wurde. Als charakteristische Parameter wurden die  $\text{EC}_{50}$  Werte sowie die  $\text{cAMP}_{\text{max}}$  Werte ausgelesen.

Stimulations-Puffer		Extraktions-Puffer		RIA-Puffer:	
HEPES	10 mM	Trifluoressigsäure	0,1%	Natriumacetat (pH 6,0)	100 mM
BSA	0,5%	Triton X-100	0,005%	BSA	0,1%
IBMX	0,25 mM			Triton X-100	0,1%

in DMEM

## 4.6.5 Mikroskopische Methoden

### 4.6.5.1 Konfokale *Laser-scanning-Mikroskopie (LSM)*

Zur Überprüfung der Kolo-kalisation der fluoreszenzprotein-fusionierten Rezeptorvarianten an der Plasmamembran, wurden die transient transfizierten *HEK 293-Zellen* mittels konfokaler LSM untersucht. Dazu wurden *HEK 293-Zellen* in, mit 32 mm Deckgläschen bestückten 6-well-Platten ausgesät ( $2 \times 10^5$  Zellen/well) und nach 24 Stunden transfiziert. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Deckgläschen in eine entsprechende Halterung eingespannt und mit dem Mikroskop analysiert. Die Rezeptorvarianten wurden mit Hilfe eines LSM710-ConfoCor3- (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany) Systems mit einem 100x /1,3 Objektiv visualisiert. Die mCherry-fusionierten Rezeptoren wurden über einen Kanal (dioden-gepumpten Festkörperlaser  $\lambda_{exc} = 561$  nm, 565-640 nm Bandfilter), die GFP-fusionierten Rezeptoren über einen zweiten Kanal (Argon laser,  $\lambda_{exc} = 488$  nm, 505-540 nm Bandfilter) detektiert. Die spektralen Bereiche wurden gesplittet und die Aufnahmen mittels *ZEN 2012 Software* analysiert.

### 4.6.5.2 Membranquantifizierung

Für die quantitative Analyse der Kolo-kalisation der exprimierten Rezeptorvarianten an der Plasmamembran wurde eine Membranquantifizierung durchgeführt. Dazu wurden zunächst Aufnahmen von exprimierenden *HEK 293-Zellen* mittels LSM angefertigt. Es wurde das Verhältnis zwischen zytosolisch- und membranär-lokalisierten Rezeptoren ermittelt, indem die Fluoreszenzintensitäten in einem bestimmten Bereich (ROI) der Aufnahme an der Plasmamembran oder im Zytosol der Zelle gemessen wurden. Als Membranmarker diente das Trypanblau, welches vor der Aufnahme auf die Zellen gegeben wurde. Die Fluoreszenzintensitäten wurden mit der Zeiss *LSM510-META Software* gemessen und das Rezeptoren-Kolo-kalisationsverhältnis Plasmamembran/Intrazellulär wurde für jede einzelne Zelle nach Subtraktion des Hintergrunds kalkuliert.

#### 4.6.5.3 Fluorescence cross-correlation-Spektroskopie (FCCS)

Für die Oligomerisierungsstudien der LHR-Rezeptorvarianten wurde die *fluorescence cross-correlation-Spektroskopie* (FCCS) angewandt. Dazu wurden  $2 \times 10^5$  HEK 293-Zellen in 6-well-Platten auf 32 mm Deckgläschen kultiviert und nach 24 Stunden mit den fluoreszierenden GFP- oder mCherry- fusionierten Rezeptorvarianten transient transfiziert. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen der FCCS-Messung unterzogen. Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur an einem LSM710-ConfoCor3 System, welches die Fluktuationsintensität an der basalen Plasmamembran ermöglicht. Die GFP- und mCherry-Fluoreszenzsignale wurden mit einem 40x/1,2 Objektiv (GFP: Argon Laser,  $\lambda_{exc} = 488$  nm, 505-540 nm Bandfilter; mCherry: Dioden-gepumpten Festkörperlaser  $\lambda_{exc} = 561$  nm, 580 nm long pass filter) aufgenommen. Die spektralen Anteile wurden mittels eines MBS 488/561 gesplittet. Die Fluktuationsintensitäten wurden 4 s mit 25 Wiederholungen aufgenommen. Die Auto- sowie die Kreuzkorrelationskurven wurden mit der ZEN Software (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, D-Jena) ermittelt. Für die Kalkulationen wurden nur konvergente Kurven verwendet. Die normalisierte Form der Auto-Korrelationskurven ist definiert als:

$$G(\tau) = \langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle / \langle F(t) \rangle^2$$

Wobei  $\langle \rangle$  die durchschnittliche Zeit und  $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$  die Fluktuation um den Mittelwert der Intensität ist. Die Korrelationskurven wurden durch ein Zwei-Komponenten-Modell und freier Diffusion in zwei Richtungen für membranassoziierte Proteine mit der ZEN Software ermittelt. Ein Zweikomponenten-Modell wurde für die zweidimensionale Anpassung verwendet. Die analytische Funktion für das Modell ist beschrieben als:

$$G(\tau) = 1 + G_{\infty} + \frac{1}{N} \left( 1 + \frac{T e^{-\tau/\tau_F}}{1-T} \right) \left( \frac{1}{\left( 1 + \frac{\tau}{\tau_{D1}} \right)} + \frac{1-f}{\left( 1 + \frac{\tau}{\tau_{D2}} \right)} \right)$$

Wobei  $G_{\infty}$  der Abstand von 1 ist. N und T repräsentieren die Gesamtanzahl der Partikel und die Triplettfraction.  $\tau_F$  ist die Tripletzeit,  $f$  und  $1-f$  sind die Anteile der Spezies 1 und 2 und  $\tau$  ist die Korrelationszeit.  $\tau_{D1}$  und  $\tau_{D2}$  repräsentieren die freie Diffusionszeit (Teichmann et al., 2012).

## 4.6.6 Proteinchemische Methoden

### 4.6.6.1 Proteinpräparation für die strukturellen Voruntersuchungen

Alle Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Für analytische Zwecke wurden die Bakterien (0,5 g) in Lysis-Puffer mittels Ultraschall (3 x 3 min 20% / 0,5 s Intervall) aufgeschlossen. Das *P. pastoris* Zellpellet wurde in Lysis-Puffer mit 0,3 g säurebehandelter *glass beads* versetzt und 3-5 mal 3 min gevortext. Die Zelltrümmer wurden vom Überstand durch Zentrifugation (15.000 x g, 30 min) abgetrennt. Der Überstand wurde auf eine mit Puffer äquilibrierte, Ni-NTA-Matrix beladene Spinsäule gegeben. Die Säule wurde mit drei Säulenvolumen Wasch-Puffer gewaschen. Das Fusionsprotein wurde dann mit einem Säulenvolumen Elutionspuffer eluiert.

Für präparative Zwecke, speziell für die Proteinpräparation der Esprit-4CED Probe, wurde folgende Proteinisierungsstrategie verwendet. Das Zellpellet wurde in Lysis-Puffer resuspendiert und mit Hilfe eines Avestin-Homogenisators aufgeschlossen. Der Überstand wurde durch Zentrifugation (20 min bei 50.000 x g) abgetrennt und für die Metall-Chelat-Affinitätschromatographie filtriert. 45 ml des filtrierten Lysats wurden auf eine mit Puffer äquilibrierte 8 ml *Metal-Chelat Porous 20*-Säule geladen. Die gebundene Proteinprobe wurde mit 8 Säulenvolumen Wasch-Puffer gewaschen und anschließend durch einen Elutionspuffer mit ansteigendem Imidazolgradienten über 6 Säulenvolumen eluiert. Das Fusionsprotein SUMO wurde anschließend mittels Protease (*SUMO protease* 0,25 mg/ml in Verdünnung 1:200) vom Zielprotein abgetrennt (6 Stunden bei 4°C). Der Reaktionsansatz wurde dann 3 Tage bei 8°C gegen einen Dialysepuffer dialysiert (2 x 5 Liter). Zur Trennung von Fusionsprotein und Esprit4-CED wurde eine zweite Metal-Chelat-Affinitätschromatographie angewandt. Der Durchlauf mit dem Zielprotein wurde aufgefangen und mit Hilfe eines Amicon®-Konzentrators über eine MWCO-Membran (MWCO: 5.000 Da) auf ca. 100 µmol aufkonzentriert. Die anschließende Dialyse gegen einen Natriumphosphatpuffer erfolgte über 3 Tage bei 8°C. Für die 550 µl NMR-Probe wurden 100 µmol konzentrierte Proteinlösung mit D<sub>2</sub>O (Endkonzentration 10%) vermischt und in ein NMR-Röhrchen überführt.

<b>Lysis-Puffer I</b>		<b>Wasch-Puffer I</b>		<b>Elutions-Puffer A</b>	
Tris-HCl (pH 7,5)	20 mM	Tris-HCl (pH 7,5)	20 mM	Tris-HCl (pH 7,5)	20 mM
NaCl	300 mM	NaCl	300 mM	NaCl	480 mM
Imidazol	10 mM	Imidazol	20 mM	Imidazol	5 mM
<i>Complete EDTA free</i>	1x				
Benzonase	5 U/ml				

<b>Elutions-Puffer B</b>		<b>Dialyse-Puffer I</b>		<b>Dialyse-Puffer II</b>	
Tris-HCl (pH 7,5)	20 mM	Tris-HCl (pH 7,5)	20 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 7,5)	20 mM
NaCl	480 mM	NaCl	500 mM	NaCl	50 mM
Imidazol	500 mM				

#### 4.6.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch am *Nanodrop* bei einer Absorptionswellenlänge von 280 nm nach dem Lambert-Beerschen Gesetz.

#### 4.6.6.3 SDS-PAGE

Zur Proteinanalyse wurde eine *SDS-PAGE* in 10% SDS-Polyacrylamidgelen durchgeführt (Laemmli, 1970).

Die Färbung der Proteingele erfolgte mit einer Coomassie-Färbelösung 30 min lang. Anschließend wurden die Gele mit einer Entfärbelösung solange inkubiert, bis die aufgetrennten Proteine gut sichtbar waren. Die Dokumentation erfolgte über Weißlicht. Die Proteinproben wurden, falls nicht anders angegeben, standardmäßig für die *SDS-PAGE* vorbereitet:

100 µl Probe wurde zusammen mit 30 µl *SDS-PAGE*-Ladepuffer 5 min aufgekocht und anschließend bei 20.000 x g für 10 min zentrifugiert. Als Molmassen-Standard diente der *Protein Molecular Weight Marker* von Fermentas.

Sammelgel-Puffer		Trenngel-Puffer		Elektrophorese-Puffer	
Tris-HCl (pH 6,8)	0,62 M	Tris-HCl (pH 8,8)	0,75 M	Tris-Base	25 mM
				Glycin	192 mM
				SDS	0,1%

SDS-PAGE-Ladepuffer		Acrylamid-Lösung		Färbe-Lösung	
β-Mercaptoethanol	33,3%	Acrylamid	30%	Essigsäure	10%
				<i>Coomassie brillant</i>	
Glyzerin	15%	Bisacrylamid	0,8%	<i>Blue G250</i>	0,025%
SDS	3,3%				
Bromphenolblau	0,1%				

#### Entfärbe-Lösung

Essigsäure	10%
Ethanol	50%

#### 4.6.6.4 Proteinnachweis mittels Immunoblot (Western Blot)

Der Nachweis der Expression des rekombinanten Proteins erfolgte mittels Antikörper gegen eine Penta-His-Sequenz. Die His(6x)-Sequenz, die auch von dem Penta-His-Antikörper erkannt wird, wurde durch die jeweiligen Vektoren vermittelt. Für den Western Blot wurden die Proteinbanden vom SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und durch eine Immunofärbung spezifisch markiert. Die Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosemembran erfolgte mit Hilfe eines *semi-dry blotters* der Firma *Hözel (Wörth)* durch Elektroblootting und dauerte 30 min bei 250 mA pro Mini-Gel. Der Transfer wurde durch Färbung der Proteinbanden mit Ponceau S-Lösung und anschließender Entfärbung überprüft. Die Membran wurde anschließend über Nacht bei 4°C in Blockierungs-Puffer geschwenkt. Zur Detektion des His(6x)-Tags wurde die Membran 1,5 h mit Penta-His-Antikörper im Verhältnis 1:2.000 in TBS + 1% (w/v) BSA inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit Wasch-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (HRP-konjugiertes Kaninchen-IgG- gegen Maus-IgG-Antikörper) erfolgte ebenfalls für 1,5 h bei einer Verdünnung von 1:3.000 in TBS + 1% (w/v) BSA. Es folgten drei Waschschrte mit Wasch-Puffer. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz.

Ponceau S-Lösung		TBS-Puffer		Blockierung-Puffer
Ponceau-S	0,5%	Tris-HCl (pH 7.3)	10 mM	TBS + 3% BSA
Trichlor-Essigsäure	0,5%	NaCl	150 mM	

Transfer-Puffer		Wasch-Puffer
Tris-HCl (pH 8,3)	25 mM	TBS + 0,1% Tween20
Glyzin	192 mM	
Methanol	20%	

## 4.7 Expression of Soluble Proteins by Random Incremental Truncation System (ESPRIT-System)

### 4.7.1 Generierung der DNA-Konstruktbibliothek

Für die N-terminale Deletion wurde der Expressionsvektor *pEsprit002-hinge*, der den Genabschnitt der TSHR Hinge-Region trägt, mit dem Restriktionsenzym *Nsi*I verdaut. Das Ergebnis wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Anschließend wurde dem Reaktionsansatz das Restriktionsenzym *Not*I beigemischt und die Reaktion fortgeführt.

Reaktionsansatz I		Reaktionsansatz II	
Komponente	Volumen (µl)	Komponente	Volumen (µl)
NEB3	60	NEB3	75
BSA	6	BSA	6
<i>Nsi</i> I	12	<i>Not</i> I	12
DNA	12 µg	Reaktionsansatz I	580
Wasser	516	Wasser	77
total	600	total	750

**Reaktionsbedingungen:** 4 Stunden 37°C

Die linearisierte Vektor-DNA wurde anschließend mit Hilfe des *Nucleospin Extract II Kit (Macherey & Nagel)* gemäß Herstellerangaben isoliert.

Daraufhin folgte die Behandlung mit *Exonuclease*III. Dazu wurde die DNA auf eine Konzentration von 33.3 ng/µl eingestellt und der Reaktionsansatz auf Eis mit *Exonuclease*III (100 U/µg DNA) versetzt. Die Deletionsreaktion fand bei 22°C statt, wobei jede Minute 1/60 Reaktionsvolumen in ein auf Eis gestelltes, mit 200 µl 3M NaCl Lösung befülltes Reaktionsgefäß überführt wurde. Die *Exonuclease*III wurde durch 20-minütiges Erhitzen auf 70°C inaktiviert. Die Aufreinigung der DNA-Proben erfolgte durch das *Nucleospin ExtractII Kit* gemäß Herstellerangaben.

**Reaktionsansatz:**

Komponente	Volumen (µl)
NEB1-Puffer (10x)	12
DNA	4 µg
NaCl (70 mM)	8,4
<i>Exonuclease III</i>	4
Wasser	82
Total	120

Es folgte die Deletion des entstandenen 5'-Überhangs durch Behandlung mit *mung bean*-Nuklease. Die DNA wurde anschließend mit dem *Nucleospin Extract II Kit* gemäß Herstellerangaben isoliert.

**Reaktionsansatz:**

**Reaktionsbedingungen:**

Komponente	Volumen (µl)
MB Puffer (10x)	5
DNA	40
Wasser	4
<i>MB</i> -Nuklease	1
Total	50

30 min 30°C

Für das *end-polishing* wurden die DNA-Proben 10 min bei 72°C mit *Pfu*-Polymerase behandelt.

Zur Qualitätskontrolle wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

Im Anschluss erfolgte die Ligation mittels *Rapid Ligation Kit* gemäß Herstellerangaben und die Transformation in chemisch kompetente *E. coli*.

Zur Qualitätsbeurteilung der entstandenen DNA-Konstruktbibliothek wurden 96 Klone einer Kolonie-PCR unterworfen.

Die Isolierung der gesamten DNA-Konstruktbibliothek erfolgte durch erneute Transformation auf selektierenden LB-Agarplatten.  $10 \times 10^4$  Klone wurden mittels eines Drigalski-Spatels in LB-Suspension von der Platte abgelöst. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und als Glycerinstocks mit flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Für die Generierung der bidirektional-deletierten DNA-Konstruktbibliothek wurde obiges Protokoll auf die so entstandene unidirektional-deletierte DNA-Konstruktbibliothek angewandt. Zur C-terminalen Deletion wurden die Restriktionsenzyme *Ascl* und *Aafl* verwendet.

#### 4.7.2 Transformation der DNA-Konstruktbibliothek in BL21 (*DE3*)-Bakterien

Zunächst wurden 6 *Q-Tray*-Platten (22 cm x 22 cm) mit jeweils 300 ml selektierendem (Kanamycin/Chloramphenicol) LB-Agar befüllt. Es folgte die Transformation von BL21 (*DE3*)-Zellen mit der bidirektional-deletierten DNA-Konstruktbibliothek. Die transformierten Bakterienzellen wurden auf den *Q-Tray*-Platten ausplattiert und die Platten anschließend über Nacht bei 35°C inkubiert, sodass jeweils zwei Platten mit 4.000/8.000/10.000 Bakterienkolonien erhalten wurden.

Für die Bakterienisolierung wurden 76 x 396-well-Platten mit TB+ Medium befüllt und in das Roboterfach gestellt. Es folgte die Überführung von 30.000 Bakterienkolonien.

Diese wurden dann in einem *high-grow*-Inkubator über Nacht bei 37°C und 175 rpm geschüttelt und anschließend bei -80°C weggefroren.

#### HMFM (10x)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 7,5)	400 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,5)	150 mM
Natriumcitrat	40 mM
Glyzerol	50%

TB+ Medium : TB-Medium + HMFM (1x)

#### 4.7.3 Überführung der Bakterienkolonien auf die Nitrozellulosemembran und Replikation

Für den Primäre-Screen der erhaltenen 30.000 Bakterienklone, wurden diese auf eine Nitrozellulosemembran gespottet.

Zunächst wurde die Nitrozellulosemembran auf die Fläche der *Q-Tray*-Platten zugeschnitten. Die Membran wurde auf eine selektierende LB-Agar-*Q-Tray*-Platte platziert. Anschließend wurden 27.642 Klone im Duplikat auf die Membran übertragen.

Die gespottete Membran wurde anschließend über Nacht bei 25°C inkubiert. Es folgte die Übertragung der Membran auf eine LB-Agar-Q-Tray-Platte + Induktor (50 µM Biotin; 0,2% Arabinose) und die Inkubation 4 Stunden bei 30°C.

#### 4.7.4 Detektion des Membran-Scans

Die gespottete Nitrozellulosemembran wurde zunächst auf ein mit Denaturierungs-Lösung behandeltes Blotting-Papier aufgetragen und 10 min inkubiert. Die Membran wurde dann auf ein, mit Neutralisierungs-Lösung behandeltes Blotting-Papier übertragen und 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Membran in 2 x SCC Puffer 15 min inkubiert. Dann wurden die Zelltrümmer mit einem Drigalski-Spatel entfernt.

Denaturierungs-Lösung		Neutralisierungs-Lösung		SCC-Puffer (2x)	
NaOH	0,5 M	Tris-HCl (pH 7,5)	1 M	NaCl	0,3 M
NaCl	1,5 M	NaCl	1,5 M	Na <sub>3</sub> Citrat	30 mM

Die Membran wurde in 50 ml Blocking-Lösung eingelegt und in einem Hybridisierungssofen über Nacht bei 10°C geschwenkt.

Es folgten ein Waschschrift mit PBST-Lösung und die Inkubation mit einem Maus-Anti-His-Antikörper (1/3125 Verdünnung in PBS) für eine Stunde bei 10°C.

Die Membran wurde dreimal mit PBST- Lösung gewaschen und anschließend mit dem Sekundär-Antikörper Anti-Maus (konjugiert mit Alexa 532 1/1000 Verdünnung in PBS) bzw. Streptavidin (konjugiert mit Alexa488 1/5000 Verdünnung in PBS) für eine Stunde bei 10°C inkubiert. Es folgten drei Waschschrift mit PBST und ein Waschschrift mit destilliertem Wasser.

Die Aufnahme der Fluoreszenzintensitäten erfolgte mittels eines *typhoon scanners*. Die Auswertung sowie Erstellung der Histogramme erfolgte mit Hilfe der *Visual Grid software*.

**PBST-Lösung:** PBS + 0,1% Tween20

#### 4.7.5 Expressionstest der validierten Bakterienklone

Für den Expressionstest wurden 96 Klone mit den höchsten Werten aus beiden Histogrammen gewählt. Die Anzucht erfolgte im 4 ml Maßstab im selektierenden LB-Medium. Die Proteinexpression fand 16 Stunden nach Induktion mit 0,2% Arabinose bei 37°C statt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und bei -80°C weggefroren. Die Proteinisolierung erfolgte im Halb-Hochdurchsatzverfahren mittels eines *TECAN*-Roboters. Dazu wurden die Bakterienzellen in 800 µl Lysis-Puffer II 10 min bei RT lysiert, die Zellrümer anschließend 30 min bei 4500 x g runterzentrifugiert.

Die Proteinaufreinigung erfolgte durch das Laden des Lysats auf äquilibrierte mit Ni-NTA-Matrix beladene 96-well-Filter-Platten (70 µl aktivierter Ni-NTA-Matrix) und 30-minütiger Inkubation bei 4°C. Es folgte ein Waschschriff mit Wasch-Puffer II (20 Säulenvolumen) und anschließend die Elution mit imidazolhaltigem Elutions-Puffer II (ein Säulenvolumen).

Die eluierten Fraktionen wurden für die SDS-PAGE standardgemäß vorbereitet.

Lysis-Puffer II		Wasch-Puffer II		Elutions-Puffer II	
Tris-HCl (pH 7,0)	20 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 7,0)	50 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 7,0)	20 mM
NaCl	250 mM	NaCl	300 mM	NaCl	300 mM
Benzonase	5 U/ml	Imidazol	5 mM	Imidazol	300 mM
Lysozym	1 mg/ml				
Brij	0,5%				

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Heterologe Expression der Hinge-Region des humanen Thyreotropinrezeptors (TSHR) für weiterführende Strukturuntersuchungen

#### 5.1.1 Herstellung geeigneter Hinge-Region-Konstrukte des TSHR für die heterologe Proteinexpression in *E. coli*



**Abb.5: Alignment der TSHR Hinge-Region-Konstrukte für die heterologe Expression in *E. coli***

Das Alignment zeigt das TSHR Hinge-Region-Template sowie die daraus festgelegten TSHR Hinge-Region-Konstrukte TSHR-ht1 bis TSHR-ht6 für die Expressionsstudien in *E. coli*. Potentielle helikale (H) bzw. gefaltete (E) Strukturelemente, welche aus dem Sekundärstrukturvorhersageprogramm Jpred3 ermittelt wurden, sind der TSHR Hinge-Region unterlegt. Die blau unterlegten Bereiche markieren die Cysteinboxen 2 und 3, mit den jeweils drei hochkonservierten, schwarz markierten Cysteinen (283; 284; 301; 390; 398; 408). Der grün unterlegte Bereich repräsentiert das im TSHR abspaltbare C-Peptid (Chazenbalk et al., 1997; Loosfelt et al., 1992; Tanaka et al., 1999a).

Das Ziel der Expressionsstudien bestand darin, Bedingungen für die lösliche Überexpression von Hinge-Region-Fragmenten aus humanen GPHR zu finden und in einem zweiten Schritt diese einer NMR unterstützten Strukturuntersuchung zu unterziehen. Als Ausgangspunkt für diese Studien wurde der TSHR gewählt.

Für das rationale Design möglicher Hinge-Region-Konstrukte wurde die erweiterte Sequenz der TSHR Hinge-Region (beginnend mit Ser237, endend mit Asp410) gegen die *protein database* geblasted.

Da kein geeignetes Template gefunden werden konnte, wurde mittels des Online-Sekundärstrukturvorhersage-Tools Jpred3 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred>) nach potentiell strukturierten Bereichen in der Hinge-Region gesucht. Es folgte die Auswahl von sechs möglichen Hinge-Region-Konstrukten. Diese unterscheiden sich in der Länge sowie den Anfangs- und Endaminoacidsäuren. Es wurde stets darauf geachtet die Cysteinboxen 2 und 3 sowie möglichst viele potentielle Strukturelemente in die Auswahl einzubinden (siehe Abb.5).

*Die Auswahl der sechs TSHR Hinge-Region-Konstrukte erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Anne Diehl und Dr. Gunnar Kleinau.*

### **5.1.2 Expressionsvektoren für die zytosolische Proteinexpression in *E. coli***

Die sechs Hinge-Region-Konstrukte wurden über das ligationsunabhängige Klonierungssystem *LIC* von *Novagen* in die Expressionsvektoren pET-30, pET-32 und pET-41 kloniert, um eine lösliche Überexpression im Zytosol als Fusionsprotein mit einem N-terminalen Fusionspartner (His(6x)-S-Tag; Thioredoxin-His(6x)-S-Tag (Trx-Tag); Glutathion-S-transferase-His(6x)-S-Tag (GST-Tag)) zu erreichen. Alle Konstrukte wurden mit einer Proteaseschnittstelle (Thrombin/Enterokinase) kloniert, um die Abspaltung des Fusionspartners nach Isolierung des Proteins zu ermöglichen.

### **5.1.3 Expressionsvektoren für die periplasmatische Proteinexpression in *E. coli***

Für die Proteinexpression im periplasmatischen Raum von *E. coli* wurden die sechs ausgewählten TSHR Hinge-Region-Konstrukte in die Expressionsvektoren pET-22b; pET-39 und pET-40, als Fusionsproteine mit N-terminalen Fusionspartnern (*peIB*-Signalsequenz-His(6x)-Tag; Disulfid-Isomerase-A-His(6x)-Tag (*DsbA*); Disulfid-Isomerase-C-His(6x)-Tag (*DsbC*)) kloniert. Die sechs Konstrukte konnten erfolgreich über die Restriktionsschnittstellen *Scal* und *XhoI* in die Expressionsvektoren eingefügt werden. Die durch die Klonierung insertierte Thrombin-

Proteaseschnittstelle diene zur Abspaltung des Fusionsproteins nach der Proteinisolierung.

#### **5.1.4 Expressionsstudien der Hinge-Region-Konstrukte des TSHR in *E. coli***

Die Expressionsstudien zur löslichen Überexpression der TSHR Hinge-Region-Konstrukte im Zytosol fanden in den *E. coli*-Expressionsstämmen BL21(DE3), BL21(DE3) Rosetta 2, BL21(DE3) pLysS, RosettaGamiB(DE3) und SHuffle T7 bei unterschiedlichen Expressionsbedingungen (Temperatur, Induktorkonzentration) statt. Eine lösliche Überexpression der His(6x)-Tag- und GST-Tag-fusionierten Proteine (His-Tag-TSHR-ht2, GST-Tag-TSHR-ht2, -3, -5) konnte mit dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3) (0,2 mg aus 5 ml LB-Kultur) erreicht werden. Die Trx-Tag-Fusionsproteine wurden hingegen als *inclusion bodies* exprimiert. Die Expressionsrate im *E. coli*-Stamm BL21(DE3)Rosetta2 war deutlich höher, resultierte aber in der vermehrten Bildung von *inclusion bodies*. Nur die GST-fusionierten Konstrukte TSHR-ht2 und TSHR-ht3 wurden löslich exprimiert. Im *E. coli*-Stamm SHuffle T7 konnte eine schwache Proteinexpression der His-Tag- und GST-Tag-fusionierten Konstrukte (0,05 mg aus 5 ml LB-Kultur) bei 16°C Expressionstemperatur nachgewiesen werden. Die Proteinexpression im *E. coli*-Stamm BL21(DE3) pLysS erfolgte ebenfalls moderat. Nur die GST-fusionierten Konstrukte TSHR-ht2 und TSHR-ht-3 konnten löslich nachgewiesen werden. Eine Proteinexpression im *E. coli*-Stamm RosettaGamiB(DE3) konnte nicht erreicht werden. Nach der Proteinisolierung und Dialyse waren die vier Fusionsproteine (His-Tag-TSHR-ht2, GST-Tag-TSHR-ht2, -3, -5) bei 4°C mehrere Tage stabil. Sofort nach der Proteasebehandlung zur Abspaltung des Fusionsproteins unterlagen die Hinge-Region-Konstrukte der Proteindegradation (siehe Tab.1) (Kleinau et al., 2011b).

Die Expressionsstudien zur löslichen Proteinüberexpression im periplasmatischen Raum wurden im *E. coli*-Stamm Shuffle T7 durchgeführt. Nur das DsbC-fusionierte TSHR-ht-2-Konstrukt konnte minimal (0,05 mg aus 15 ml LB-Kultur) aber nachweislich im periplasmatischen Raum löslich exprimiert werden. Auch hier erfolgte eine spontane Proteindegradation nach der Proteasebehandlung zur Abspaltung des Fusionsproteins (siehe Tab.1).

*Die Expressionsstudien zur zytosolischen Proteinexpression in den E. coli-Stämmen BL21(DE3) sowie BL21(DE3)Rosetta2 wurden von Dr. Silke Radetzki und Katja Riemann in Vorarbeiten durchgeführt (siehe Masterarbeit Katja Riemann).*

**Tab.1: Zusammenfassung der TSHR Hinge-Region-Expressionsstudien in *E. coli***

Zusammenfassung der Ergebnisse der Expressionsstudie im *E. coli*-Stamm BL21(DE3). Die Expression erfolgte 16 Stunden bei 25°C. Eine Verbesserung der Überexpression konnte weder mit anderen *E. coli*-Stämmen (BL21(DE3)Rosetta2, BL21(DE3)pLysS, RosettaGamiB(DE3) und SHuffle T7) noch mit veränderten Expressionsbedingungen (Temperatur, Induktor-Konzentration) erreicht werden.

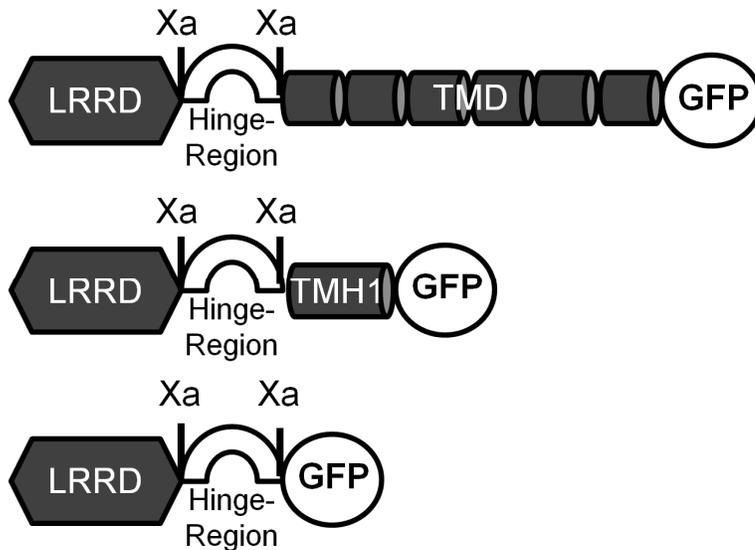
(+++) stark (++) moderate (+) schwach (-) keine

Fusionspartner		Gesamtexpression (Fusionsprotein)	Lösliche Proteinfraktion (Fusionsprotein)	Stabilität nach Proteinisolierung (Fusionsprotein)	Stabilität nach Proteinpräparation (Hinge-Region- Fragment)
	TSHR-ht1	+++	-	-	-
	TSHR-ht2	+++	+	+	-
His-Tag	TSHR-ht3	+++	-	-	-
	TSHR-ht4	+	-	-	-
	TSHR-ht5	+++	-	-	-
	TSHR-ht6	+	-	-	-
	TSHR-ht1	+++	-	-	-
	TSHR-ht2	+++	++	++	-
GST-Tag	TSHR-ht3	+++	++	++	-
	TSHR-ht4	+	-	-	-
	TSHR-ht5	+++	+	+	-
	TSHR-ht6	+	-	-	-
Trx-Tag	TSHR-ht2	++	-	-	-
	TSHR-ht3	++	-	-	-
DsbC-Tag	TSHR-ht2	+	+	+	-

### 5.1.5 Herstellung geeigneter Hinge-Region-Konstrukte für die heterologe Proteinexpression in *P. pastoris*

Um eine Stabilisierung der Strukturelemente der TSHR Hinge-Region zu erreichen, wurden die Konstrukte für die heterologe Proteinexpression in der methylophilen Hefe *P. pastoris* N-terminal mit der nativen LRRD und C-terminal wahlweise mit der gesamten Transmembranären-Domäne (TMD), der ersten TMH1 oder dem fluoreszierenden Protein GFP fusioniert. Für die Isolierung der Hinge-Region nach Aufreinigung des Fusionsproteins wurde im Übergang zwischen LRRD und Hinge-Region sowie Hinge-Region und TMD bzw. TMH1 eine Xa-Proteaseschnittstelle inseriert (siehe Abb.6).

Die Konstrukte wurden über die XbaI- und XhoI-Restriktionsschnittstellen in die Expressionsvektoren pPICZαA (α-factor-Signalpeptid-Fusion) bzw. pPICZB (native N-terminale Rezeptorsignalsequenz) eingefügt.



**Abb.6: Übersicht über die verwendeten TSHR Hinge-Region-Konstrukte für die heterologe Expression in *P. pastoris***

Bei den verwendeten Konstrukten für die Proteinexpression in *P. pastoris* wurde zur Stabilisierung potentieller Strukturelemente der Hinge-Region, N-terminal die LRRD sowie C-terminal die gesamte TMD, die TMH1 bzw. GFP fusioniert. Zur Freisetzung der Hinge-Region wurde die Proteaseschnittstelle Xa an den Übergängen inseriert.

### 5.1.6 Expressionsstudien der Hinge-Region-Konstrukte des TSHR in *P. pastoris*

Für die heterologe Proteinexpression in *P. pastoris* wurden die nach Transformation erhaltenen Klone auf *multicopy*-Ereignisse untersucht. Dazu wurden je 24 Transformanten auf BGMV-Agarplatten mit ansteigenden Zeocin-Konzentrationen ausgestrichen. Die widerstandsfähigsten 12 *multicopy*-Klone wurden auf ihren Genotyp ( $Mut^+/Mut^S$ ) überprüft. Jeweils vier  $Mut^+$ - und  $Mut^S$ -Klone wurden für die Expressionsstudie ausgewählt. Bei keinem der verwendeten Transformanten konnte selbst nach 72 Stunden eine lösliche Proteinexpression oder Proteinsegregation ins Medium, mittels SDS-PAGE, Western Blot oder LSM nachgewiesen werden (Kleinau et al., 2011b).

### 5.1.7 Das ESPRIT-System und dessen Anwendung auf die Hinge-Region des TSHR zur Auffindung stabiler Proteinkonstrukte

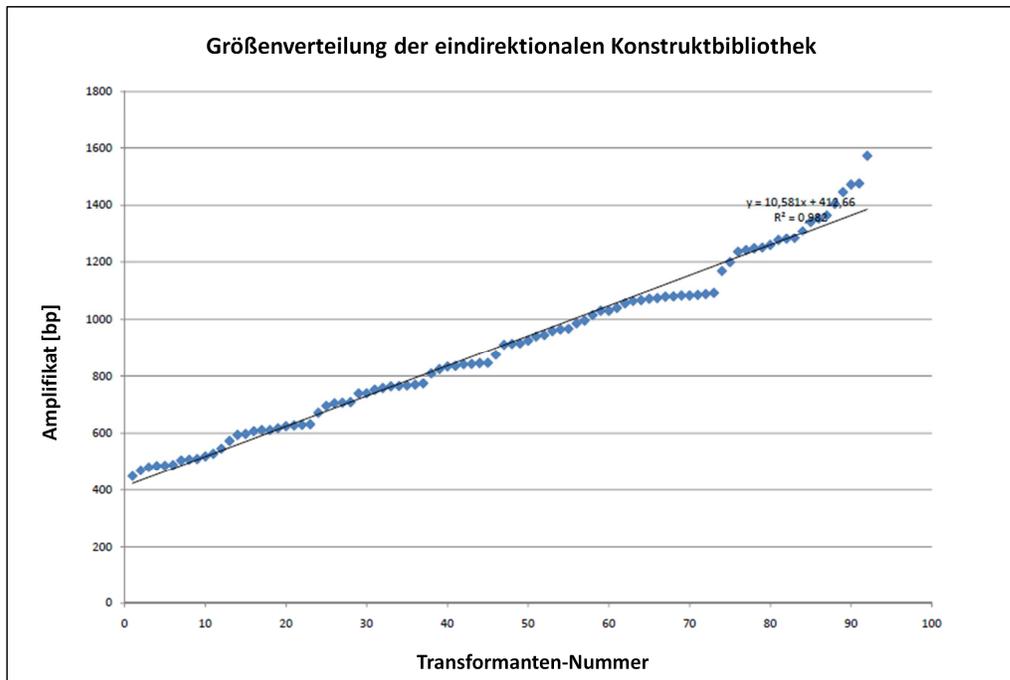
Das ESPRIT-System stellt eine erfolgreiche Alternative zum rationalen Design von Expressionskonstrukten für die heterologe Proteinexpression dar (An et al., 2011). Während bei der herkömmlichen Auswahl der Expressionskonstrukte *in-silico*-Daten von homologen Proteinen aus Datenbanken einfließen oder mittels

Strukturvorhersageprogrammen Strukturelemente in der Sequenz abgesteckt werden, basiert das *ESPRIT*-System auf einem DNA-Konstruktbibliotheken-Screen mit anschließender Hochdurchsatz-Expressionsstudie. Bei diesem Verfahren findet eine Kombination aus der Generierung einer auf dem Zielfragment basierenden randomisierten Konstruktbibliothek und einem automatisierten Hochdurchsatz-Screening statt. Dies ermöglicht es, die optimalen Konstruktorschläge aus einem evolutionären Prozess zu ermitteln und sie für die Proteinexpression zu verwenden (Hart and Tarendeau, 2006; Yumerefendi et al., 2011).

*Die folgenden Arbeiten wurden am EMBL (Grenoble, Frankreich) in der Arbeitsgruppe Dr. Darren Hart in Zusammenarbeit mit Philippe Mas und Sriharsha Puranik durchgeführt. Die Arbeiten wurden durch das P-CUBE Projekt finanziert.*

#### **5.1.7.1 Generierung der TSHR Hinge-Region-DNA-Konstruktbibliothek**

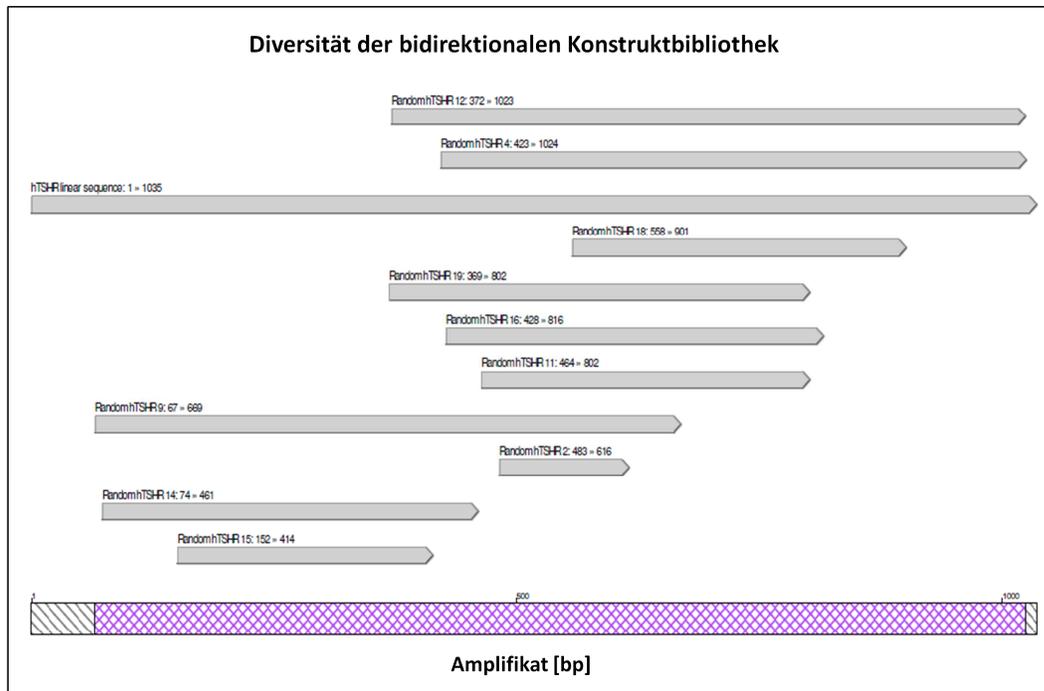
Für die Generierung der DNA-Konstruktbibliothek, wurde zunächst das TSHR Hinge-Region codierende Amplifikat (Ser273 bis Asp449), welches mittels einer konventionellen PCR erhalten wurde, über die Restriktionsschnittstellen *Ascl* und *NotI* in den, eigens am EMBL Grenoble angefertigten, Vektor *pESPRIT002* eingefügt. Dieser besitzt als Eigenschaft einen N-terminalen His(6x)-Tag sowie C-terminal ein biotinassoziierendes Fusionsprotein (BAP). Für die Folgereaktionen wurde die Restriktionsschnittstelle *NsiI*, welche sich im Genabschnitt der TSHR Hinge-Region befindet, durch zielgerichtete Mutagenese beseitigt. Nach der Linearisierung des Vektors mit dem Restriktionsenzymen *NotI* und *NsiI* folgte die C-terminale unidirektionale Deletion des TSHR Hinge-Region-Genabschnitts mittels *ExonucleaseIII*. Nach der Ligation und anschließender Rekonstituierung der Konstrukt-Teilbibliothek wurde diese auf ihre Effizienz überprüft. Dazu wurden 96 frei gewählte Transformanten einer Kolonie-PCR unterzogen und die Länge des amplifizierten Genabschnitts gelistet. Die ermittelten Genabschnitte hatten eine Länge von 420 bp bis 1.590 bp. Die DNA-Konstruktbibliothek erreichte eine Effizienz von 98% (siehe Abb.7).



**Abb.7: Analyse der Größenverteilung und Diversität der generierten unidirektionalen TSHR Hinge-Region-DNA-Konstruktbibliothek.**

96 frei gewählte Transformanten wurden einer Kolonie-PCR unterzogen. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese getrennt und nach Fragmentgröße gelistet. Die Effizienz der generierten unidirektionalen DNA-Konstruktbibliothek betrug 98%;  $R^2$ :0.982.

Die erhaltene DNA-Konstrukt-Teilbibliothek wurde im nächsten Schritt einer N-terminalen unidirektionalen Deletion unterzogen. Dazu wurden die in der DNA-Konstrukt-Teilbibliothek erhaltenen Vektoren mit den Restriktionsenzymen *AscI* und *AatII* linearisiert und mit *ExonukleaseIII* behandelt. Nach erfolgter Ligation und Rekonstituierung wurde die erhaltene DNA-Konstrukt-Gesamtbibliothek auf ihre Effizienz überprüft. Dabei wurde die DNA-Konstrukt-Gesamtbibliothek in *E. coli* transformiert und eine Kolonie-PCR durchgeführt. Die Auswertung der Kolonie-PCR von 96 Klonen ergab Amplifikate mit unterschiedlicher Länge (263 bp bis 603 bp) und Lage im TSHR Hinge-Region-Genabschnitt. Die Länge der Genabschnitte entsprach somit Proteinkonstrukten von 100 bis 200 Aminosäuren Länge. Die Effizienz der durch bidirektionale Deletion erhaltenen DNA-Konstrukt-Gesamtbibliothek entsprach 95% (siehe Abb.8).



**Abb.8: Analyse der Größenverteilung und Diversität der generierten bidirektionalen TSHR Hinge-Region-DNA-Konstruktbibliothek.**

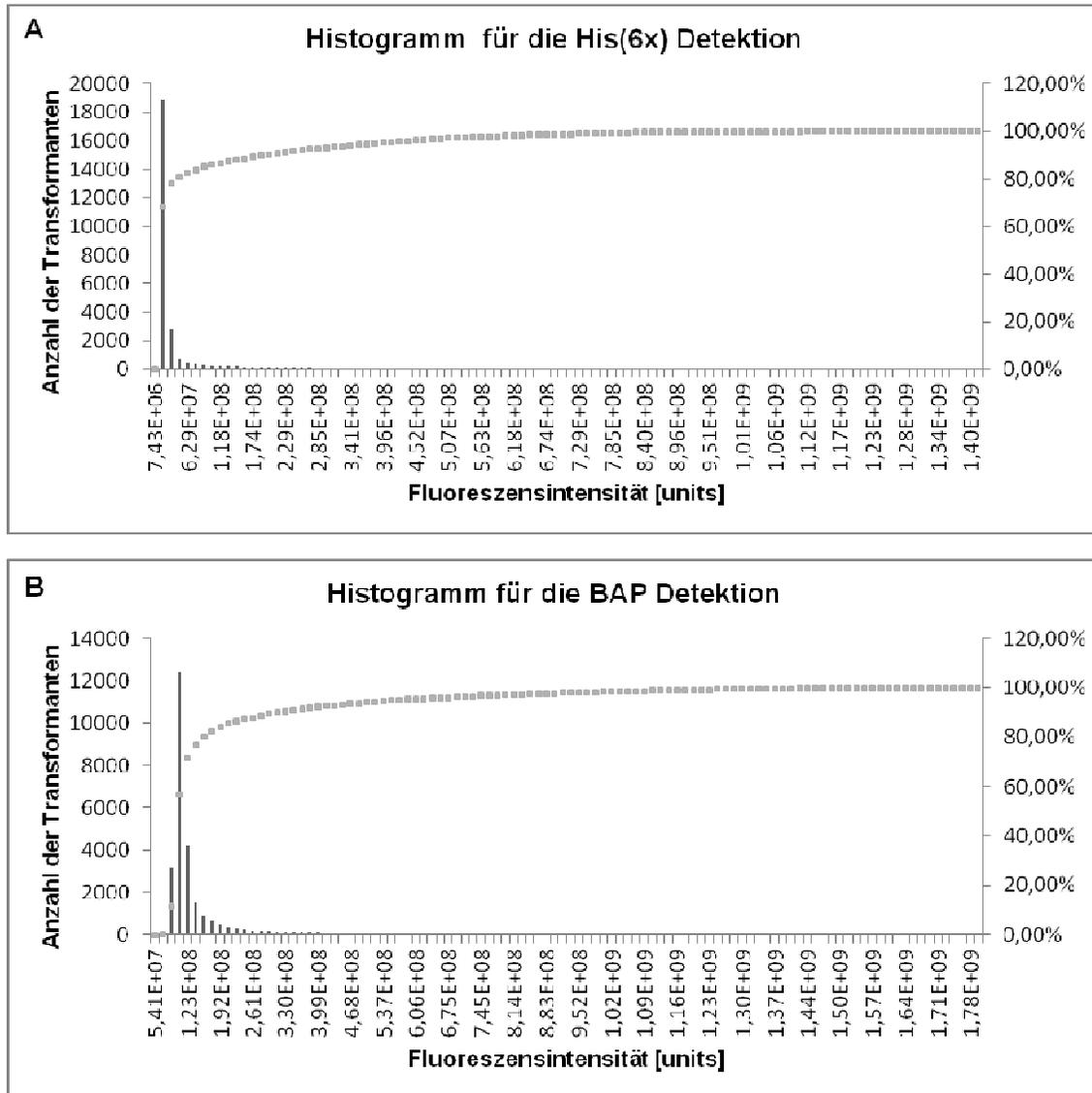
10 frei gewählte Transformanten wurden einer Kolonie-PCR und anschließend einer DNA-Sequenzierung unterzogen. Die DNA-Sequenzierung ergab Amplifikate mit unterschiedlicher Länge (263 bp bis 603 bp) und Lage im TSHR Hinge-Region-Genabschnitt. Die Länge der Genabschnitte entsprach somit Proteinkonstrukten von 100 bis 200 Aminosäuren Länge. Die Effizienz der bidirektionalen DNA-Konstruktbibliothek entsprach 95%.

### 5.1.7.2 Primärscreen der Hinge-Region-DNA-Konstruktbibliothek

Für den Primärscreen der TSHR Hinge-Region-DNA-Konstruktbibliothek wurde diese in *E. coli* transformiert und die Bakterien im Anschluss auf mehreren LB-Agarplatten ausplattiert. Mit Hilfe eines automatisierten Roboters konnten 27.642 Transformanten isoliert und in 70 x 396-well-Platten konserviert werden. Die erhaltenen Transformanten wurden auf eine Nitrozellulosemembran im Duplikat aufgetragen.

Nach dem Induzieren der Proteinexpression wurde diese mittels eines Fluoreszenz-Screens überprüft. Dabei wurde die Fluoreszenzintensität der mit fluoreszierenden Antikörpern bzw. fluoreszierendem Streptavidin behandelten Transformanten aufgenommen und für jeden Transformanten ein Histogramm erstellt. Jedem Transformanten konnte somit je ein Fluoreszenzintensitätswert für die Detektion des His(6x)-Tags und für die Detektion des BAP zugewiesen werden. Ein hoher Wert bei beiden Detektionen korreliert dabei mit einer hohen Expressionsrate des löslichen Konstrukts. Aus der Verteilung kann abgelesen werden, dass die größte Anzahl an

Transformanten, Fluoreszenzintensitäten von 56% für die BAP- und 68% für die His(6x)-Tag-Detektion aufwiesen. Es wurde ein *Cut-off* bei 95% der Maximalintensität festgelegt und alle Transformanten, die bei beiden Detektionen höhere Werte aufwiesen in einer Rangfolge, gelistet (siehe Abb.9).

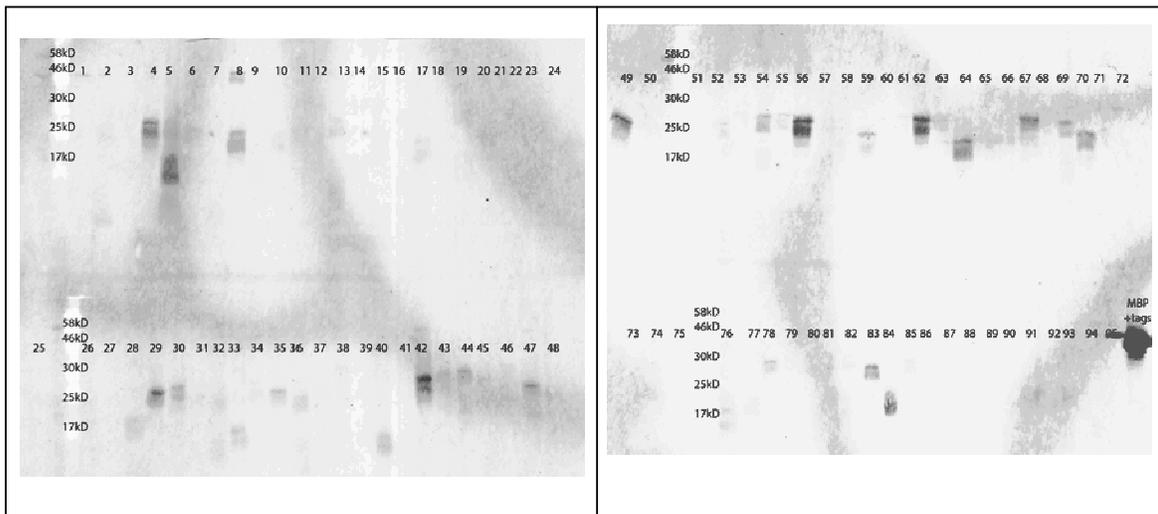


**Abb.9: Analyse des Primärscreens sowie der Gesamtexpression der Transformanten**

Zur Analyse des Primärscreens wurden die Expressionsraten mittels Histogramm auf Basis von Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Transformanten überprüft. **A)** Das Histogramm der Fluoreszenzintensitäten für die His(6x)-Tag-Detektion zeigt ein Maximum der Transformantenzahl bei 68% der Maximalintensität. **B)** Das Histogramm der Fluoreszenzintensitäten für die BAP-Detektion zeigt ein Maximum der Transformantenzahl bei 56% der Maximalintensität. Der *Cut-off*-Wert für den anschließenden Sekundärscreen wurde auf 95% der Maximalintensität bei beiden Detektionen festgelegt.

### 5.1.7.3 Sekundärscreen und Validierung der Hinge-Region-Konstrukte

Für den Sekundärscreen wurden die 94 Transformanten mit den höchsten Werten für die Detektion des His(6x)-Tag sowie des BAP in einer Expressionsstudie im kleinen Maßstab (4 ml Kultur) getestet. Die Isolierung des Proteinkonstrukts erfolgte in einem automatisierten Prozess mittels Metall-Chelat-Affinitätschromatographie. Die Eluate wurden in einer SDS-PAGE und anschließend mittels eines Western Blots (BAP-Detektion) analysiert. Dabei konnten mehrere TSHR Hinge-Region-Konstrukte unterschiedlicher Größe als distinkte Banden identifiziert werden (siehe Abb.10).



**Abb.10: Western Blot Analyse der 94 exprimierten ESPRIT-Konstrukte**

94 Transformanten mit den höchsten Werten für die Detektion des His(6x)-Tags sowie des BAP wurden im 4 ml Maßstab für die Proteinexpression und anschließende Isolierung verwendet. Die isolierten Hinge-Region-Proteinkonstrukte wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Die Detektion erfolgte, nach der Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran, mit fluoreszent-markiertem Streptavidin über das BAP. Es konnten mehrere TSHR Hinge-Region-Konstrukte unterschiedlicher Größe als distinkte Banden identifiziert werden.

Die Gensequenz 8 ausgewählter Konstrukte (ESPRIT-4,-8,-40,-49,-56,-62,-64,-85) wurde nach erfolgter Plasmidisolierung mittels DNA-Sequenzierung ermittelt. Besonders auffällig stellte sich der C-Terminus der analysierten Sequenzen heraus. Keines der ausgewählten Konstrukte beinhaltet in der übersetzten Proteinsequenz die vollständige Cysteinbox 3. Es fehlte jeweils das für die Funktion essentielle Cystein Cys408, welches im TSHR mit dem Cystein Cys284 eine Disulfidbrücke ausbildet (Ho et al., 2008) (siehe Abb.11).

## Ergebnisse

	237	294
TSHR	SVTALPSKGLEHLKELIARNTWTLKKLPLSLSFLHLTRADLSY	PSHCCAFKNQKKIRG
Struktur	-----HHHHHHHHHHHEEE-----EE-----HHHEEE-----	
ESPRIT_4	-----SFLHLTRADLSYPSHCCAFKNQKKIRG	
ESPRIT_8	-----CCAFKNQKKIRG	
ESPRIT_40	-----LHLTRADLSYPSHCCAFKNQKKIRG	
ESPRIT_49	-----NQKKIRG	
ESPRIT_56	-----SFLHLTRADLSYPSHCCAFKNQKKIRG	
ESPRIT_62	-----PLSLSFLHLTRADLSYPSHCCAFKNQKKIRG	
ESPRIT_64	-----KLPLSLSFLHLTRADLSYPSHCCAFKNQKKIRG	
ESPRIT_85	-----SFLHLTRADLSYPSHCCAFKNQKKIRG	
	295	352
TSHR	ILESMLCNESSMQSLRQRKSVNALNSPLHQEYEENLGDSIVGYKEKSKFQDTHNNAHY	
Struktur	-----HHHHHHHH-----	
ESPRIT_4	ILESMLCNESSMQSLRQRKSVNALNSPLHQEYEENLGDSIVGYKEKSKFQDTHNNAHY	
ESPRIT_8	ILESMLCNESSMQSLRQRKSVNALNSPLHQEYEENLGDSIVGYKEKSKFQDTHNNAHY	
ESPRIT_40	ILESMLCNESSMQSLRQRKSVNALNSPLHQEYEENLGDSIVGYKEKS-----	
ESPRIT_49	ILESMLCNESSMQSLRQRKSVNALNSPLHQEYEENLGDSIVGYKEKSKFQDTHNNAHY	
ESPRIT_56	ILESMLCNESSMQSLRQRKSVNALNSPLHQEYEENLGDSIVGYKEKSKFQDTHNNAHY	
ESPRIT_62	ILESMLCNESSMQSLRQRKSVNALNSPLHQEYEENLGDSIVGYKEKSKFQDTHNNAHY	
ESPRIT_64	ILESMLCNESSMQSLRQRKSVNALNSPLHQEYEENLGDSIVGYKEKSKFQDTHNNAHY	
ESPRIT_85	ILESMLCNESSMQSLRQRKSVNALNSPLHQEYEENLGDSIVGYKEKSKF-----	
	353	410
TSHR	YVFFEEQEDEIIGFGQELKNPQEETLQAFDSHYDYTI	CGDSEDMVCTPKSDEFNPCED
Struktur	-----EEEE-----	
ESPRIT_4	YVFFEEQEDEIIGFGQELKNPQEETLQAFDSHYDYTI	CGDSEDMVCTPKSDEFNP---
ESPRIT_8	YVFFEEQEDEIIGFGQELKNPQEETLQAFDSHYDYTIS-----	
ESPRIT_40	-----	
ESPRIT_49	YVFFEEQEDEIIGFGQELKNPQEETLQAFDSHYDYTI	CGDSEDMVCTPKSDE-----
ESPRIT_56	YVFFEEQEDEIIGFGQELKNPQEETLQAFDSHYDYTI	CGDSEDMVCTPKSDE-----
ESPRIT_62	YVFFEEQEDEIIGFGQELKNPQEETLQAFDSHYDYTI	CGDSEDMVCTPKSDEFNP---
ESPRIT_64	YVFFEEQEDEIIGFGQELKNPQEETLQAFDSHYDYTI	CGDSEDMVCTPKSDEFNP---
ESPRIT_85	YVFFEEQEDEIIGFGQELKNPQEETLQAFDSHYDYTI	CGDSEDMVCTPKSDEFNP---

**Abb.11: Alignment der aus dem ESPRIT-Ansatz erhaltenen TSHR Hinge-Region-Konstrukte für die heterologe Expression in *E. coli***

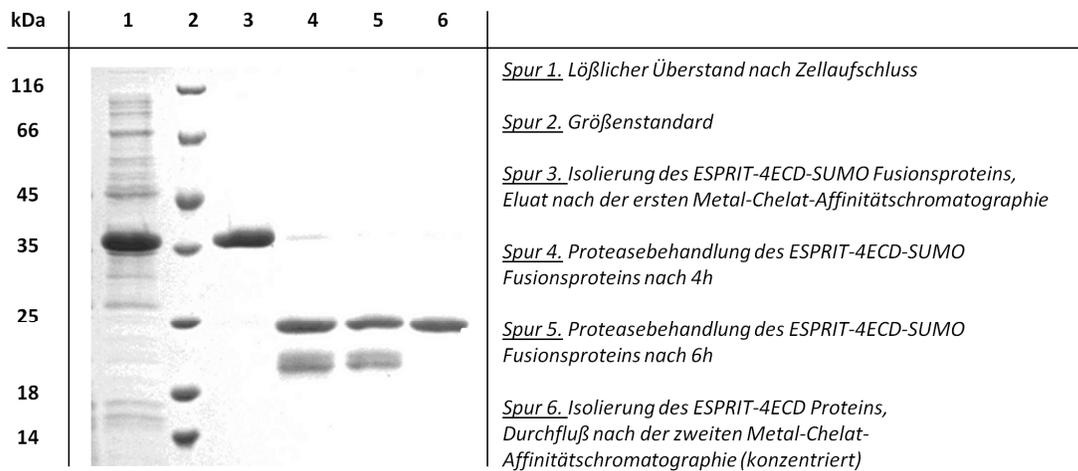
Das Alignment zeigt das TSHR Hinge-Region-Template, sowie 8 repräsentative aus dem ESPRIT-Ansatz erhaltenen TSHR Hinge-Region-Konstrukte für die heterologe Expression in *E. coli*. Potentielle helikale (H) bzw. gefaltete (E) Strukturelemente, die aus dem Sekundärstrukturvorhersageprogramm Jpred3 ermittelt wurden, sind der TSHR Hinge-Region unterlegt. Die blau unterlegten Bereiche markieren die Cysteinboxen 2 und 3 mit den jeweils drei hochkonservierten, schwarz markierten Cysteinen (283; 284; 301; 390; 398; 408). Der grün unterlegte Bereich repräsentiert das im TSHR abspaltbare C-Peptid (Chazenbalk et al., 1997; Loosfelt et al., 1992; Tanaka et al., 1999a).

### 5.1.7.4 Heterologe Proteinexpression und Proteinpräparation des TSHR Hinge-Region-Konstrukts ESPRIT-4CED in *E. coli*

Für die folgende präparative Proteinexpression in *E. coli* wurde das, aus dem ESPRIT-System erhaltene Konstrukt ESPRIT-4 verwendet. Das Konstrukt wurde modifiziert, indem die Aminosäuresequenz „CED“ an den C-Terminus, im Rahmen einer Umklonierung in den Vektor pETHSUL (Weeks et al., 2007) addiert wurde, um die physiologisch relevante Disulfidverbrückung zwischen Cys284 und Cys408 zu

vermitteln. Das somit erhaltene Konstrukt ESPRIT-4CED wurde als Fusionsprotein (N-terminaler His(6x)-SUMO-Tag) im *E. coli*-Stamm T7 Express Rosetta2 hergestellt. Um die Proteinprobe für NMR-Experimente nutzbar zu machen erfolgte die Anzucht unter  $^{15}\text{N}$ -Markierung auf Minimalmedium. Die Proteinisolierung erfolgte in zwei Schritten. Zunächst konnten 85 mg des ESPRIT-4CED-Fusionsproteins mittels einer Metall-Chelat-Affinitätschromatographie isoliert werden. Nach anschließender Dialyse und Abspaltung des Fusionsproteins His(6x)-SUMO (19 kDa) durch die Behandlung mit SUMO-Protease wurde das Proteingemisch über eine zweite Metall-Chelat-Affinitätschromatographie getrennt. Dabei konnte eine Ausbeute von 10% des ausgehenden Fusionsproteins erhalten werden (siehe Abb.12). Das aufgearbeitete ESPRIT-4CED-Konstrukt (22 kDa) wurde anschließend für ein HSQC-NMR-Experiment bereitgestellt.

*Die Ausarbeitung und Optimierung der ESPRIT-4-CED Proteinisolierung wurde von Nils Cremer und Dr. Anne Diehl durchgeführt.*

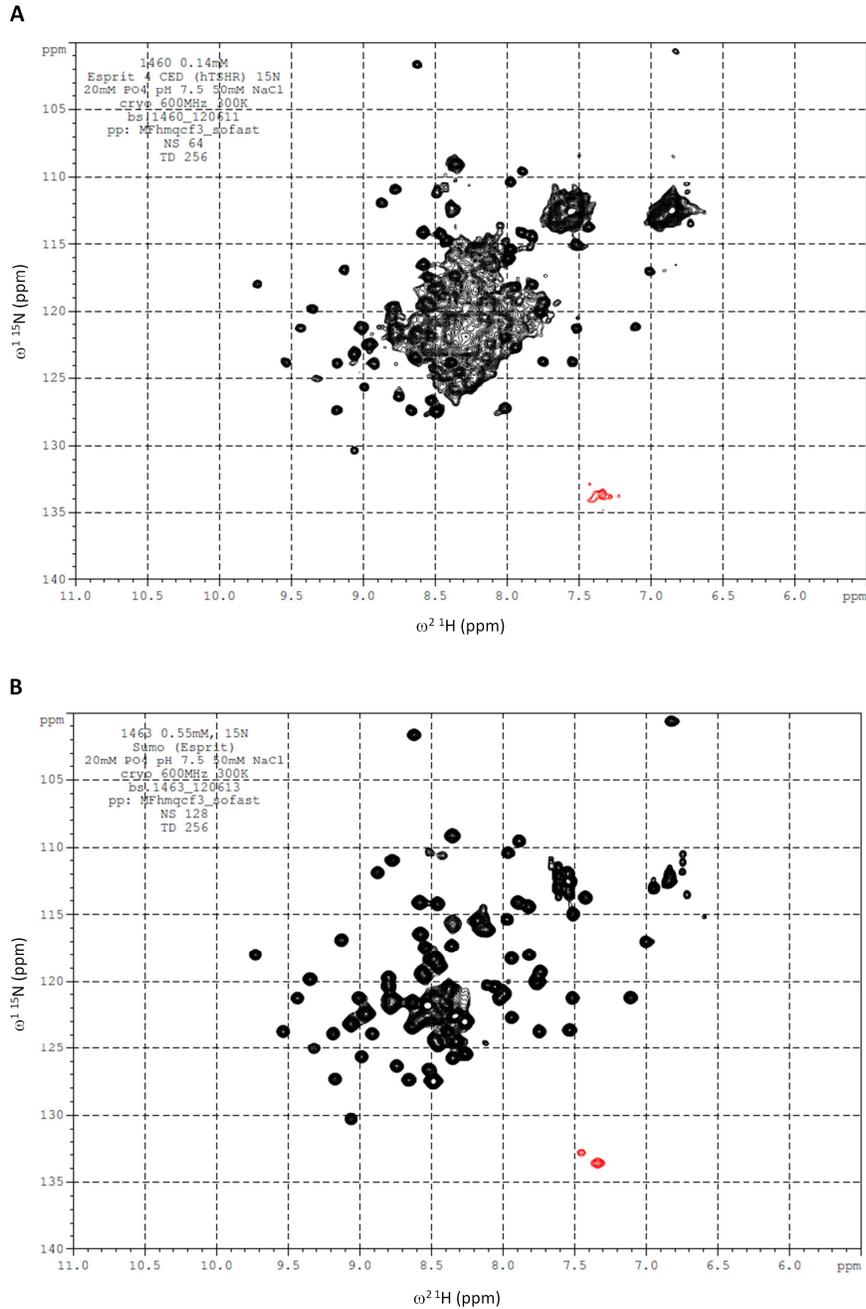


**Abb.12: Proteinisolierung des ESPRIT-4CED Konstrukts**

*Zu sehen ist die Auftrennung der Proteinprobe nach den jeweiligen Arbeitsschritten der Proteinpräparation mittels 15% SDS-PAGE; Coomassie Färbung.*

Zur Überprüfung der Faltungseigenschaften des erhaltenen ESPRIT-4CED-Konstrukts wurde ein HSQC-NMR-Experiment durchgeführt. Als Referenzspektrum wurde die Messung des SUMO-Proteins verwendet. Das HSQC-Spektrum des ESPRIT-4CED-Proteins zeigt überwiegend eine schwache Dispersion und sehr breite, nicht differenzierbare Signale, was auf eine Proteinprobe ohne definierbare Strukturelemente schließen lässt (siehe Abb.13 A). Die vereinzelten definierten Signale konnten ebenfalls im Referenzspektrum gefunden werden, in welchem das

abgespaltene SUMO-Protein vermessen wurde. Dies deutet auf eine Verunreinigung der ESPRIT-4CED-Proteinprobe mit dem SUMO-Protein hin (siehe Abb.13 B).



**Abb.13: HSQC-Spektren des ESPRIT-4CED Proteins**

**A)** HSQC-Spektrum des ESPRIT-4CED-Proteins (0,14 mM), aufgenommen an einem 600 MHz-NMR-Spektrometer, zeigt überwiegend eine schwache Dispersion und sehr breite, nicht differenzierbare Signale, was auf eine Proteinprobe ohne definierbare Strukturelemente schließen lässt. **B)** HSQC des SUMO-Proteins als Referenzspektrum (0,55 mM) aufgenommen an einem 600 MHz-NMR-Spektrometer zeigten definierte Signale, die auch in Spektrum A zu sehen sind. Dies deutet auf eine Verunreinigung der ESPRIT-4CED-Proteinprobe mit dem SUMO-Protein hin.

*Die Aufnahme der HSQC-Spektren erfolgte in der Arbeitsgruppe Dr. Peter Schmieder durch Brigitte Schlegel.*

## **5.2 Struktur-Funktions-Untersuchungen an der Hinge-Region des humanen Lutropinrezeptors (LHR)**

Für die Struktur-Funktions-Untersuchungen an der Hinge-Region wurde der LHR gewählt. Beim LHR handelt es sich um ein Zwei-Hormon-Ein-Rezeptor-Signalisierungssystem. Diese Besonderheit ermöglicht es differenzierte Struktur-Funktions-Studien an der Hinge-Region durchzuführen und im Speziellen die intra- und intermolekularen Signalisierungseigenschaften zu beleuchten.

### **5.2.1 Herstellung von LHR-Mutanten für zellbiologische Untersuchungen**

#### **5.2.2 Partiiell defiziente LHR-Mutanten**

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Hinge-Region und der intermolekularen Rezeptoraktivierung (Trans-Aktivierung) wurde folgender experimenteller Aufbau in Anlehnung an Ji et al. (2002) gewählt (siehe Diskussion 6.2.1, Abb.21):

In einer Koexpression in *HEK 293-Zellen* wurden hormonbindungsdefiziente und signalisierungsdefiziente LHR-Mutanten kombiniert und die intermolekularen Signalisierungseigenschaften analysiert. Dabei wurden bereits beschriebene natürlich vorkommende pathogene Mutanten gewählt, unter anderem die Mutante LHR-delExon10, die eine Deletion von 27 Aminosäuren im Hinge-Region-Bereich aufweist. Beschrieben wurde diese Mutation im Zusammenhang mit einer Fallstudie eines an einer Leydigzellen-Hypoplasie Typ II leidenden, männlichen Patienten aus dem Jahr 2000 (Gromoll et al., 2000).

Als hormonbindungsdefiziente LHR-Mutante wurde das Konstrukt LHR-C131R gewählt. Die natürlich vorkommende Mutation Cys131Arg ist mit dem Phänotyp eines inkompletten Pseudohermaphroditismus eines männlichen Patienten assoziiert (Misrahi et al., 1997). Die biochemische Charakterisierung zeigte einen uneingeschränkten Transport an die Zellmembran, jedoch stark eingeschränkte Hormonbindungseigenschaften. Die Mutation Cys131Arg ist in der LRRD in der konkaven Bindungsregion des LRR4 lokalisiert und liegt somit nicht in einer Disulfidverbrückung vor, wie z.B. die Mutante Cys48Ala, die für diese Art von Studien

beschrieben wurde (Alberti et al., 2001; Rivero-Muller et al., 2010). Die Wahrscheinlichkeit einer Störung der Faltung der LRRD durch die Mutation Cys131Arg ist damit gering. Die Mutation wurde über zielgerichtete Mutagenese als *mCherry*-fusioniertes Rezeptorkonstrukt hergestellt.

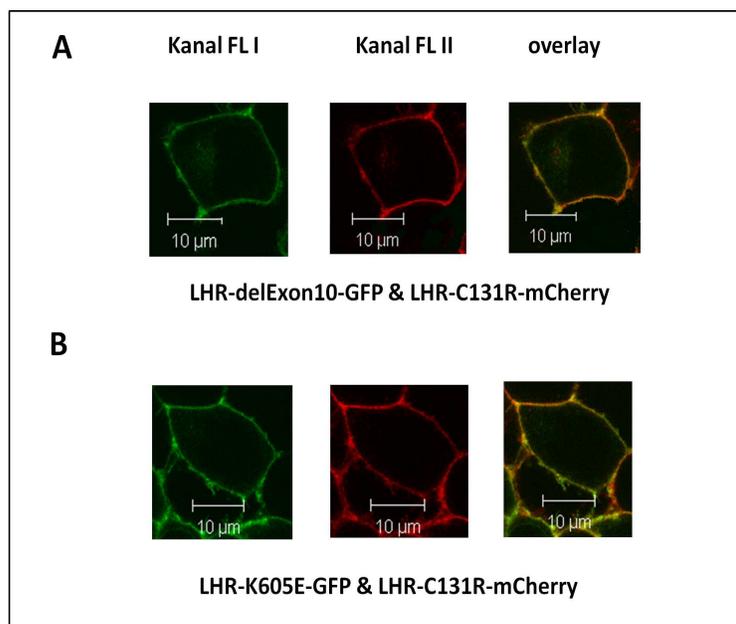
Um den Zusammenhang zwischen der Hinge-Region und der intermolekularen Signalisierung zu beleuchten wurde die hormonbindungsdefiziente LHR-Mutante in einer Koexpression mit dem partiell signalisierungsdefizienten Konstrukt LHR-delExon10 kombiniert. Die Mutante LHR-delExon10 ist durch eine genetische Manipulation ebenfalls innerhalb des extrazellulären Bereichs des LHR charakterisiert. Bei dieser Deletionsmutation ist auf genetischer Ebene das gesamte Exon10, welches 27 Aminosäuren im Hinge-Region-Bereich kodiert, deletiert. Die biochemische Charakterisierung zeigte eine eingeschränkte Funktionalität dieser Rezeptorvariante bei Stimulation mit LH, bei gleichzeitigem uneingeschränktem Bindungsverhalten beider Hormone LH und CG (Muller et al., 2003). Die Deletionsmutante wurde über die *SOE-PCR* als GFP-fusioniertes Rezeptorkonstrukt hergestellt. Um mögliche Unterschiede auf der Seite der Effektoren zu untersuchen wurde das signalisierungsdefiziente Konstrukt LHR-K605E als Kombinationspartner des LHR-C131R-Konstrukts verwendet. Die Mutation Lys605Glu befindet sich in der TMH 7 und führt zu einem totalen Verlust der Signalisierungsfähigkeit. Das Konstrukt verfügt also über eine komplette, nicht manipulierte Hinge-Region. Die Mutation Lys605Glu wurde bereits an homologer Position im FSHR beschrieben (Ryu et al., 1998) und hier ebenfalls mittels zielgerichteter Mutagenese als GFP-fusioniertes Rezeptorkonstrukt hergestellt.

## 5.2.3 Untersuchung zur intra- und intermolekularen Rezeptoraktivierung am LHR

### 5.2.3.1 Oberflächenexpression und Kolokalisation der partiell defizienten LHR-Mutanten

Eine Voraussetzung für die intermolekulare Signalisierung ist die Kolokalisation beider defizienter Rezeptorkonstrukte an der Plasmamembran. Zur Überprüfung der Gesamtexpression wurden die fluoreszenzproteinfusionierten LHR-Konstrukte mittels FACS vermessen. Mittels der anschließend durchgeführten Membranquantifizierung konnte die Oberflächenexpression der verwendeten Rezeptorkonstrukte bestimmt und miteinander verglichen werden. Die Vermessung der einzelnen fluoreszenzprotein-fusionierten LHR-Konstrukte mittels FACS zeigte für alle verwendeten Varianten keine signifikanten Expressionsunterschiede zum GFP-fusionierten LHR-Wildtyp (siehe Tab.2). Die Quantifizierung des Plasmamembran/Intrazellulär Verhältnisses der defizienten LHR-Varianten ergab einen zwei- bis dreifachen Überschuss der Rezeptorlokalisierung an der Plasmamembran.

Im Falle der transienten Kotransfektion wurde eine hohe Kolokalisation beider Paare (LHR-C131R und LHR-K605E oder LHR-delExon10) an der Plasmamembran mittels LSM festgestellt (siehe Abb.14).



**Abb.14: LSM Aufnahme der in HEK 293 koexprimierten fluoreszenzmarkierten LHR-Mutanten**

Die hormonbindungs- und signalisierungsdefizienten LHR-Mutanten sind in der Koexpression an der Plasmamembran der Zelle kolokalisiert. Kanal FL I zeigt das GFP-fusionierte Konstrukt; Kanal FL II zeigt das mCherry-fusionierte Konstrukt. Die Expression der fluoreszenzmarkierten LHR-Mutanten erfolgte transient in HEK 293-Zellen, die Aufnahme erfolgte mittels konfokaler LSM.

**Tab.2: Oberflächenexpression der partiell defizienten LHR-Mutanten**

Die Tabelle stellt die mittels FACS-Messung ermittelte Gesamtexpression der verwendeten Konstrukte dar, wobei der LHR-Wildtyp auf 100% gesetzt ist. Das Verhältnis der Kolo-kalisation an der Plasmamembran und im Zellinneren der verwendeten LHR-Mutanten wurde mittels Membranquantifizierung der transient transfizierten HEK 293-Zellen ermittelt. Die relative Rezeptor-Oberflächenexpression wurde aus der Kombination der FACS- und Membranquantifizierungsdaten berechnet. Die berechneten Werte wurden als Prozentzahlen in Bezug auf die korrespondierende Einzelexpression in den jeweiligen Kanälen GFP (FL I) und mCherry (FL II) dargestellt.

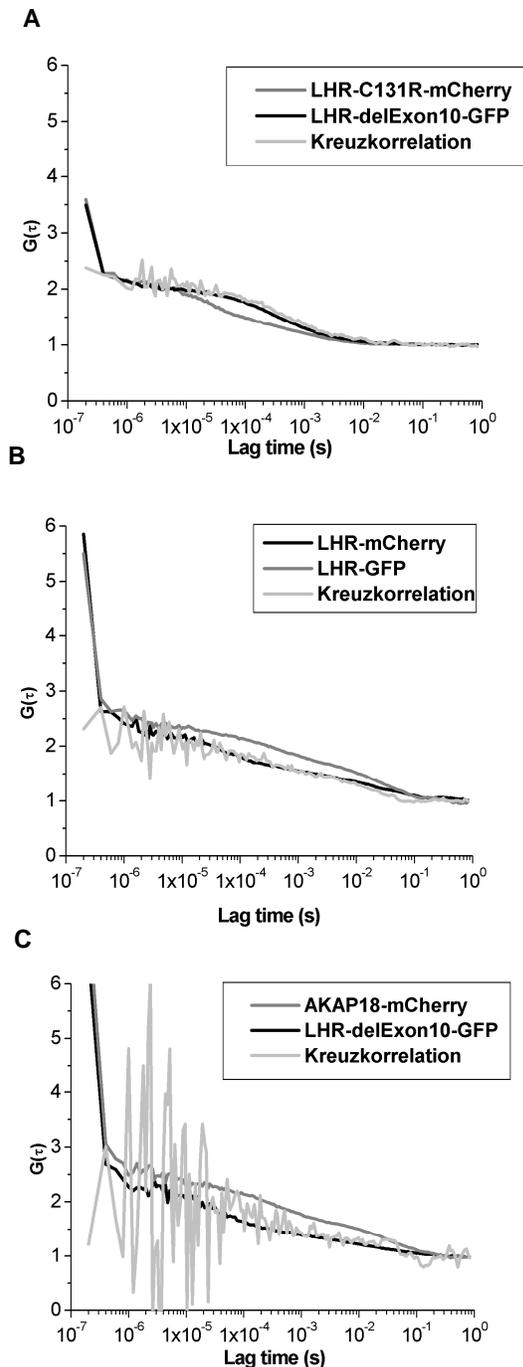
Gesamtexpression in HEK 293-Zellen		Membranquantifizierung		
Konstrukte (Einzelexpression)	Gesamtexpression % LHR-Wildtyp 100	Verhältnis Membran/ Intrazellular	SD	Zellzahl
LHR-delExon10-GFP	81 ± 8	2,2	0,4	32
LHR-K605E-GFP	92 ± 10	2,2	0,6	31
LHR-C131R-mCherry	88 ± 11	2,4	0,8	34
Bestimmung der relativen Rezeptor-Oberflächenexpression				
Konstrukte (Koexpression)	GFP-Kanal (FL I) % korrespondierende Einzelexpression	GFP-Kanal (FL II) % korrespondierende Einzelexpression		
LHR-delExon10-GFP & LHR-C131R-mCherry	32 ± 10	48 ± 9		
LHR-K605E-GFP & LHR-C131R-mCherry	32 ± 8	45 ± 7		

FACS Messungen der beiden Koexprimierten LHR-Konstrukte LHR-C131R und LHR-K605E oder LHR-delExon10 zeigten jedoch eine signifikante Reduktion der Gesamtexpression beider Konstrukte im Vergleich zu deren Einzelexpression. Das Plasmamembran/Intrazellular-Verhältnis wies keine signifikanten Unterschiede zur korrespondierenden Einzelexpression auf (siehe Tab.2).

### 5.2.3.2 Oligomerisierung der LHR-Mutanten

Eine Voraussetzung für die intermolekulare Signalisierung ist die Oligomerisierung der Rezeptoren zu einer kompletten Signalisierungseinheit. Die Oligomerisierungseigenschaften der in der Koexpression verwendeten defizienten LHR-Varianten wurden mittels FCCS untersucht. Dabei wurde jedes Rezeptorenpaar auf signifikante Kreuzkorrelation untersucht, welche auf eine Kodiffusion im konfokalen Volumen und damit auf eine Interaktion zwischen beiden Molekülen hinweist. Als Positivkontrolle wurde der LHR-Wildtyp verwendet, für den bereits eine Homooligomerisierung beschrieben wurde (Guan et al., 2009).

Als Negativkontrolle wurde ein plasmamembranverankertes AKAP18a-mCherry-Konstrukt zusammen mit dem LHR-delExon10-Konstrukt koexprimiert und die Kreuzkorrelation gemessen. Es konnte eine Kreuzkorrelation von 7% ermittelt werden, welches dem *cross-talk* des Systems entspricht und damit keine Molekülinteraktion aufweist. Repräsentative Auto und Kreuzkorrelationskurven für die vermessenen Rezeptorkombinationen sind in der Abbildung 15 gezeigt.



**Abb.15: Repräsentative normalisierte Auto- und Kreuzkorrelationskurven der verwendeten LHR-Mutanten und der Kontroll-Konstrukte.**

Für die FCCS-Messung wurden transient transfizierte HEK 293-Zellen verwendet. Die Messung erfolgte an der basalen Plasmamembran.

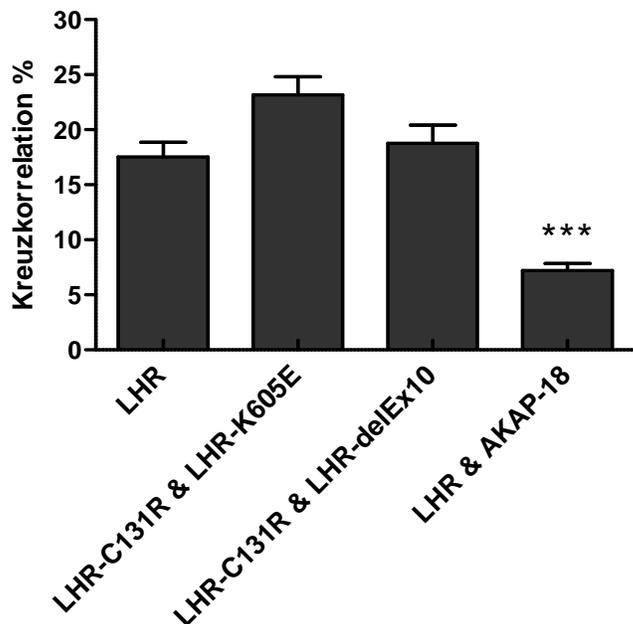
**A)** Repräsentative normalisierte Auto- und Kreuzkorrelationskurven für die koexprimierten LHR-Mutanten LHR-delExon10-GFP und LHR-C131R- mCherry.

**B)** Repräsentative normalisierte Auto- und Kreuzkorrelationskurven für den LHR-Wildtyp (Positivkontrolle).

**C)** Repräsentative normalisierte Auto- und Kreuzkorrelationskurven für die koexprimierte LHR-Mutante LHR-delExon10-GFP und membranverankertes AKAP18a-mCherry-Protein (Negativkontrolle).

Die Autokorrelationskurven der individuellen Fluorophore sind in schwarz und dunkelgrau illustriert, die Kreuzkorrelation ist in hellgrau dargestellt.

Für alle verwendeten Rezeptorkombinationen inklusive des LHR-delExon10 Konstrukts konnte eine signifikante Kreuzkorrelation an der basalen Zellmembran nachgewiesen werden (siehe Abb.16).



**Abb.16: Analyse der Oligomerisierung der LHR-Mutanten mittels FCCS**

Die mittels FCCS erhaltenen Messdaten zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen dem LHR-Wildtyp und den koexprimierten Paaren aus signalisierungs- und hormonbindungsdefizienten LHR-Mutanten. Das Säulendiagramm repräsentiert Mittelwerte der Kreuzkorrelation aller vermessenen Zellen ( $n > 98$ ) aus mindestens fünf unabhängig durchgeführten Experimenten (\*\*\*)  $p < 0.001$ ). Als Negativkontrolle wurde die Koexpression von LHR-delExon10-GFP und einem membranverankertem AKAP18a-mCherry-Protein verwendet. Der cross-talk betrug für diesen experimentellen Aufbau 7%.

Somit hat weder die Exon10-Deletion noch die Einführung der Punktmutationen Cys131Arg und Lys605Glu einen signifikanten Einfluss auf die Rezeptor-Oligomerisierung. Eine Störung der Rezeptor-Oligomerisierung durch das Fehlen des Exon10-Bereichs ist somit widerlegt.

### 5.2.3.3 Intermolekulare Signalisierungseigenschaften kotransfizierter LHR-Konstrukte

Alle verwendeten defizienten LHR-Konstrukte wurden als fluoreszenzprotein-fusionierte Proteine (GFP oder mCherry) exprimiert und mit den beiden Hormonen LH und CG stimuliert.

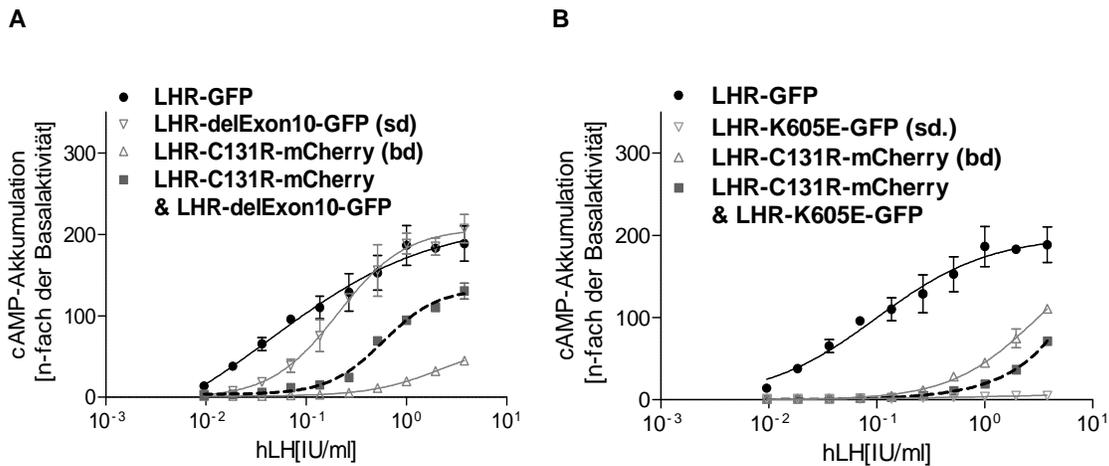
Die  $EC_{50}$  Werte des GFP-fusionierten LHR-Wildtyps konnten aus der Konzentrations-Wirkungs-Kurve nach Stimulation mit LH und CG ermittelt werden.

Der  $EC_{50}$  Wert für die Stimulation mit LH betrug 0,14 IU/ml (95% Konfidenzintervall 0,09-0,21), während der Wert für CG mit 0,10 IU/ml (95% Konfidenzintervall 0,07-0,14) ermittelt wurde.

Der Vergleich der ermittelten Werte mit den korrespondierenden nicht fluoreszenzproteininfundierten Rezeptorvarianten ergab keine signifikanten Unterschiede für die  $EC_{50}$  Werte.

Während das einzeltransfizierte Konstrukt LHR-K605E (signalisierungsdefizient) kaum eine cAMP-Antwort bei Stimulation mit LH und CG zeigte (<2%), war die cAMP-Akkumulation für das hormonbindungsdefiziente Konstrukt LHR-C131R stark reduziert und die Konzentrations-Wirkungs-Kurve stark rechts verschoben. Die  $EC_{50}$  Werte konnten aufgrund der dafür benötigten hohen Hormonkonzentrationen nicht detektiert werden (siehe Abb.17)

Die partiell signalisierungsdefiziente Mutante LHR-delExon10 zeigte eine wildtypische Signalisierung bei Stimulation mit CG, jedoch eine eingeschränkte LH-induzierte Funktion, welche in einen 4,2-fach höheren  $EC_{50}$  Wert (95% Konfidenzintervall 2,5 - 6,9) im Vergleich zum LHR-Wildtyp resultierte (siehe Abb.17)



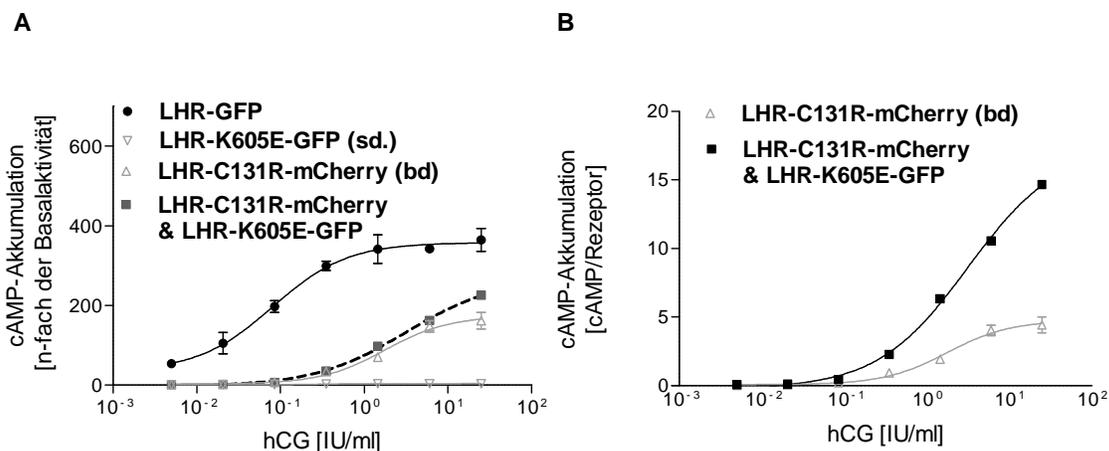
**Abb.17: Repräsentative Konzentrations-Wirkungs-Kurven der kombinierten partiell defizienten LHR-Mutanten für die LH-Stimulation**

HEK 293-Zellen wurden mit einer Kombination aus einem signalisierungs- und einem hormonbindungsdefizienten LHR-Konstrukt transient kotransfiziert und mit steigenden LH-Konzentrationen stimuliert. Die cAMP-Akkumulation wurde aufgenommen und die  $EC_{50}$ - und  $cAMP_{max}$ -Werte aus der Konzentration-Wirkungs-Kurve ermittelt. Als Referenz dienen der LHR-Wildtyp, sowie die jeweiligen Einzeltransfektionen. **A)** Die repräsentative Konzentrations-Wirkungs-Kurve der kotransfizierten Kombination aus dem partiell signalisierungsdefizienten Konstrukt LHR-delExon10 und dem hormonbindungsdefizienten Konstrukt LHR-C131R zeigten keine erhöhte cAMP-Antwort und damit keine Rettung der LHR-Signalisierungseinheit durch intermolekulare Aktivierung. **B)** Die repräsentative Konzentrations-Wirkungs-Kurve der kotransfizierten Kombination aus dem signalisierungsdefizienten Konstrukt LHR-K605E und dem hormonbindungsdefizienten Konstrukt LHR-C131R zeigten keine erhöhte cAMP-Antwort und damit keine Rettung der LHR-Signalisierungseinheit durch intermolekulare Aktivierung. Die Experimente wurden mindestens dreimal im Duplikat unabhängig voneinander durchgeführt ( $p$ -Wert < 0.05).

Für die Untersuchung der intermolekularen Signalisierungseigenschaften der kotransfizierten LHR-Konstrukte musste zur Vorbeugung von Fehlinterpretationen zunächst eine Abhängigkeit zwischen ermittelter cAMP-Akkumulation aus dem cAMP-Bioassay und der Rezeptorexpression an der Zelloberfläche aus den FACS- und Membranquantifizierungsdaten formuliert werden.

Für die Ermittlung der relativen Rezeptoren-Oberflächenexpression wurden die Daten aus der FACS-Messung mit den Daten aus der Membranquantifizierung verrechnet. Im ersten Schritt wurden die Fluoreszenzintensitäten der mCherry-fusionierten Rezeptorvarianten korrigiert, indem einerseits die Hintergrund-Fluoreszenz nicht transfizierter *HEK 293-Zellen* von den erhaltenen Werten abgezogen wurde und andererseits der *cross talk* des GFP-Kanals ermittelt und subtrahiert wurde. Der korrigierte Parameter der Gesamtexpression der mCherry-fusionierten Rezeptorvarianten wurde mit den Werten des Plasmamembran/Intrazellular-Verhältnisses verrechnet, um die relative Rezeptoren-Oberflächenexpression zu ermitteln. Im letzten Schritt wurde die cAMP-Akkumulation der auf den basalen Wert normalisierten Konzentrations-Wirkungs-Kurven durch die relative Rezeptoren-Oberflächenexpression dividiert, um die Abhängigkeit zwischen cAMP-Produktion und der relativen Rezeptoren-Oberflächenexpression zu erhalten. Die Signifikanz der Unterschiede in den Signalisierungseigenschaften der koexprimierten defizienten Rezeptorvarianten wurde mittels eines t-Tests überprüft.

Im Vergleich zu den einzeltransfizierten *HEK 293-Zellen*, zeigte nur die kotransfizierte und CG-stimulierte Kombination LHR-K605E (signalisierungsdefizient) und LHR-C131R (hormonbindungsdefizient) eine erhöhte cAMP-Antwort. Aufgrund der Restaktivität des LHR-C131R konnte zunächst keine hoch signifikante intermolekulare Signalisierung (Trans-Aktivierung) festgestellt werden. Der Effekt der Trans-Aktivierung konnte jedoch hoch signifikant nachgewiesen werden, nachdem die erhöhte cAMP-Antwort in Relation zur relativen Rezeptoren-Oberflächenexpression (cAMP als n-faches zum basalen Wert pro relative Rezeptoren-Oberflächenexpression) zwischen einzel- und kotransfizierten Zellen gesetzt wurde. Aus den ermittelten FACS-Daten geht hervor, dass die Rezeptorexpression der kotransfizierten Zellen (LHR-C131R-mCherry und LHR-K605E-GFP) im Vergleich zu den jeweiligen Einzeltransfektionen stark reduziert ist (siehe Abb.18).



**Abb.18: Repräsentative Konzentrations-Wirkungs-Kurven der kombinierten partiell defizienten LHR-Mutanten für die CG-Stimulation**

HEK 293-Zellen wurden mit einer Kombination aus einem signalisierungs- und einem hormonbindungsdefizienten LHR-Konstrukt transient kotransfiziert und mit steigenden CG-Konzentrationen stimuliert. Die cAMP-Akkumulation wurde aufgenommen und die  $EC_{50}$ - und  $cAMP_{max}$ -Werte aus der Konzentrations-Wirkungs-Kurve ermittelt. Als Referenz dienen der LHR-Wildtyp, sowie die jeweiligen Einzeltransfektionen. **A)** Die repräsentativen Konzentrations-Wirkungs-Kurven der kotransfizierten Kombination aus dem signalisierungsdefizienten Konstrukt LHR-K605E und dem hormonbindungsdefizienten Konstrukt LHR-C131R zeigt keine hoch signifikante Erhöhung der cAMP-Antwort im Vergleich zur Einzeltransfektion. Eine partielle Rettung der LHR-Signalisierungseinheit kann nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. **B)** Die auf die relative Rezeptoren-Oberflächenexpression kalkulierte Konzentrations-Wirkungs-Kurve der kotransfizierten Kombination aus dem signalisierungsdefizienten Konstrukt LHR-K605E und dem bindungsdefizienten Konstrukt LHR-C131R zeigt, im Vergleich zur Einzeltransfektion, eine hoch signifikant erhöhte cAMP-Antwort und damit eine partielle Rettung der LHR-Signalisierungseinheit durch intermolekulare Aktivierung. Die Experimente wurden mindestens dreimal im Duplikat unabhängig voneinander durchgeführt ( $p$ -Wert < 0.05)

Die Normalisierung der cAMP-Werte auf die Rezeptorexpression resultierte in einer dreifach höheren cAMP-Antwort der CG-stimulierten kotransfizierten Zellen im Vergleich zu den Einzeltransfektionen. Dieser Unterschied zwischen den Konzentrations-Wirkungs-Kurven ist hochsignifikant ( $p < 0,001$ ), sodass eine partielle Rettung der LHR-Signalisierungseinheit mittels intermolekularer Aktivierung (Trans-Aktivierung) angenommen werden kann.

Im Gegensatz dazu, konnte diese cAMP-Rettung bei Stimulation mit LH nicht gefunden werden. Es konnte keine erhöhte cAMP-Akkumulation sowohl bei den Kotransfektionen LHR-C131R und LHR-delExon10 als auch LHR-C131R und LHR-K605E nachgewiesen werden. Diese Feststellung impliziert, dass die LH-induzierte Rezeptorsignalisierung nur intramolekular (Cis-Aktivierung) abläuft.

*Die Durchführung des Radioimmunoassays zur Ermittlung der Rezeptor-signalantwort erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Jens Furkert.*

#### **5.2.4 Generierung der Rezeptor-Mutanten zur Struktur-Funktions-Studie an der Hinge-Region des LHR**

Für die Untersuchungen struktureller Eigenschaften im Exon10-Bereich des LHR wurden über zielgerichtete Mutagenese und über die *SOE-PCR*, potentielle Strukturelemente der Hinge-Region und speziell des Exon10-Bereichs imitiert bzw. gestört. Dabei sollte differenziert werden, ob es sich bei dem Exon10-Bereich um einen inerten Platzhalter, eine strukturelle Plattform zur Signalisierung oder einen signalisierungssensitiven Bereich mit essentiellen Aminosäuremotiven handelt. Um einen potentiellen Strukturbereich in der translatierten Exon10-Region (Aminosäuren 290 bis 316) zu imitieren, wurde ein Polyalaninblock-Scan durchgeführt. Der partielle Aminosäureaustausch gegen eine Serie von jeweils fünf (LHR-Ala1-3) oder sechs (LHR-Ala 4-5) Alaninen, welche in diesem Bereich eine mögliche Struktur ausbilden sollten, erfolgte über die Amplifikation mittels *SOE-PCR* und anschließender Insertion über die *BamHI*- und *KpnI*-Restriktionsschnittstelle zur Konstruktion von GFP-fusionierten Rezeptorkonstrukten. Das Konstrukt LHR-Ala6 beinhaltet eine Polyalaninblock-Substitution der Aminosäuren Ser318 bis Ser323. Diese Region wurde bereits als signalisierungssensitiv beschrieben (Bruysters et al., 2008).

Um potentielle Strukturelemente zu stören, wurden in den betrachteten Exon10-Bereich Prolinmutationen an der Position Gln303 und Glu305 eingeführt. Zusätzlich wurde in der LHR-Wildtyp cDNA eine Prolinmutation an der Position Met320 eingeführt. Die Position Met320 befindet sich im signalisierungssensitiven Bereich des LHR. Die Einführung der Prolinmutationen wurde mittels zielgerichteter Mutagenese durchgeführt. Eine Aufstellung der verwendeten Konstrukte ist in Abbildung 19 dargestellt.

	290	Exon10-Region	316	Tyr331-Region	331
LHR-Wildtyp	QNFSHSISENFSKQCESTVRKVSNKTLYSSMLAESELSGWDY				
Struktur	---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH---HHHHHH-----				
LHR-Ala1	AAAAASISENFSKQCESTVRKVSNKTLYSSMLAESELSGWDY				
LHR-Ala2	QNFSHAAAAAFSKQCESTVRKVSNKTLYSSMLAESELSGWDY				
LHR-Ala3	QNFSHSISENAAAAAESTVRKVSNKTLYSSMLAESELSGWDY				
LHR-Ala4	QNFSHSISENFSKQCAAAAAAVSNKTLYSSMLAESELSGWDY				
LHR-Ala5	QNFSHSISENFSKQCESTVRKAAAAAYSSMLAESELSGWDY				
LHR-Ala6	QNFSHSISENFSKQCESTVRKVSNKTLYAAAAAAEELSGWDY				
LHR-Q303P/E308P	QNFSHSISENFSKPCPSTVRKVSNKTLYSSMLAESELSGWDY				
LHR-M320P	QNFSHSISENFSKQCESTVRKVSNKTLYSSPLAESELSGWDY				
LHR-delExon10	-----YSSMLAESELSGWDY				

**Abb.19: Alignment der verwendeten LHR-Polyalaninblock- und -Prolin-Konstrukte**

Das Alignment zeigt die Lage der Poyalaninblock-Substitutionen sowie die insertierten Prolinmutationen in der Exon10- und der Tyr331-Region der verwendeten LHR-Konstrukte. Potentielle helikale (H) Strukturelemente, die aus dem Sekundärstrukturvorhersageprogramm I-Tasser ermittelt wurden, sind der LHR-Wildtyp Sequenz unterlegt. Der dunkelgrau unterlegte Bereich repräsentiert das signalisierungssensitive Asp330/Tyr331-Motiv.

#### 5.2.4.1 Oberflächenexpression und Kolokalisation der für die Strukturuntersuchung verwendeten LHR-Mutanten

Die Daten der FACS-Messungen zeigten sowohl für die Poyalaninblock-Konstrukte LHR-Ala1-6 als auch für die Prolinmutanten LHR-D303P/E305P, LHR-M320P und LHR-delExon10-M320P keine signifikanten Unterschiede zur LHR-Wildtyp Gesamtexpression. Die Quantifizierung des Verhältnisses der Kolokalisation Membran/Intrazellular zeigten einen zweifach höheren Rezeptorüberschuss an der Plasmamembran (siehe Tab.3)

Die quantifizierten Daten unterstreichen die mittels LSM beobachtete hohe Kolokalisation aller verwendeter LHR-Konstrukte an der Plasmamembran.

**Tab.3: Oberflächenexpression der LHR-Polyalaninblock und -Prolin-Mutanten**

Die Tabelle stellt die mittels FACS-Messung ermittelte Gesamtexpression der verwendeten Konstrukte dar, wobei der LHR-Wildtyp auf 100% gesetzt ist. Das Verhältnis der Kolokalisation an der Plasmamembran und im Zellinneren der verwendeten LHR-Mutanten wurde mittels Membranquantifizierung der transfizierten HEK 293-Zellen ermittelt.

Konstrukte Einzelexpression	Gesamtexpression % LHR-Wildtyp	Membranquantifizierung		
		Verhältnis Membran/ Intrazellular	SD	n
LHR-Wildtyp	100	2,2	0,4	31
LHR-Ala1	89 ± 8	2,3	0,8	31
LHR-Ala2	104 ± 10	2,2	0,6	30
LHR-Ala3	105 ± 12	2,1	0,6	29
LHR-Ala4	104 ± 12	2,1	0,5	30
LHR-Ala5	94 ± 2	2,2	0,4	31
LHR-Ala6	98 ± 3	2,2	0,6	30
LHR-320P	99 ± 4	2,2	0,6	28
LHR-303P/305P	93 ± 3	2,2	0,4	30
LHR-delExon10	89 ± 8	2,2	0,4	31

#### 5.2.4.2 Signalisierungseigenschaften der LHR-Polyalaninblock- und -Prolin-Konstrukte

Die einzeltransfizierten LHR-Polyalaninblock-Mutanten 1 bis 5, in denen sich die Polyalanine sequentiell über den gesamten Exon10-Bereich erstrecken (siehe Abb.19), zeigten nach Stimulation mit LH und CG keine signifikanten Unterschiede in den  $cAMP_{max}$ - und  $EC_{50}$ -Werten im Vergleich zum LHR-Wildtyp. Analog dazu, konnten keine Unterschiede in der Rezeptorsignalisierung für die Polyalaninblock-Mutante LHR-Ala6, in der die Tyr331-Region durch 7 Alanine substituiert ist, beobachtet werden. Eine funktionsrelevante Aminosäurespezifität in diesen beiden signalisierungssensitiven Bereichen kann somit ausgeschlossen werden. Ausgeschlossen werden kann auch die funktionale Notwendigkeit einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen Cys304 und Cys336 innerhalb der Hinge-Region (siehe Abb.4), da die Polyalaninblock-Mutation LHR-Ala3, welche das Cystein Cys304 einschließt (siehe Abb.19), keinen funktionellen Effekt aufweist.

Die Stimulation der partiell signalisierungsdefizienten Deletionsmutante LHR-delExon10 resultierte in einer nach rechts verschobenen Konzentrations-Wirkungskurve für LH was zu einer 4,2-fachen Verschlechterung des  $EC_{50}$ -Wertes gegenüber dem LHR-Wildtyp führt (95% Konfidenzintervall 2,5-6,9). Die CG-induzierte Funktion ist hingegen nicht beeinflusst.

Die Einführung der Doppel-Prolinmutation Q303P/E305P, welche zum Ziel hatte eine Störung des vermuteten Strukturelements im Exon10-Bereich zu verursachen, führte zu einer Inversion der beobachteten Signalisierungseigenschaften. Während die LH-induzierte Funktion nicht beeinflusst war, konnte eine 4,3-fache Erhöhung des  $EC_{50}$ -Wertes (95% Konfidenzintervall 3,1-6,9) und somit eine reduzierte Funktionalität nach Stimulation mit CG festgestellt werden.

Die Einführung einer Prolinmutation Met320Pro in den Bereich des vermuteten Strukturelements der Tyr331-Region zeigte im Vergleich zum LHR-Wildtyp jedoch keine signifikanten Unterschiede in den Signalisierungseigenschaften nach LH- und CG-Stimulation. Dies deutet darauf hin, dass die mittels Strukturvorhersage vermutete Helix der Tyr331-Region im LHR-Wildtyp keine funktionelle Relevanz besitzt.

*Die Durchführung des Radioimmunoassays zur Ermittlung der Rezeptor-signalantwort erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Jens Furkert.*

## 6. Diskussion

### 6.1 Die Hinge-Region, ein nicht strukturautonomer signalisierungssensitiver Bereich der GPHR

#### 6.1.1 Expressionsstudien zur Isolierung eines TSHR Hinge-Region-Fragments für strukturelle Voruntersuchungen

Die Hinge-Region der GPHR bildet das Kernstück in der Signalweiterleitung nach der primären Bindung des Liganden an der LRRD und initiiert die Konformationsänderung innerhalb der SD vom inaktiven in den aktiven Rezeptorzustand (Bernard et al., 1998; Costagliola et al., 2002; Kleinau and Krause, 2009; Kosugi et al., 1991; Mizutori et al., 2008; Mueller et al., 2008; Nagayama and Rapoport, 1992; Nurwakagari et al., 2007). Weiterhin konnte durch Struktur-Funktions-Studien am TSHR und am LHR gezeigt werden, dass die Hinge-Region an der Stabilisierung des basalen Zustands durch Freisetzung eines intramolekularen agonistischen Effekts beteiligt ist (Mizutori et al., 2008; Nurwakagari et al., 2007; Sangkuhl et al., 2002; Vlaeminck-Guillem et al., 2002). Bei allen drei GPHR ist die Hinge-Region außerdem für die Justierung der korrespondierenden GPB an der primären Bindungsregion der LRRD sowie für die Bereitstellung sekundärer Bindungsbereiche verantwortlich (Mueller et al., 2009b). Funktionell und strukturell ist die doppelte Disulfidverbrückung, welche den N-terminalen Bereich der Cb2 und den C-terminalen Bereich der Cb3 zu einer kompakten Signalisierungsplattform formt, essentiell. Weitgehend ungeklärt ist die Frage des intramolekularen Zusammenspiels der in der Hinge-Region gefundenen potentiellen Strukturelemente bei der Signalweiterleitung sowie der Mechanismus der Interaktion über die bekannten Triggerpunkte bei der Stabilisierung der Ligandenbindung. Um detaillierte molekulare Mechanismen der Initiation der Konformationsänderung zu betrachten, ist die Erfassung räumlicher Relationen potentiell strukturierter Bereiche essentiell. Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin zu untersuchen, ob es sich bei der Hinge-Region um einen strukturautonomen, domänenähnlichen Bereich handelt oder ob die Ausbildung potentieller Strukturen intrinsisch durch intramolekulare bzw. externe Ligandeninteraktionen erfolgt.

Die Strategie sah vor, Hinge-Region-kodierende Konstruktorschläge einer Expressionsstudie zu unterziehen und bei einer erfolgreichen Isolierung des Hinge-Region-Fragments, dessen potentiell strukturierte Bereiche Lösungs-NMR-unterstützt zu untersuchen. Da Sequenzuntersuchungen sowie Sekundärstrukturvorhersagen

viele flexible Bereiche innerhalb der Hinge-Region der GPHR aufzeigten, welche die Formation der Kristallpackung inhibieren können, war zu vermuten, dass eine Strukturuntersuchung mittels Kristallographie erschwert ist (An et al., 2011).

*E. coli*-Expression: Für die rekombinante Proteinexpression wurde zunächst der Expressionswirt *E. coli* gewählt. Als Template für das rationale Design der Hinge-Region-Konstrukte für die heterologe Proteinexpression diente die Hinge-Region des TSHR. Zum einen besitzt die Hinge-Region des TSHR im Vergleich zu den beiden anderen Rezeptoren FSHR und LHR weniger Modifikationen, die durch *E. coli* als Expressionswirt nicht bedient werden können (eine potentielle Glykosylierungsstelle (Asp302) und eine Sulfatierungsstelle (Tyr385)). Zum anderen besitzt die TSHR Hinge-Region durch das vorhandene abspaltbare C-Peptid, das längste und potentiell strukturreichste Cb2/Cb3-Verbindungsstück der drei GPHR (Mueller et al., 2009a).

Die Konstruktauswahl erfolgte nach vorangegangener bioinformatischer Analyse. Durch Definition potentiell strukturierter Bereiche mittels Sequenzanalyse und Sekundärstrukturvorhersage wurden die flexiblen Regionen der TSHR Hinge-Region für die Konstruktfestlegung minimiert. Sechs optimierte Konstrukte wurden in das pET-System (Novagen) subkloniert. Die Fusion der Hinge-Region-Konstrukte an die vektorabhängigen funktionellen Proteine hatte zum einen den Vorteil einer flexiblen Proteinaufreinigungs- und Trennungsstrategie (Bsp. His(6x)-Tag und GST-Tag) nach erfolgter Überexpression, zum anderen dienen stark strukturierte Fusionsproteine (Bsp. GST oder Thioredoxin) zur Stabilisierung des Zielproteins während der Isolierung. Gleichzeitig wurde durch die breite Auswahl an modifizierten *E. coli*-Expressionsstämmen versucht eine verbesserte lösliche Proteinexpression und damit eine Stabilisierung des Zielproteins zu erreichen. In der Tat konnte die lösliche Überexpression der Zielproteine besonders durch die GST-Fusion verbessert werden. Als eine besondere Herausforderung stellte sich jedoch die lösliche Überexpression des Hinge-Region-Fragments als homogene Proteinprobe mit korrekter Disulfidverbrückung heraus. Dazu wurde auf den *E. coli*-Expressionsstamm *Shuffle* T7 zurückgegriffen, der durch genetische Manipulation im Zytosol für ein oxidatives Redoxpotential sorgt, welches die intrazelluläre Disulfidverbrückung fördert. Innerhalb der Expressionsstudien im Zytosol von *E. coli* gelang es nicht eine homogene Proteinprobe des Zielproteins zu isolieren. Nach der enzymatischen Abtrennung des Fusionsproteins unterlagen die jeweiligen Hinge-Region-Konstrukte der sofortigen proteolytischen Degradation, was für eine Fehlfaltung und Fehlverknüpfung der potentiellen Strukturelemente spricht.

Die Fehlverknüpfung der Cysteine innerhalb der Cb2 und Cb3 stellt einen limitierenden Faktor für die Strukturausbildung und damit für die Stabilität des Hinge-Region-Fragments dar. Um der Fehlverknüpfung zu begegnen, wurden die Hinge-Region-Konstrukte an *E. coli*-eigene Disulfidisomerasen (*DsbA*, *DsbC*) fusioniert, welche mittels der *peB* Signalsequenz in den periplasmatischen Raum von *E. coli* befördert wurden. *E. coli* besitzt für die homologe Expression disulfidverbrückter Proteine ein Korrektursystem, welches aus den Disulfidisomerasen *DsbA*, *DsbB* und *DsbC* besteht und im oxidativen Redoxmilieu des periplasmatischen Raums lokalisiert ist. Zahlreiche im Zytosol von *E. coli* schwierig zu exprimierende Proteine konnten durch diese Expressionsstrategie erfolgreich produziert und isoliert werden (Choi and Lee, 2004). Das Hinge-Region-Fragment TSHR-ht2 konnte durch diese Strategie als homogenes Fusionsprotein mit korrekter Cysteinverknüpfung dargestellt werden. Die Expressionsmenge beschränkte sich jedoch auch nach Optimierung und *up-scale* auf einen nanomolaren Maßstab. Einerseits zeigt diese Studie, dass die Isolierung eines Hinge-Region-Konstrukts prinzipiell möglich ist, andererseits werden die Voraussetzungen für eine NMR-unterstützte Strukturuntersuchung durch die zu geringe Proteinmenge nicht erfüllt.

*P. pastoris* Expression: Als alternativer Expressionswirt wurde in einer weiteren Studie die methylotrophe Hefe *P. pastoris* gewählt. Als eukaryotischer Expressionswirt verfügt *P. pastoris* über die Funktion der posttranslationalen Modifikation von Proteinen, wie sie auch in höheren eukaryotischen Zellen vorkommt. Dazu gehört neben der O- und N-Glykosylierung, der O-Sulfatierung und Lipidaddition ebenfalls die Verknüpfung von Cysteinen (Cereghino and Cregg, 2000; Daly and Hearn, 2005). Ein weiterer Vorteil des *P. pastoris*-Expressionssystems ist die Möglichkeit der Hochzelldichte-Fermentation, wodurch in einem kleinen Volumen des Nährmediums sehr hohe Zelldichten erreicht werden können. Besonders für sekretierte oder extrazelluläre Proteine ist dies ein bestimmender Faktor, da die Relation von Zellzahl zu freigesetztem Zielprotein nahezu proportional ist. Aufgrund des geringen Nährmediumverbrauchs sowie der gut etablierten molekularbiologischen Protokolle für die Proteinmarkierung ist die heterologe Proteinexpression in *P. pastoris* vor allem auch für die NMR-Probenpräparation interessant (Blanchard and Moulin, 2001; Denton et al., 1998).

Da ebenfalls mehrere GPCR und GPH erfolgreich in *P. pastoris* exprimiert, isoliert und charakterisiert werden konnten (Andre et al., 2006), wurde in einer weiteren Expressionsstudie versucht, die TSHR Hinge-Region auf diesem Weg darzustellen. Um potentielle Strukturelemente zu stabilisieren und flexible Bereiche vor proteolytischer Degradation zu schützen, wurde die TSHR Hinge-Region N-terminal an die strukturautonome LRRD sowie C-terminal an GFP oder an die TMH1 als

Membrananker fusioniert. In keinem Versuch konnte ein stabiles Fusionsprodukt isoliert werden, was darauf schließen lässt, dass die flexiblen Bereiche der Hinge-Region exponiert vorliegen und damit für intrazelluläre Proteasen zugänglich sind. Dies konnte ebenfalls in zellbiologischen Studien gezeigt werden, nach denen das C-Peptid innerhalb der Hinge-Region durch zwei zugängliche Proteaseschnittstellen im TSHR-Reifungsprozess enzymatisch abgespaltet wird (Chazenbalk et al., 1997; Loosfelt et al., 1992; Tanaka et al., 1999b).

Es konnte bisher nicht hinreichend geklärt werden, ob die Ausbildung potentieller Strukturen und die funktionellen Eigenschaften intrinsisch durch intramolekulare Interaktion erfolgen. Die Daten der Expressionsstudien sprechen eher dagegen, dass es sich bei der Hinge-Region um einen strukturautonomen Bereich mit domänenähnlichen Eigenschaften handelt. Da es auf diese Weise nicht gelang ein homogenes und stabiles Hinge-Region-Fragment zu isolieren, welches erst durch die korrekte Cysteinverbrückung innerhalb der Cb2 und Cb3 eine kompakte signalisierungssensitive Konformation annimmt (Kleinau and Krause, 2009), kann die Existenz einer stabilen Struktur der Hinge-Region nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Um die Frage nach den strukturellen Eigenschaften hinreichend zu beantworten, ist es notwendig eine Optimierung der Produktion eines löslichen und homogenen Probenmaterials für weiterführende Untersuchungen mittels NMR-Spektroskopie vorzunehmen und in diesem Zusammenhang eine korrekte Disulfidverbrückung innerhalb des Hinge-Region-Fragments sicherzustellen.

### **6.1.2 Die Konstruktauswahl mittels *ESPRIT*-Systems ermöglicht eine verbesserte Proteinstabilität**

Für viele funktionelle und strukturelle Studien ist die quantitative Produktion einer homogenen Proteinprobe Voraussetzung, um weiterführende Untersuchungen durchführen zu können. Das am häufigsten verwendete Expressionssystem, welches für die rekombinante Proteinproduktion verwendet wird, ist aufgrund der gut etablierten molekularbiologischen Protokolle, der geringen Kosten und der kurzen Produktionsdauer das *E. coli*-Expressionssystem. Pharmakologisch sind jedoch vor allem Zielproteine, welche in höheren eukaryotischen Zellen homolog exprimiert werden, von hohem Interesse. Diese verfügen häufig über posttranslationale Modifikationen wie N- und O-Glykosylierung, Sulfatierung oder wie im Fall der Hinge-Region der GPHR über komplexe kovalente Verbrückungen, welche die heterologe Proteinexpression in prokaryotischen Systemen und die anschließende Präparation erschweren. Schlechte Expressionsraten, geringe Löslichkeit und Stabilität der Proteine durch Fehlfaltung oder fehlende Modifikationen stellen nicht selten eine

unüberwindbare Hürde für weiterführende Untersuchungen dar (Baneyx and Mujacic, 2004) und waren in den durchgeführten Expressionsstudien zur TSHR Hinge-Region trotz extensiver Optimierung nicht zu überbrücken.

Die Fokussierung auf gut strukturierte Bereiche des Zielproteins, Domänen oder Fragmente mit konservierten Motiven ist die Basis des rationalen Designs von Proteinkonstrukten für die heterologe Proteinexpression. Auch im Fall der TSHR Hinge-Region wurden bioinformatische Analyseprogramme zur Strukturvorhersage und Sequenzanalyse eingesetzt, welche Kernstrukturen in Proteinsequenzen effizient auffinden können. Eine Schwäche dieser bioinformatischen Analyseprogramme besteht jedoch in der Definition der Domänengrenzen bzw. Termini der ermittelten Strukturelemente, da die Sequenzhomologien in diesen Regionen oft geringer ausfallen (Dyson et al., 2008). Geringe Veränderungen der Konstruktängen oder der Termini können dadurch einen unvorhersehbaren positiven oder negativen Effekt auf die Proteinexpression, Löslichkeit oder Stabilität des Zielproteins haben. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, wurde eine alternative Strategie zur Konstruktoptimierung entwickelt, dessen Grundlage aus einem HTS, einer Zielfragment-basierenden randomisierten DNA-Konstruktbibliothek besteht. Dazu zählt das „*combinatorial domain hunting (CDH)*“ (Reich et al., 2006), die „*colony filtration (CoFi)*“ (Cornvik et al., 2006) und das „*expression of soluble proteins by random incremental truncation (ESPRIT)*“ (An et al., 2011). In dieser Arbeit wurde das *ESPRIT*-System als Alternative zur bioinformatischen Konstruktauswahl angewandt, welches es ermöglichte optimierte Konstruktorschläge aus einem breiten evolutionären Prozess zu beziehen.

Die DNA-Konstruktbibliothek und ihre Generierung bilden die Grundlage für den zielfragmentbasierenden HTS. Für die Fragmentierung des Templates und die anschließende Subklonierung wurden mehrere molekularbiologische Methoden beschrieben. Während beim *combinatorial domain hunting* die Fragmentgenerierung mittels PCR erfolgt, wird bei der *CoFi* und beim *ESPRIT*-System die Templatefragmentierung durch *ExonucleaseIII*-Behandlung erreicht. Diese Methode ermöglicht es eine genaue Einstellung der Fragmentgrößen und der Bereiche der Template-DNA vorzunehmen und ist somit der PCR-basierten- und der konventionellen *Shotgun*-Subklonierung (Anderson, 1981) überlegen. Eine nicht erwünschte Eigenschaft der Generierung der Zielfragment-basierenden, randomisierten DNA-Konstruktbibliothek ist die Entstehung von nicht-codierenden Fragmenten durch Leserahmenverschiebung relativ zum Start- oder Stopcodon. Die Konsequenz daraus ist eine Abnahme der Screeningeffizienz sowie der Diversität der Konstruktbibliothek. Beschränkt man sich auf einen Kolonie-Screen ohne Leserahmenkontrolle, so resultiert eine unidirektionale, schrittweise Deletion der

Template-DNA in 3-5' Richtung, aufgrund der drei möglichen Leserahmen in einer 1/3 effizienten Konstruktbibliothek. Führt man eine bidirektionale Deletion durch, so liegt die Effizienz nur bei 1/9 (An et al., 2011). Im Fall der TSHR Hinge-Region besteht das Interesse an einem internen Proteinbereich. Die Screeningeffizienz sinkt in diesem Fall, aufgrund der bidirektionalen Deletion und der beiden möglichen Orientierungen des Fragments bei der Subklonierung sogar auf 1/18. Die notwendige Anzahl von Klonen für ein effizientes Screeningergebnis ist so nicht mehr handhabbar. Um die Effizienz des Screens der bidirektionalen TSHR Hinge-Region-Konstruktbibliothek zu erhöhen, wurde im *ESPRIT*-Primärscreen mit einem C- und einem N-terminalen Reporterprotein gearbeitet. Die bestbekanntesten Screens für Proteinlöslichkeit verwenden ein am C-Terminus des Proteinfragments fusioniertes GFP (Yumerefendi et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass die Signalstärke des GFPs in Relation zu den Faltungs- und Löslichkeitseigenschaften seines Fusionspartners steht (Waldo et al., 1999) und somit als Leserahmenkontrolle geeignet ist. Als N-terminales Reporterprotein wird im *ESPRIT*-System das Biotin-Akzeptor-Protein verwendet. Diese doppelte Leserahmenkontrolle führt dazu, dass nur korrekt translatierte und lösliche Proteinkonstrukte für den Primärscreen sichtbar sind und sich damit die Effizienz des Screens erhöht. Die Anzahl der potentiell möglichen Fragmente eines Proteins kann mit der Formel  $(N+1)^2/2$  beschrieben werden, wobei N die Anzahl der Aminosäuren darstellt (Kawasaki and Inagaki, 2001). Um die komplette Diversität der TSHR Hinge-Region-Konstruktbibliothek abzudecken, mussten somit 139.392 Klone im Primärscreen überprüft werden. Praktisch wurden 19,8% der theoretisch zugänglichen TSHR Hinge-Region-Konstruktbibliothek gescreent. Statistisch ist das Ergebnis des Primärscreens nur bedingt repräsentativ, kann jedoch unter evolutionären Aspekten Tendenzen des Phänotyps aufzeigen. Optimierte Konstrukte konnten so auch aus weniger überprüften Konstruktbibliotheken gefunden werden (Guilligay et al., 2008; Reich et al., 2006).

Der Sekundärscreen zur Auswahl eines optimierten TSHR Hinge-Region-Konstrukts erfolgte mittels Expressionsstudie und Sequenzanalyse. Die Sequenz 8ausgewählter Konstrukte wurde miteinander verglichen. Interessanterweise wies der N-Terminus weniger, der C-Terminus mehr Flexibilität im Vergleich zu den Konstrukten der bioinformatischen Auswahl auf. Besonders auffällig ist die Tatsache, dass keines der 8 gefundenen Konstrukte das Cystein Cys408 besitzt, welches für die funktionellen und strukturellen Eigenschaften der Hinge-Region essentiell ist. Es ist somit zu diskutieren, ob es sich bei der Konstruktauswahl durch das *ESPRIT*-System um Fragmente mit einer nativen Konformation der TSHR Hinge-Region handelt und eine funktionelle Struktur erst intrinsisch erfolgt oder ob dies bereits ein Hinweis darauf ist, dass die Hinge-Region als isolierter Bereich der GPHR nicht essentiell ist. Für die

Expression im präparativen Maßstab wurde der aus dem evolutionären *ESPRIT*-Prozess gewonnene Konstruktorschlag *ESPRIT-4* optimiert. Dabei wurde die Aminosäuresequenz „CED“ mit dem essentiellen Cystein während der molekularbiologischen Subklonierung am C-Terminus hinzugefügt, um die doppelte Disulfidverbrückung innerhalb der Hinge-Region zu erreichen. Die heterologe Proteinexpression in *E. coli* erfolgte als His(6x)-SUMO-Fusionsprotein. Das Fusionsprotein konnte stabil isoliert werden, die Abtrennung des Fusionspartners hatte einen erheblichen Verlust des Hinge-Region-Fragments zur Folge, blieb allerdings bis zu einem Konzentrationsbereich von 150  $\mu\text{mol}$  stabil in Lösung und konnte somit einer NMR-unterstützten Strukturuntersuchung unterzogen werden. Das aufgenommene HSQC-Spektrum des isolierten TSHR Hinge-Region-Fragments zeigte überwiegend breite, nicht differenzierbare Signale, was für die strukturelle Inhomogenität der Proteinprobe spricht. Dieses Ergebnis unterstützt das Modell einer strukturell flexiblen Hinge-Region, welche nicht als isolierte strukturautonome Region darstellbar ist. Die Hinge-Region, welche direkt an die LRRD und an die SD grenzt, benötigt für eine aktive Konformation aller Voraussicht nach zusätzliche, stabilisierende intra- oder sogar intermolekulare Kontakte. Dabei bleibt zu diskutieren, ob die Veränderung der strukturellen Konformation sowie die intra- und intermolekularen Interaktionen der Strukturelemente intrinsisch erfolgen. Es bleibt weiterhin unklar, ob die Interaktionen mit der Hinge-Region intramolekularer Natur sind oder ob intermolekulare kooperative Effekte bei der Strukturbildung eine Rolle spielen. Um diese Aspekte zu beleuchten, müssten weiterführende funktionelle Studien durchgeführt und die Erkenntnisse mit den vorliegenden Daten kombiniert werden.

## **6.2 Struktur-Funktions-Studien an der Hinge-Region des LHR liefern neue Erkenntnisse zum Aktivierungsmechanismus der GPHR**

### **6.2.1 Untersuchungen der intra- und intermolekularen Signalisierungseigenschaften des LHR decken unterschiedliche Aktivierungsprofile bei LH- und CG-Stimulation auf**

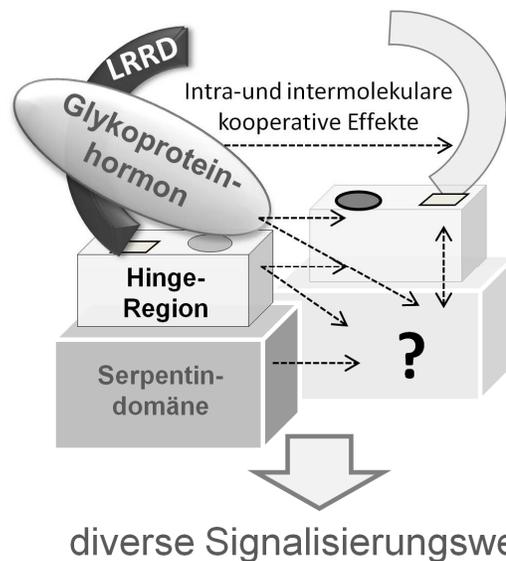
Die Aktivierung der GPHR wird durch ein mehrstufiges Modell beschrieben, in dem eine aktivierte Konformation des Rezeptors durch die Ligandenbindung an der primären Bindungsstelle oder an der allosterischen Bindungsregion stabilisiert wird. Während der primären Bindung des endogenen Liganden (TSH, FSH, LH oder CG) an der LRRD des korrespondierenden Rezeptors erfolgt simultan die Justierung. Die intramolekulare Signaltransduktion wird über mehrere Triggerpunkte des N-terminalen Bereichs der Hinge-Region ausgelöst, welche schließlich zu einer veränderten Konformation der TMHs und zur Freisetzung des G-Proteins führen.

Einen wesentlichen Beitrag zur Initiation der extrazellulären Konformationsänderung stellt das konservierte Serin 281 (TSHR) dar, welches an der Kopplung der drei strukturellen Bereiche der GPHR, nämlich der LRRD, der Hinge-Region und der SD, beteiligt ist (Ho et al., 2001; Jaeschke et al., 2006; Kleinau et al., 2004).

Obwohl die mechanistische Beteiligung der Hinge-Region an der Initiation und Signalweiterleitung als essentiell beschrieben wird, ist der Prozess der strukturellen Ausrichtung sowie die detaillierten, gegenseitigen Wechselwirkungen möglicher innerhalb der Hinge-Region vorhandener Strukturelemente bei der Signalamplifikation und der Stabilisierung der aktiven/inaktiven Konformation für alle drei GPHR unzureichend untersucht. Zwei Gründe sind dafür maßgeblich. Zum einen ist das strukturelle Profil der Hinge-Region bisher nur wenig aufgeklärt. Selbst in der kürzlich publizierten Kristallstruktur des extrazellulären Bereichs des FSHR im Komplex mit dem Hormon FSH sind zwar einzelne Strukturelemente erkennbar (Jiang et al., 2012), dennoch ist ein Teilbereich (Ser295 bis Tyr330) der exponierten Hinge-Region nicht aufgelöst. Eine Interpretation der potentiellen Konformationsänderung lässt der exponierte und weitgehend flexible Bereich der Hinge-Region jedoch nicht zu. Zum anderen lässt sich ein Großteil der funktionellen Daten, welche kooperative Rezeptoreigenschaften aufzeigen und die durch mögliche intermolekulare Interaktionen bestimmt sind, nicht mit einem monomeren Rezeptormodell interpretieren. Für alle drei GPHR ist beschrieben, dass diese bereits im basalen Zustand in einem oligomeren Verbund vorliegen, welcher zunächst durch die Anwesenheit des Liganden nicht beeinflusst wird (Guan et al., 2009, 2010).

Gleichzeitig konnte die funktionelle Oligomerisierung durch den Nachweis intermolekularer Interaktionen bei der Rezeptoraktivierung für die gesamte Gruppe der GPCR gezeigt werden (Ji et al., 2002; Rivero-Muller et al., 2010; Urizar et al., 2005).

Bisher ist jedoch nicht bekannt, wie die genauen strukturellen Zusammenhänge bei einer intermolekularen Interaktion aussehen und mit welchem Modell diese ausführlich beschrieben werden können. Denkbar wäre ein Zwei-Hormon-Ein-Rezeptor-Modell, wie es im Fall des FSHR diskutiert wird (Kleinau and Krause, 2009). Ausgehend von den funktionellen Daten für den TSHR und den LHR ist ein Zwei-Rezeptor-Ein-Hormon-Modell wahrscheinlicher und wäre eher in Einklang mit der Beobachtung eines negativen kooperativen Effekts beim TSHR (Urizar et al., 2005) zu bringen. Nicht auszuschließen ist auch ein Zwei-Hormon-Zwei-Rezeptoren-Modell, bei dem es zu intermolekularen Kontakten, wahlweise über den endogenen Liganden oder über exponierte Rezeptorregionen zum Beispiel innerhalb der Hinge-Region, kommt (siehe Abb.20).



**Abb.20: Intermolekulare kooperative Effekte bei der GPCR-Signalisierung**

Die Bindung des endogenen Liganden erfolgt an der extrazellulären LRRD sowie an bestimmte Bindungsmotive der Hinge-Region. Die Signalinitiation und -amplifikation erfolgt durch strukturelle Konformationsänderungen der Hinge-Region und der SD in einem oligomeren Rezeptorverbund. Die Interaktionspunkte, welche zu einer Oligomerisierung führen, sind innerhalb der SD lokalisiert. Eine Modulation dieses Prozesses wird von der Hinge-Region vermutet. Ein detaillierter Mechanismus der intra- und intermolekularen Rezeptoraktivierung sowie der genutzten Interaktionspunkte zwischen beiden Protomeren konnte bisher noch nicht benannt werden. Unklar ist, auf welchem Weg die Signalamplifikation auf das benachbarte Protomer übertragen wird, welche intra- und intermolekularen kooperativen Zusammenhänge maßgeblich für diesen Prozess sind und welche Bedingungen für die weitere differenzierte Aktivierung potentieller Signalwege vorliegen müssen.

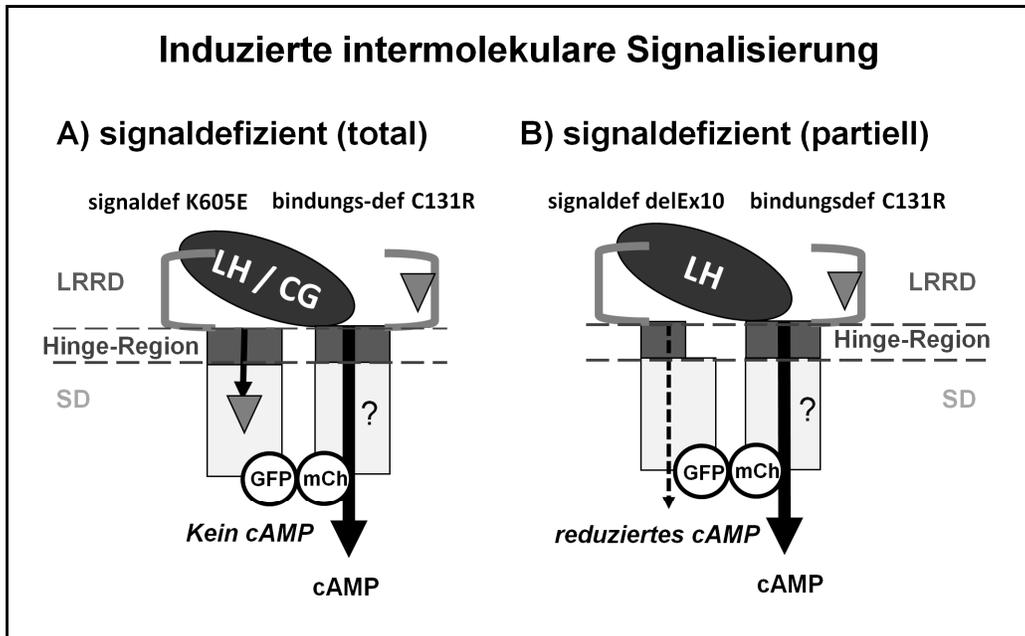
Ebenfalls unbeantwortet ist die Frage, ob es sich bei der intermolekularen Rezeptoraktivierung um einen obligatorischen Aktivierungsmechanismus handelt oder dieser gleichwertig neben der intramolekularen Rezeptoraktivierung existiert oder sogar nur als Bypass bei inhibierter intramolekularer Aktivierung genutzt wird (siehe Abb.20). Näher zu beleuchten ist in diesem Zusammenhang auch die Rolle der endogenen Liganden, die sich jeweils nur in der  $\beta$ -Untereinheit unterscheiden (Costagliola et al., 2005; Stockell Hartree and Renwick, 1992). Es ist anzunehmen, dass sich die Interaktionen der  $\beta$ -Untereinheit der GPH mit den jeweiligen exponierten Bereichen der Hinge-Region geringfügig voneinander unterscheiden und somit unterschiedliche intra- oder intermolekulare Aktivierungsprofile aufweisen können. Auf der Seite des Rezeptors könnte der Bereich um das konservierte Tyrosin Tyr333 (LHR) innerhalb der Hinge-Region einen entscheidenden Einfluss haben, da die Justierung der GPH an die LRRD maßgeblich über diesen Triggerpunkt erfolgt (Bruysters et al., 2008; Jiang et al., 2012).

Um die Mechanismen der Rezeptoraktivierung und der dabei auftretenden intra- und intermolekularen Interaktionen genauer zu beleuchten, wurden in der vorliegenden Arbeit funktionelle Studien am LHR durchgeführt. Der LHR besitzt unter den GPHR eine Besonderheit. Im Vergleich zu den anderen GPHR wird der LHR entsprechend physiologischer Bedingungen von zwei endogenen Liganden aktiviert. Das LH spielt sowohl beim Mann als auch bei der Frau, bei der gonadalen Entwicklung und bei der Reproduktion eine essentielle Rolle, indem es zum einen die Testosteronproduktion und die Spermatogenese und zum anderen die Progesteronausschüttung reguliert und die Ovulation einleitet. Die Aktivierung des LHR durch das CG erfolgt nur während der Schwangerschaft und ist an der Aufrechterhaltung eines erhöhten Progesteronspiegels für den Erhalt der Schwangerschaft beteiligt. Dieses Zwei-Hormon-Ein-Rezeptor-System eignet sich besonders gut um die intra- und intermolekularen Prozesse während der Rezeptoraktivierung zu studieren, da die auftretenden Mechanismen sowohl auf der Seite der GPHs, als auch auf der Seite des Rezeptors und im Besonderen der Hinge-Region beleuchtet werden können. Da beide Hormone unterschiedliche Signalwege anstoßen, ist in diesem Zusammenhang die Aufklärung der molekularen Determinanten, die zu dieser unterschiedlichen Signalamplifikation führen, von besonderem Interesse. Kürzlich wurde beschrieben, dass das CG fünf-fach potenter bei der Rezeptoraktivierung wirkt und hauptsächlich den PKA-Signalweg anstößt, während das LH eine verbesserte Kinetik bei der Signaltransduktion aufweist und hauptsächlich die ERK1/2- und die AKT-Signalkaskade auslöst (Casarini et al., 2012). Die Ursache für diese differenzierte Funktionalität ist auf molekularer Ebene weitgehend ungeklärt. Spekuliert wird über eine unterschiedliche intra- bzw. intermolekulare Interaktion der

GPH- $\beta$ -Untereinheit mit Motiven innerhalb der Hinge-Region. Dies bedarf jedoch weiterführender Untersuchungen.

Der Startpunkt für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der intra- und intermolekularen Rezeptoraktivierung, war eine klinische Fallstudie eines an einer Leydigzellen Hypoplasie Typ II leidenden männlichen Patienten aus dem Jahr 2000 (Gromoll et al., 2000). Die Ursache für die Erkrankung war eine genetische Manipulation innerhalb des LHR, bei dem das gesamte Exon10 des LHR-Gens deletiert war. Das Exon10 codiert einen 27 Aminosäuren langen Bereich innerhalb der Hinge-Region. Auf translatorischer Ebene resultiert diese Deletion in einer Verkürzung der Hinge-Region und somit in einer Deplatzierung potentieller signalsensitiver Motive in diesem Bereich. Interessanterweise ist bei dieser LHR-Variante, trotz eines uneingeschränkten Hormonbindungsverhaltens beider Hormone an der extrazellulären LRRD, die LH- jedoch nicht die CG-induzierte Rezeptorfunktion reduziert (Gromoll et al., 2000, 2004; Muller et al., 2004). Das LH und das CG unterscheiden sich auf molekularer Ebene lediglich in der Sequenz der  $\beta$ -Untereinheit. Ferner besitzt das CG im Unterschied zum LH einen verlängerten C-Terminus, das sogenannte *carboxy-terminal peptide* (CTP), welches möglicherweise eine Rolle im Aktivierungsprozess einnimmt und für einen veränderten Aktionspunkt innerhalb des LHR sorgt (Muller et al., 2004). Im Vergleich zum LH ist das CG in der Lage, die Deletion des signalisierungssensitiven Exon10-Bereichs zu kompensieren. Dabei wird spekuliert, dass das CTP des CG einen wesentlichen Einfluss auf die Rettung der Funktionalität der LHR-delExon10-Mutante hat (Muller et al., 2004). Ein detaillierter Mechanismus des Aktivierungsprozesses sowie der Rettung der signalisierungsdefizienten LHR-delExon10-Mutante konnte mit den vorhandenen Daten bisher jedoch nicht formuliert werden. Ebenso ist der genaue molekulare Prozess, der zu der Fehlfunktion dieser Rezeptorvariante führt, ungeklärt. Um diesen Aspekt zu beleuchten, war es notwendig das LHR-delExon10-Konstrukt in die Studien zur intra- und intermolekularen Rezeptoraktivierung einzubeziehen und die molekularen Determinanten der GPH-Interaktion mit der Hinge-Region aufzudecken.

Die Studien zur intra- und intermolekularen Rezeptoraktivierung erfolgten nach einer bereits beschriebenen Strategie, bei der *in vitro* eine signalisierungsdefiziente Mutante mit einem hormonbindungsdefizienten Konstrukt kombiniert und nach erfolgter Stimulation mit einem endogenen Liganden die Funktion der partiell defizienten Signalisierungseinheit überprüft wird (Ji et al., 2002).



**Abb.21: Experimenteller Aufbau zur Analyse der intermolekularen Kooperativität (Trans-Aktivierung) beim LHR**

Zur Induktion und anschließenden Analyse der intermolekularen Rezeptoraktivierung (Trans-Aktivierung) wurde in einem in-vitro-Experiment eine signalisierungsdefiziente Mutante mit einer hormonbindungsdefizienten Mutante kombiniert und die Signalisierungseigenschaft nach Stimulation mit den Hormonen LH oder CG mittels eines cAMP-Assays ausgewertet. Zur Analyse der Rezeptorlokalisierung wurden die verwendeten Konstrukte mit GFP bzw. mCherry fusioniert. **(A)** Kombination der total signalisierungsdefizienten (Mutation Lys605Glu (Triangel)) mit der hormonbindungsdefizienten (Mutation Cys131Arg (Raute)) LHR-Mutante. **(B)** Kombination der partiell signalisierungsdefizienten (Deletion von Exon10 bewirkt nur eine Reduktion der LH induzierten Signalisierung) mit der hormonbindungsdefizienten (Mutation Cys131Arg (Raute)) LHR-Mutante. Zur Untersuchung der Kolokalisation mittels LSM wurden alle Konstrukte mit GFP oder mCherry fusioniert.

In diesem Zusammenhang konnte eine funktionelle Rettung der partiell defizienten Signalisierungseinheit durch eine CG-induzierte intermolekulare Rezeptoraktivierung (Trans-Aktivierung) für den rLHR nachgewiesen werden (Ji et al., 2002; Rivero-Muller et al., 2010).

Um einerseits die molekularen Unterschiede der beiden GPH in der Rezeptoraktivierung zu untersuchen und andererseits den Einfluss des Exon10-Bereichs auf potentielle Interaktionen und auf die Funktionalität des LHR zu studieren, wurde das signalisierungsdefiziente LHR-delExon10-Konstrukt mit dem hormonbindungsdefizienten Konstrukt LHR-C131R koexprimiert und die intermolekularen Signalisierungseigenschaften nach LH- und CG-Stimulation überprüft (siehe Abb.21). Die Eingangshypothese sah einen Verlust der LH-

induzierten LHR-Funktion durch die reduzierte Fähigkeit zur intermolekularen Aktivierung, aufgrund des Exon10-Verlustes innerhalb der Hinge-Region vor.

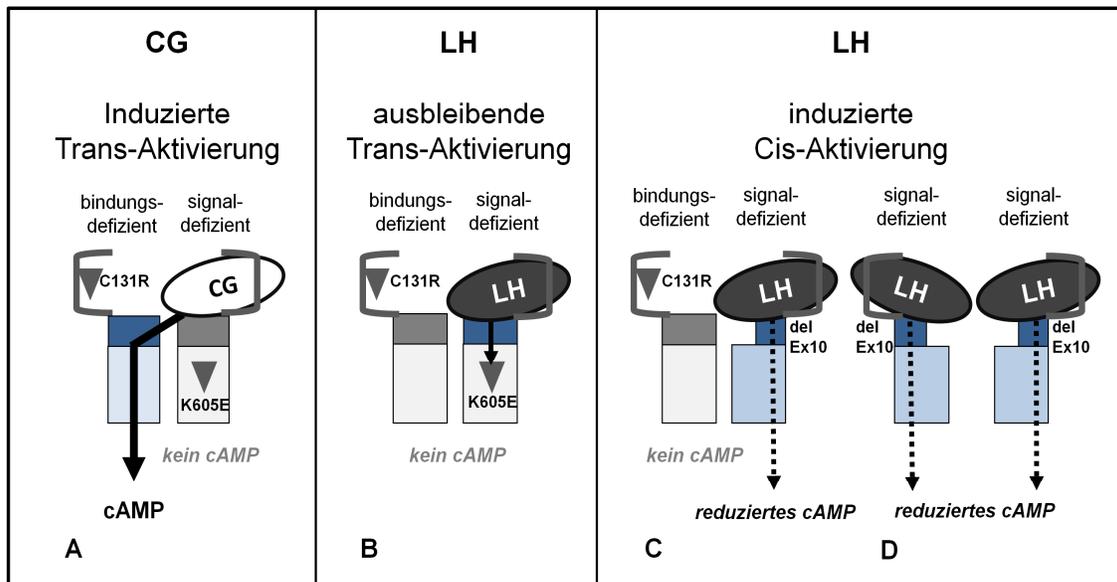
Einerseits würde dies bedeuten, dass die intermolekulare Rezeptoraktivierung einen obligatorischen Mechanismus zur gonadotropen Signalisierung darstellt, andererseits muss ein wesentlicher Unterschied in der molekularen Wechselwirkung beider Hormone mit der Hinge-Region existieren, der mit Hilfe weiterführender funktioneller und struktureller Untersuchungen ausgemacht werden könnte.

Die Auswertung der funktionellen Daten aus den durchgeführten Experimenten zur intermolekularen Rezeptoraktivierung, ergaben bei Verwendung des LHR-delExon10-Konstrukts keinen Hinweis auf eine mögliche Rettung der partiell defizienten Signalisierungseinheit bei Stimulation mit LH. Im Vergleich dazu blieb die CG-induzierte Funktionalität, wie auch in anderen Studien beobachtet (Gromoll et al., 2000), bestehen, was auf eine intakte intermolekulare Rezeptoraktivierung schließen lässt. Die Ursache für die fehlende intermolekulare Rezeptoraktivierung wurde zunächst in einer Störung der Oligomerisierung durch die Deletion des Exon10 Bereiches vermutet. Die Oligomerisierung zu einem funktionellen Rezeptorverbund stellt eine wesentliche Voraussetzung für eine intermolekulare Rezeptoraktivierung dar. Für alle GPHR-Subtypen konnte eine Oligomerisierung nachgewiesen werden (Guan et al., 2009, 2010; Urizar et al., 2005). Für den LHR konnte im Speziellen eine Stabilisierung des oligomeren Zustands durch das GPH CG festgestellt werden (Tao et al., 2004). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass inaktive LHR innerhalb des LHR-Verbunds einen negativen Effekt auf die LHR-Wildtyp-Signalisierung ausüben (Tao et al., 2004). Die funktionelle Rettung der partiell defizienten LHR-Signalisierungseinheit impliziert somit indirekt eine Rezeptoroligomerisierung im basalen Zustand. Bisher werden Kontaktpunkte zwischen den Protomeren in der SD vermutet. Es wird jedoch spekuliert, dass zusätzliche extrazelluläre Motive die oligomeren Interaktionen initiieren bzw. modulieren (Costagliola et al., 2005; Zoenen et al., 2012).

Die in dieser Arbeit mittels FCCS durchgeführten Oligomerisierungsstudien am LHR-delExon10-Konstrukt zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Oligomerbildung zum LHR-Wildtyp, was eine Beteiligung des extrazellulären Exon10-Bereichs an der Modulation der LHR-Oligomerisierung ausschließt. Darüber hinaus kann eine Störung der Rezeptoroligomerisierung als Ursache für die reduzierte Rezeptorfunktion bei LH-induzierter Stimulation ausgeschlossen werden.

Um die molekularen Determinanten der reduzierten LH-Signalisierung innerhalb der Hinge-Region näher zu beleuchten, wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem ein signalisierungsdefizientes Konstrukt verwendet wurde, welches über eine nicht

manipulierte Hinge-Region verfügt. Die Blockierung zur aktiven Konformationsänderung wurde durch die Einführung der Mutation Lys605Glu in der TMH 7 erreicht. Die Daten der Stimulation dieser partiell defizienten Signalisierungseinheit ergaben starke Hinweise auf eine partielle Rettung bei CG Stimulation. Gleichzeitig konnte die intermolekulare Rezeptoraktivierung durch das LH ausgeschlossen werden. Momentan wird der Prozess der intermolekularen Rezeptoraktivierung am LHR kontrovers diskutiert (Zhang et al., 2012). Zum einen konnte eine funktionelle Rettung von partiell inaktiven rLHR *in vivo* gezeigt werden (Rivero-Muller et al., 2010), zum anderen gelang es nicht in den durchgeführten *in-vitro*-Studien artifizielle Effekte aufgrund von nicht konstanten Expressionsraten auszuschließen. Diese könnten zu einer falsch-positiven Interpretation einer intermolekularen Signalisierung führen (Zhang et al., 2012). Für die Interpretation des gemessenen Effekts, welcher durch die intermolekulare Rezeptoraktivierung zustande kommt, ist eine stochastische Betrachtung der Expressionsrate der verwendeten Konstrukte essentiell. Beschränkt man sich bei dieser Betrachtung auf die kleinste mögliche Signalisierungseinheit, bestehend aus zwei partiell defizienten Protomeren, so ist der größte Effekt bei einer gleichverteilten Expression beider Protomere zu erwarten (50% der maximalen Signalisierung). Entsteht ein Ungleichgewicht im Verhältnis 2:1 so sinkt das zu beobachtende Signal auf 44% der maximalen Signalisierung. Bei einem Protomer-Verhältnis von 10:1 beträgt der zu erwartende Effekt nur noch 16% der maximalen Signalisierung und ist im vorliegenden experimentellen Aufbau nicht mehr als signifikant zu werten. Der Nachweis einer intermolekularen Rezeptoraktivierung korreliert somit mit der Expressionsrate beider transfizierter Konstrukte und ist bei einem ungünstigen Verhältnis nicht zu beobachten. Im Unterschied zu anderen veröffentlichten Daten gelang es jedoch nicht, in den durchgeführten Experimenten die Expressionsrate beider Protomere durch eine Titration der DNA-Mengen während der transienten Transfektion der Zellen zu regulieren (Zhang et al., 2012). Um den oben genannten Aspekt in die Betrachtungen einzubeziehen, wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals eine experimentelle Strategie entwickelt, die es erlaubt, die funktionellen Daten aus der Rezeptorstimulation mit der relativen Rezeptor-Oberflächenexpression zu korrelieren. Dabei wird in einem experimentellen Ansatz parallel neben der Signalisierung, die relative Rezeptorexpression ermittelt, wodurch es gelingt, den direkten Zusammenhang zwischen der Rezeptorfunktion und der Rezeptorexpression innerhalb eines experimentellen Ansatzes zu formulieren (siehe Ergebnisse 5.2.3.3). Der auftretende Effekt einer intermolekularen Rezeptoraktivierung kann somit unabhängig von der Expressionsrate betrachtet werden.



**Abb.22: LHR-Aktivierungsprofile hinsichtlich LH-und CG-Stimulation**

Zusammengefasst sind die Erkenntnisse aus den experimentellen Daten der Studie zur intra- und intermolekularen Rezeptoraktivierung beim LHR. Die dabei koexprimierten Kombinationen partiell defizienter Konstrukte (hormonbindungsdefizient C131R; total signalisierungsdefizient K605E und partiell signalisierungsdefizient delExon10) wurden auf die Fähigkeit der intermolekularen Aktivierung (Trans-Aktivierung) überprüft. Die eingeführte Mutation zur Generierung des partiellen Funktionsdefekts ist als Triangel dargestellt. **A)** CG-induzierte Trans-Aktivierung über das benachbarte partiell defiziente Protomer. **B)** Ausbleibende Trans-Aktivierung bei LH-Stimulation. **C)** Ausbleibende Trans-Aktivierung nach LH-Stimulation, bei Verwendung des LHR-delExon10 Konstrukts. **D)** Eingeschränkte LH-induzierte intramolekulare Aktivierung (Cis-Aktivierung) bei Verwendung des LHR-delExon10-Konstrukts.

In dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Hormone LH und CG ein unterschiedliches Aktivierungsprofil besitzen. Während die LH-induzierte Signalisierung nur über eine intramolekulare Rezeptoraktivierung erfolgt, gelingt die Rezeptoraktivierung mittels CG intermolekular (siehe Abb.22). Da die CG-induzierte Funktion der LHR-delExon10-Mutante im Vergleich zur Stimulation mit LH nicht eingeschränkt ist, ist anzunehmen, dass beide GPH unterschiedliche Interaktionspunkte zur Signalinitiation am LHR nutzen. Die natürliche Interaktion zwischen dem LH und dem LHR-delExon10 ist in einem intramolekularen Aktivierungsprozess aufgrund der Exon10-Deletion teilweise gestört. Der Exon10-Bereich innerhalb der Hinge-Region steht somit in direkter Relation zur LH-induzierten intramolekularen Signalisierung, während die Interaktionspunkte für die intermolekulare Aktivierung durch das CG noch ermittelt werden müssen.

Für die Gruppe der GPHR hat diese Erkenntnis folgende Konsequenzen: Die GPHs TSH und FSH besitzen, wie auch das LH, beide in der  $\beta$ -Untereinheit ein verkürztes CTP. Dennoch konnte im Vergleich zum LH sowohl für das TSH als auch für das FSH eine intermolekulare Rezeptoraktivierung beobachtet werden (Ji et al., 2004; Urizar et al., 2005). Dies lässt vermuten, dass die intermolekulare Aktivierung nicht ausschließlich vom CTP der  $\beta$ -Untereinheiten abhängig ist oder dass die Interaktionspunkte der CTPs an den jeweiligen Rezeptoren sich unterscheiden müssen. Zwischen LH und CG konnten, neben dem Unterschied am C-Terminus der  $\beta$ -Untereinheit, zusätzliche Unterschiede bei der Interaktion mit der primären Bindungsregion ausgemacht werden, welche mit einer veränderten Affinität und Spezifität einhergehen (Galet and Ascoli, 2005). Auf der Seite der GPHR ist zu beachten, dass sich der LHR funktionell vom TSHR und vom FSHR unterscheidet. Während Deletionen im C-terminalen Bereich der TSHR und FSHR Hinge-Region zu einer konstitutiven Aktivierung der Rezeptoren führen (Mizutori et al., 2008; Vlaeminck-Guillem et al., 2002; Zhang et al., 1995), konnte beim LHR keine Deletion innerhalb der Hinge-Region gefunden werden, welche eine Erhöhung der Basalaktivität zur Folge hat (Nurwakagari et al., 2007; Sangkuhl et al., 2002).

Bislang konnte nicht geklärt werden, wie der detaillierte Mechanismus für die intermolekulare Rezeptoraktivierung lautet. Eine Interaktion des GPHs mit dem benachbarten Protomer wird diskutiert (Jeoung et al., 2007; Rivero-Muller et al., 2010). Zusätzlich scheint die Signalamplifikation über intermolekulare Kontakte der SD zu erfolgen (Osuga et al., 1997). Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen ein komplexes Signalisierungssystem für den LHR auf. Die LH-induzierte intramolekulare Rezeptoraktivierung spielt ebenso eine Rolle, wie die bereits beschriebene CG-vermittelte intermolekulare Aktivierung.

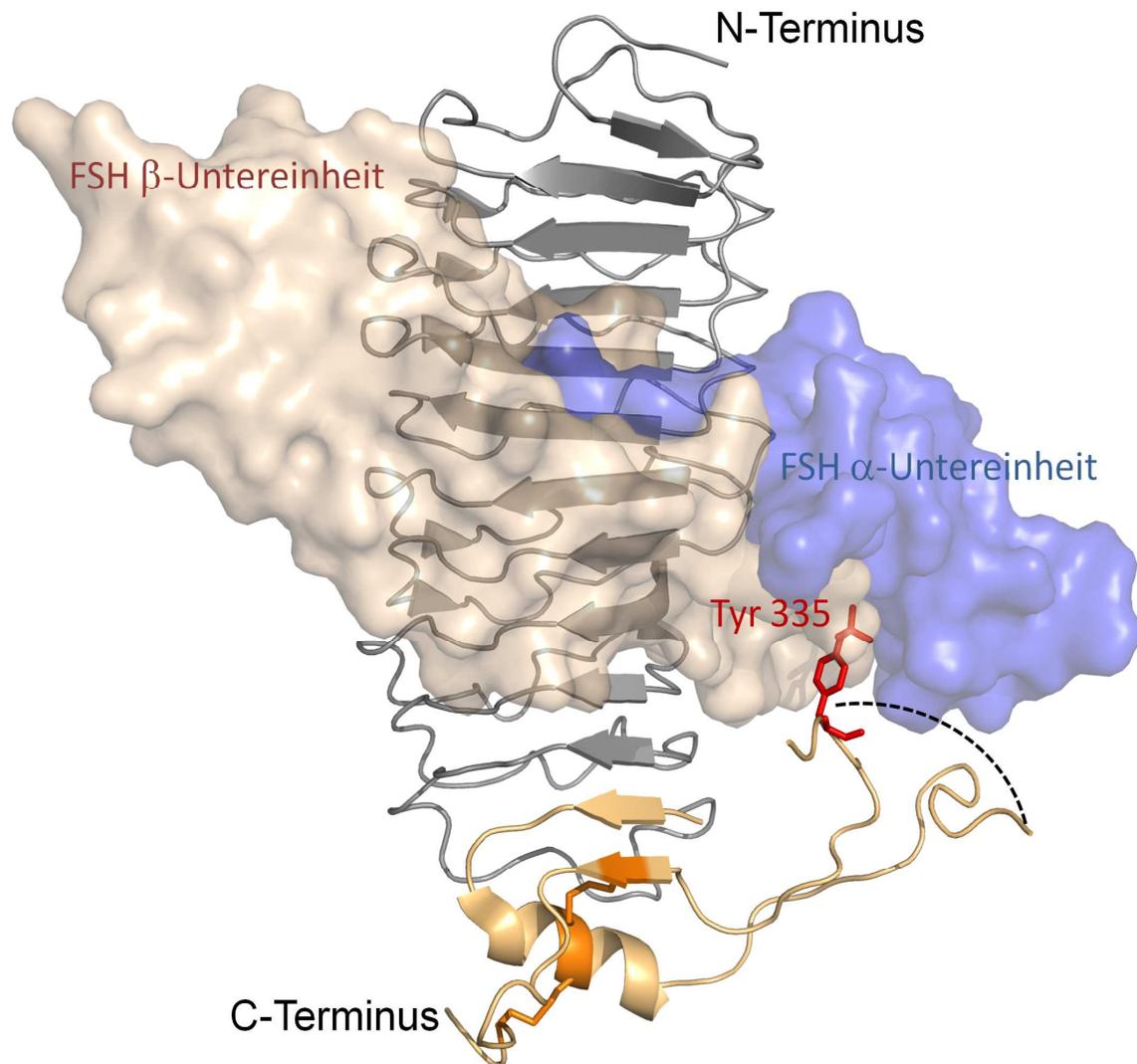
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Deletion des Exon10-Bereichs innerhalb der LHR-Hinge-Region keinen Einfluss auf die Rezeptoroligomerisierung hat. Funktionell beeinflusst sie zwar nicht die CG-induzierte intermolekulare Rezeptoraktivierung, die Rezeptorsignalisierung bei LH-Stimulation ist jedoch eingeschränkt. Eine Störung der intermolekularen Rezeptoraktivierung bei LH-Stimulation kann ausgeschlossen werden, da auch bei LHR-Konstrukten mit intakter Hinge-Region nur eine intramolekulare Rezeptoraktivierung nachgewiesen werden konnte. Für die LH-Stimulation scheint die intramolekulare Rezeptoraktivierung bevorzugt zu sein, während CG in der Lage ist, die LHR-Aktivierung intermolekular auszulösen. Es ist zu diskutieren, ob diese Beobachtung im Zusammenhang mit der Aktivierung und Regulation der unterschiedlichen Signalwege durch beide GPHs steht. Während das CG hauptsächlich den PKA-Signalweg anstößt, löst das LH hauptsächlich die ERK1/2- und AKT-Signalkaskade aus (Casarini et al., 2012).

Diese differenzierten mechanistischen Eigenschaften der LHR-Aktivierung könnten somit in einer engen Relation zur Regulation physiologischer Parameter stehen.

### **6.2.2 Strukturelemente im signalisierungssensitiven Exon10-Bereich fungieren als strukturelle Plattform für die CG-vermittelte Signalamplifikation**

Der LHR nimmt unter den GPHR eine besondere Rolle ein. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die beiden gonadotropen Effektoren LH und CG bei der Interaktion mit dem LHR unterschiedliche Aktivierungsprofile besitzen, deren physiologische Relevanz in weiterführenden Studien zu diskutieren ist. Während der bevorzugte Weg der Rezeptoraktivierung bei LH-Induktion ausschließlich intramolekularer Natur ist, erfolgt die CG-induzierte Signalisierung vor allem intermolekular. Unklar ist dabei, welche molekularen Bedingungen für die jeweiligen Aktivierungsprofile erfüllt sein müssen und welche Interaktionspunkte seitens des endogenen Liganden und des Rezeptors bei der intra- und der intermolekularen Rezeptoraktivierung genutzt werden. In der hier durchgeführten Studie zur intermolekularen Kooperativität des LHR konnte ein Einfluss des signalisierungssensitiven Exon10-Bereichs innerhalb der LHR-Hinge-Region auf den jeweiligen Aktivierungsmechanismus nachgewiesen werden (siehe Ergebnisse 5.2.4.2). Um einen detaillierten Einblick in den mechanistischen Ablauf der intra- und intermolekularen Rezeptoraktivierung zu erhalten und damit ein Modell zur Interaktion potentieller Strukturelemente zu formulieren, wurde weiterführend die strukturelle Topologie der bekannten signalisierungssensitiven Bereiche erfasst. Als Vorlage für die strukturelle Analyse diente die kürzlich veröffentlichte Kristallstruktur der FSHR-Ektodomäne im Komplex mit dem FSH.

In der vorliegenden Kristallstruktur konnten einige strukturelle Elemente identifiziert werden, darunter ein  $\alpha$ -helikaler Bereich am N-Terminus der Cb2 und eine  $\beta$ -Faltblattstruktur am C-Terminus der Cb3, welche maßgeblich an der Strukturgebung der Hinge-Region beteiligt sind (siehe Abb.23). Dieser Bereich umfasst die signalisierungssensitive Region um das konservierte Serin Ser273 (FSHR) und bestätigt die diskutierte strukturelle Relevanz dieser Mikrodomäne bei der Signaltransduktion (Kleinau and Krause, 2009). Aus der Kristallstruktur geht weiter hervor, dass der helikale Bereich nicht exponiert vorliegt und sich somit nicht im direkten Einflussbereich des Liganden FSH befindet (Jiang et al., 2012). Eine direkte Interaktion dieses Strukturelements mit dem gebundenen Liganden ist in einem monomeren Modell somit unwahrscheinlich. Eine funktionelle Beteiligung an der



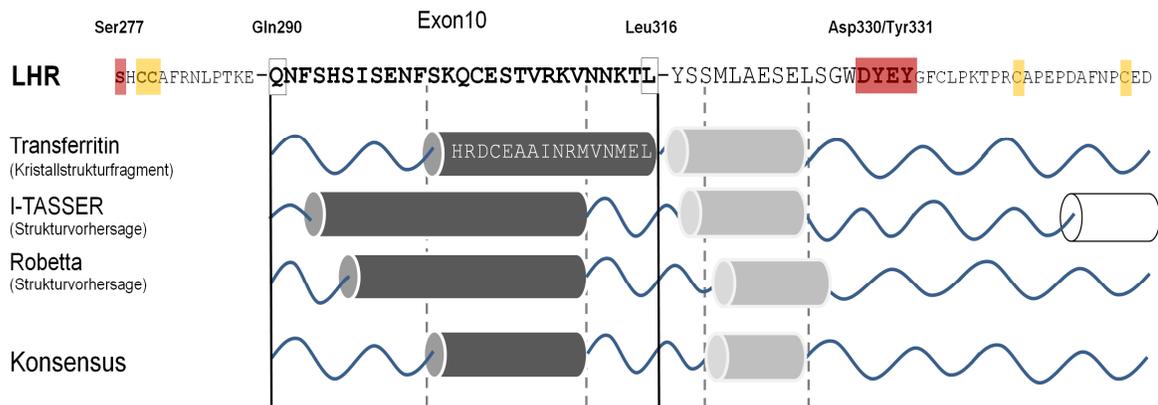
**Abb.23: Kristallstruktur der FSHR-Ektodomäne im Komplex mit dem FSH**

Abgebildet ist die Kristallstruktur der FSHR-Ektodomäne, dargestellt als Komplex mit dem Gonadotropin FSH (Jiang et al., 2012). Die LRRD (grau) interagiert mit beiden Untereinheiten des FSH. Für die Justierung des FSH an die korrekte Position der LRRD ist das sulfatierte Tyrosin Tyr335 (rot) essentiell. Maßgeblich beteiligt an der Signalinitiation und -amplifikation ist die Mikrodomäne der Hinge-Region (pastell), welche aus einer Helix und einer Faltblattstruktur besteht und sich am C-Terminus des extrazellulären Bereiches befindet. Die strukturelle Integrität wird durch zwei Cysteinverbrückungen (gold) gewährleistet. Der exponierte Bereich der Hinge-Region weist in der veröffentlichten Kristallstruktur keine strukturellen Elemente auf. Eine flexible loop-region (Ser295-Tyr330) ist in der Kristallstruktur nicht aufgelöst und wird in dieser Abbildung nur angedeutet (schwarz). Eine potentielle Strukturausbildung während der Konformationsänderung zwischen aktiver/inaktiver Form könnte jedoch intrinsisch erfolgen.

Konformationsänderung wäre nur indirekt oder über eine intermolekulare Interaktion mit dem FSH oder FSH-vermittelt denkbar (siehe Abb.23). In der veröffentlichten Kristallstruktur besteht das Arrangement innerhalb der Kristallpackung aus drei Protomeren, welches zusätzlich die Schlussfolgerung einer intermolekularen Beteiligung in der Signalisierung zulässt. Die physiologische Relevanz eines FSHR-Trimers wird von den Autoren diskutiert (Zhang et al., 2012). Dagegen sprechen allerdings 3D-Homologiemodelle der SD, welche eine Trimer-Bildung nicht favorisieren (Fanelli, 2007). Im funktionellen Zentrum der FSHR-Protomere steht ein flexibler Bereich um das konservierte Tyrosin Tyr335 (FSHR), welches in funktionellen Studien analog für alle drei GPCR für die volle Rezeptorfunktionalität als essentiell nachgewiesen wurde (Bruysters et al., 2008; Costagliola et al., 2002). Weiter lässt die Kristallstruktur der FSHR-Ektodomäne eine Interaktion des sulfatierten Tyr335 mit einer Kernregion des FSH erkennen, welches zur Arretierung des Liganden an der LRRD führt (siehe Abb.23). In diesem Zusammenhang wird ein monomerer Aktivierungsmechanismus des FSHR diskutiert, bei dem die Arretierung des Liganden durch das Tyr335 zu einer Konformationsänderung des flexiblen Hinge-Region-Bereiches in Richtung LRRD führt und durch die Veränderung der Position; der in der Hinge-Region lokalisierten Mikrodomäne; die Signalamplifikation stattfindet (Jiang et al., 2012). Eine mechanistische Relevanz des sulfatierten Tyrosins geht auch aus funktionellen Studien des LHR hervor, bei dem der Bereich um das Tyrosin Tyr335 als signalisierungssensitiv und das sulfatierte Tyr331 als Triggerpunkt bei der Justierung des endogenen Liganden LH erkannt wurde. Über eine strukturelle und mechanistische Relation zum Exon10-Bereich wird in diesem Zusammenhang spekuliert (Bruysters et al., 2008). Interessanterweise zeigen die erhobenen Daten unterschiedliche funktionelle Abhängigkeiten zwischen LH und CG und dem signalisierungssensitiven Tyr331-Bereiches auf. Während die LH-induzierte Funktionalität bei einem Tyr331Ala bzw. Asp330Ala substituierten Konstrukt um einen Faktor ~75 bzw. ~20 reduziert ist, ist die CG-induzierte Signalisierung deutlich weniger (10-fach) beeinflusst (Bruysters et al., 2008).

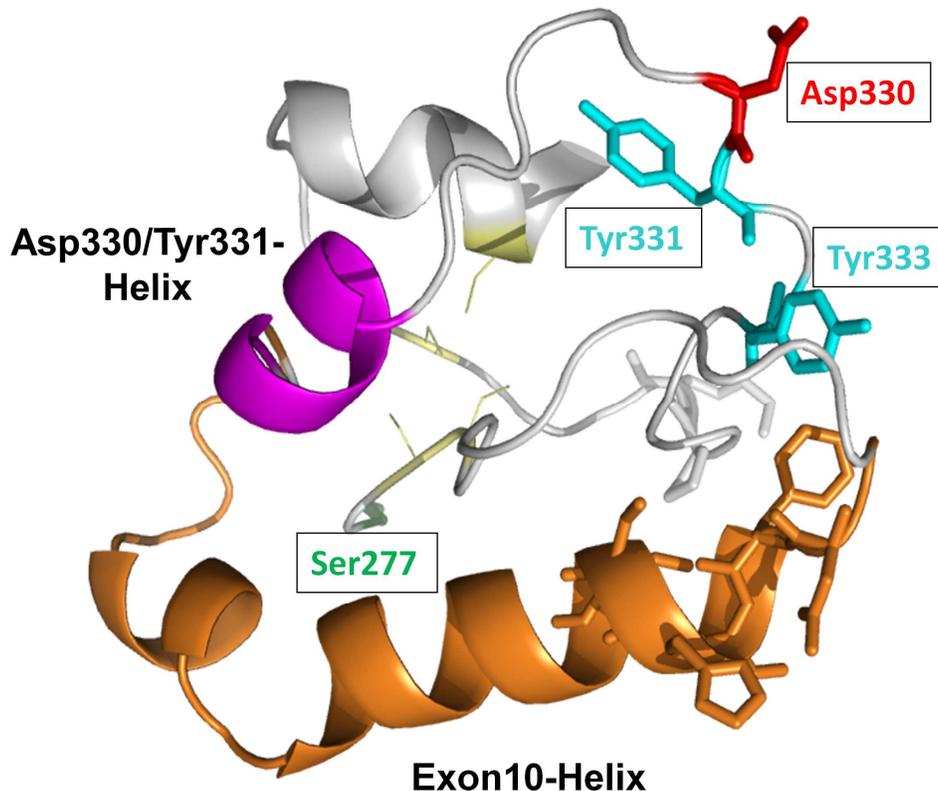
Kombiniert mit den in der vorliegenden Arbeit erhobenen, funktionellen Daten lässt sich schlussfolgern, dass beide Gonadotropine unterschiedliche Orientierungen einnehmen und damit unterschiedliche Interaktionspunkte bei der LHR-Aktivierung nutzen müssen. Während für das LH die räumliche Position des Asp330/Tyr331-Motivs, welches für die Justierung des endogenen Liganden, während einer intramolekularen Rezeptoraktivierung essentiell ist, interagiert das CG mit anderen potentiellen Strukturelementen der Hinge-Region in einem intermolekularen Prozess. Das Asp330/Tyr331-Motiv hat dabei einen geringeren Einfluss auf die korrekte Positionierung des CG zur Signalinitiation.

Um diesen strukturellen und mechanistischen Unterschied zwischen den beiden Hormonen LH und CG im Zusammenhang mit möglichen strukturellen Elementen der Hinge-Region zu analysieren, wurden in einem weiteren Schritt die beiden signalisierungssensitiven Bereiche, die Exon10-Region sowie der Bereich um das signalisierungssensitive Tyrosin Tyr331, einer bioinformatischen Analyse zur Auffindung potentiell strukturierter Bereiche mittels Sequenzanalyse und Sekundärstrukturvorhersage unterzogen. Anschließend wurden auf Basis der Strukturvorhersagen 3D-Homologiemodelle für die Exon10-Region angefertigt und mit dessen Hilfe funktionelle Studien aufgesetzt. Als Template diente das Transferritin, welches mit einer Sequenzhomologie von ~30% auch helikale Elemente in der Kristallstruktur aufweist. Für die Berechnung der 3D-Homologiemodelle wurden die beiden Server I-TASSER und Robetta gewählt. Diese zeigten im Vergleich die besten Resultate für die Faltungs- und Tertiärstrukturvorhersage für Proteine oder Domänen mittlerer Größe (Battey et al., 2007).



**Abb.24: Strukturalignment der signalisierungssensitiven Bereiche der LHR-Hinge-Region**

Das Strukturalignment zeigt die in den jeweiligen Modellen (I-TASSER und Robetta) gefundenen Strukturelemente, welche sich zwischen den beiden signalisierungssensitiven Bereichen (Ser277 und Asp330/Tyr331-Motiv) des LHR befinden. Als Template dient das Transferritin (1BG7), welches eine ~30%ige Sequenzhomologie aufweist. Danach ergibt sich ein helikales Strukturelement innerhalb der Hinge-Region (dunkelgrau) sowie eine weitere Helix (hellgrau) im angrenzenden Bereich um das signalisierungssensitive Asp330/Tyr331-Motiv(rot).



**Abb.25: 3D-Homologiemodell des signalisierungssensitiven Bereiches der LHR-Hinge-Region (erstellt von Annika Kreuchwig mittels I-Tasser)**

Dargestellt ist das mittels I-Tasser erstellte 3D-Homologiemodell des signalisierungssensitiven Bereiches der LHR-Hinge-Region. Die signalisierungssensitive Position um das Serin 277 wird in der räumlichen Ausrichtung von den beiden gefundenen Strukturelementen, der Exon10-Helix (gold) sowie der an das Asp330/Tyr331-Motiv angrenzenden Helix (magenta) umschlossen. Im exponierten, flexiblen Bereich der LHR-Hinge-Region befindet sich die Asp330/Tyr331-Bindungstasche mit dem konservierten sulfatierten Tyrosin Tyr331.

Betreffend der Sekundärstrukturvorhersage suggerieren beide Anwendungen helikale Elemente sowohl innerhalb des Exon10-Bereichs, als auch für die sich anschließende signalisierungssensitive Region um das Tyrosin Tyr331 (siehe Abb.24). Obwohl sich beide Modelle bezüglich der Tertiärstruktur nur geringfügig unterscheiden, dienen die Modellvorschläge nur zur groben Einschätzung, da wahrscheinliche Kontakte zur LRRD oder zu den extrazellulären Schleifen bei der Ausbildung der Konformation nicht berücksichtigt werden konnten.

In beiden Modellen konnte eine räumliche Nähe des N-terminalen Cb2- und des C-terminalen Cb3-Bereiches, welche durch die Verbrückung der Cysteine Cys279 und Cys343 sowie Cys280 und Cys353 hervorgerufen wird, ermittelt werden.

In der räumlichen Ausrichtung umhüllen beide gefundenen Helizes (Exon10-Bereich und Tyr331-Region) die signalisierungssensitive Position um das Serin Ser277, welches sich in der Cb2 befindet und im Zusammenhang mit konstitutiv aktivierenden Mutationen beschrieben wurde (Zeng et al., 2001). Interessanterweise befindet sich die kürzere Helix der Tyr331-Region (siehe Abb.25) in beiden Modellen zwischen dem Serin Ser277 und dem exponierten signalisierungssensitiven Bereich um das Asp330/Tyr331-Motiv sowie dem hochkonservierten Tyrosin Tyr333, welches als potentielle Bindungsstelle für das CG diskutiert wird (Bonomi et al., 2006). Damit könnte die kürzere Helix als strukturelles Verbindungsstück zwischen der signalisierungssensitiven Mikrodomäne um das Serin Ser277 und dem Asp330/Tyr331-Motiv, welches für die LH-induzierte Rezeptorfunktion essentiell ist, fungieren.

*Die Anfertigung der 3D-Homologiemodelle, sowie die Durchführung der Sekundärstrukturvorhersage erfolgten durch Annika Kreuchwig und Dr. Gunnar Kleinau.*

Ein weiterer Hinweis auf den strukturellen Einfluss dieser Region auf die Konformationsänderung des LHR liefert ein kürzlich gefundener aktivierender Antikörper 13B1 (Mujumdar et al., 2012). Das gefundene diskontinuierliche Epitop repräsentiert die Sequenzen des N-terminalen Bereichs des Exon10 (Cb2: Asn291 bis Arg297) der in der Cb3 lokalisierten signalisierungssensitiven Tyr331-Region (Tyr331 bis Tyr333) sowie des in der Cb3 lokalisierten Bereiches Pro338 bis Lys339. Diese drei Regionen müssen somit bei einer aktiven Rezeptorkonformation in räumlicher Nähe an der Rezeptoroberfläche zueinander stehen.

Der Bereich, der die potentielle kürzere Helix beinhaltet, wurde auf seine mechanistische Relevanz für den intra- bzw. intermolekularen Aktivierungsprozess bisher noch nicht überprüft. Um die Frage zu beantworten, ob es sich bei den beiden potentiell strukturierten Bereichen um funktionsrelevante Strukturelemente handelt oder diese lediglich die Funktion eines Platzhalters zur Generierung exakter räumlicher Abstände zwischen den signalisierungssensitiven Bereichen einnehmen, wurden in einer funktionellen Untersuchung die vorhergesagten Strukturelemente durch strukturfördernden bzw. strukturstörenden Mutationen substituiert. Zur Imitation helikaler Proteinstrukturen eignet sich die sequenzielle Einführung von Polyalaninen (Couch et al., 2006). Dies wurde in der vorliegenden Arbeit in Form eines Polyalaninblock-Scans durchgeführt, bei dem die 27 Aminosäuren des Exon10-Bereiches und 7 Aminosäuren der potentiell strukturierten Tyr331-Region (Ser319 bis

Glu325) sequenziell durch Polyalanine substituiert wurden (siehe Ergebnisse 5.2.4). Die funktionelle Überprüfung der LHR-Polyalaninblock-Konstrukte zeigte keinen signifikanten Unterschied zum LHR-Wildtyp. Dies deutet darauf hin, dass für eine intakte GPH-Interaktion und somit LHR-Funktionalität in diesem Bereich der Hinge-Region keine spezifischen Aminosäureseitenketteneigenschaften verantwortlich sind. Der Polyalaninblock-Scan beinhaltet unter anderem auch die Substitution des Cysteins Cys304, welches im Verdacht steht, eine Disulfidverbrückung mit dem Cystein Cys336 einzugehen (Zhang et al., 1996). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden und bestätigt die Ergebnisse anderer Gruppen (Bruysters et al., 2008).

Um eine funktionelle Relevanz der beiden, nach dem Homologiemodell vermuteten, helikalen Strukturelemente nachzuweisen, wurden einzelne Proline in Form von Punktmutationen eingeführt, um die Ausbildung möglicher Strukturen zu stören. Die Einführung der beiden Proline Gln303Pro und Glu305Pro in den Exon10-Bereich resultierte erstaunlicherweise in einer verminderten CG-induzierten LHR-Funktion, aber nicht in der Minderung der LH-induzierten LHR-Funktion. Im Vergleich zum Exon10-deletierten Konstrukt, bei dem nur die LH-induzierte, nicht aber die CG-vermittelte Rezeptoraktivierung reduziert ist, ist der funktionelle Effekt bei einer strukturellen Störung des Exon10-Bereichs invertiert (siehe Ergebnisse 5.2.4.2). Die in der vorliegenden Arbeit eingangs aufgestellte Hypothese, dass das LH mit einem Strukturelement innerhalb des Exon10-Bereichs in einem intramolekularen Aktivierungsprozess interagiert, muss somit revidiert werden. Die Fehlfunktion der LHR-delExon10-Mutante, welche zu der Ausbildung einer Leydigzellen Hypoplasie Typ II führt, beruht somit nicht auf einer fehlenden direkten Interaktion des Gonadotropins LH mit dem Exon10-Bereich, sondern vielmehr auf einer Delokalisierung der für die LH-vermittelte Rezeptorfunktion unverzichtbaren Asp330/Tyr331-Bindungstasche, welche aus der Verkürzung der Hinge-Region aufgrund der Exon10-Deletion resultiert.

Auch ein direkter funktioneller Zusammenhang mit dem Strukturelement der Tyr331-Region kann ausgeschlossen werden, da die Einführung der strukturstörenden Prolinmutation Met320Pro die wildtypische Rezeptorfunktion, sowohl bei LH- als auch CG-Stimulation, nicht beeinflusst (siehe Ergebnisse 5.2.4.2).

Die Situation bei der CG-induzierten LHR-Aktivierung ist komplex. Zum einen konnte ein struktureller Zusammenhang des potentiellen Strukturelements der Exon10-Region mit der CG-vermittelten Rezeptoraktivierung nachgewiesen werden, zum anderen bleibt die LHR-Funktion bei einer kompletten Deletion des Exon10-Bereichs unbeeinflusst. Zu beachten ist in diesem Zusammenhang, dass die Verkürzung der

Hinge-Region um den Exon10-Bereich zu einer Delokalisation der Asp330/Tyr331-Bindungstasche führt, welche anders als beim LH keinen Einfluss auf die CG-induzierte LHR-Signalisierung hat. Die Struktur-Funktions-Relation bei der CG-induzierten Signalisierung konzentriert sich somit ebenfalls auf die vermuteten Strukturelemente innerhalb der Exon10-Region.

Die Verkürzung der Hinge-Region im Exon10-deletierten Konstrukt resultiert nicht nur in der Deplatzierung der Asp330/Tyr331-Bindungstasche. Ebenfalls beeinflusst ist auch die Position des angrenzenden Bereichs, welcher bei der Exon10-Deletion in N-terminaler Richtung verschoben ist und damit potentiell den Platz des Exon10-Bereiches einnimmt. Dies liefert eine plausible Erklärung dafür, dass trotz der Abwesenheit des Exon10-Bereiches eine volle Rezeptorfunktionalität bei CG-Stimulation zu erreichen ist, indem das im Homologiemodell vorhergesagte helikale Strukturelement der Tyr331-Region die notwendige Struktur für die CG-Interaktion zur Verfügung stellt. Die Verkürzung der Hinge-Region um den Exon10-Bereich resultiert einerseits in einer Deplatzierung der Asp330/Tyr331-Bindungstasche, was eine verminderte Arretierung des LH an die LRRD zur Folge hat, andererseits verschiebt sich der vermutete Strukturbereich der Tyr331-Region N-terminal, womit er als struktureller Partner für die CG-Interaktion zur Verfügung steht.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die intramolekulare Rezeptoraktivierung durch LH primär an der Lokalisation der Asn330/Tyr331-Bindungstasche gekoppelt ist, während die CG-induzierte LHR-Funktionalität maßgeblich durch Interaktionspunkte innerhalb des potentiell strukturierten Exon10-Bereichs vermittelt wird. Kombiniert man die mechanistischen Unterschiede beider Hormone mit den gefundenen Daten aus der Untersuchung zur intra- bzw. intermolekularen Rezeptoraktivierung beim LHR, so lässt sich ein differenziertes Aktivierungsprofil ableiten, bei dem die beiden Gonadotropine LH und CG aufgrund ihrer molekularen Eigenschaften unterschiedliche Interaktionspunkte und unterschiedliche Aktivierungswege (intra- bzw. intermolekular) nutzen. Dieser mechanistische Aspekt ist im Hinblick auf die unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften genauer zu betrachten, da ein Zusammenhang zwischen dem differenzierten Aktivierungsprofil beider Gonadotropine und der daraus resultierenden Modulation unterschiedlicher Signalkaskaden (ERK1/2 und PKA) sehr wahrscheinlich ist. Die Formulierung eines zusammenhängenden Modells für die LHR-Signalamplifikation könnte auf die übrigen GPHR angewandt werden und somit zu der Entwicklung eines differenzierten therapeutischen Ansatzes beitragen.

## 7. Literatur

Alberti, L., Proverbio, M.C., Costagliola, S., Weber, G., Beck-Peccoz, P., Chiumello, G., and Persani, L. (2001). A novel germline mutation in the TSH receptor gene causes non-autoimmune autosomal dominant hyperthyroidism. *Eur.J.Endocrinol.* *145*, 249–254.

Alberti, L., Proverbio, M.C., Costagliola, S., Romoli, R., Boldrighini, B., Vigone, M.C., Weber, G., Chiumello, G., Beck-Peccoz, P., and Persani, L. (2002). Germline mutations of TSH receptor gene as cause of nonautoimmune subclinical hypothyroidism. *J.Clin.Endocrinol.Metab* *87*, 2549–2555.

An, Y., Yumerefendi, H., Mas, P.J., Chesneau, A., and Hart, D.J. (2011). ORF-selector ESPRIT: a second generation library screen for soluble protein expression employing precise open reading frame selection. *Journal of Structural Biology* *175*, 189–197.

Anderson, S. (1981). Shotgun DNA sequencing using cloned DNase I-generated fragments. *Nucleic Acids Research* *9*, 3015–3027.

Andre, N., Cherouati, N., Zeder-lutz, G., Magnin, T., Pattus, F., Michel, H., Wagner, R., and Reinhart, C. (2006). Enhancing functional production of G protein-coupled receptors in *Pichia pastoris* to levels required for structural studies via a single expression screen. 1115–1126.

Angelova, K., Narayan, P., Simon, J.P., and Puett, D. (2000). Functional role of transmembrane helix 7 in the activation of the heptahelical lutropin receptor. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* *14*, 459–471.

Archbold, J.K., Flanagan, J.U., Watkins, H.A., Gingell, J.J., and Hay, D.L. (2011). Structural insights into RAMP modification of secretin family G protein-coupled receptors: implications for drug development. *Trends in Pharmacological Sciences* *32*, 591–600.

Ascoli, M., Fanelli, F., and Segaloff, D.L. (2002). The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr Rev* *23*, 141–174.

Baneyx, F., and Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* *22*, 1399–1408.

Battey, J.N., Kopp, J., Bordoli, L., Read, R.J., Clarke, N.D., and Schwede, T. (2007). Automated server predictions in CASP7. *Proteins* *69 Suppl 8*, 68–82.

Bella, J., Hindle, K.L., McEwan, P.A., and Lovell, S.C. (2008). The leucine-rich repeat structure. *Cellular and Molecular Life Sciences* □: CMLS *65*, 2307–2333.

Bernard, M.P., Myers, R.V., and Moyle, W.R. (1998). Lutropins appear to contact two independent sites in the extracellular domain of their receptors. *The Biochemical Journal* *335 ( Pt 3)*, 611–617.

Bhowmick, N. (1996). Determination of residues important in hormone binding to the extracellular domain of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor by site-directed mutagenesis and modeling. *Molecular Endocrinology* *10*, 1147–1159.

- Bhowmick, N., Narayan, P., and Puett, D. (1999). Identification of ionizable amino acid residues on the extracellular domain of the lutropin receptor involved in ligand binding. *Endocrinology* *140*, 4558–4563.
- Blanchard, C., and Moulin, G. (2001). NMR Monitoring of Accumulation and Folding of N-Labeled Protein Overexpressed in *Pichia pastoris*. *324*, 318–324.
- Bogerd, J. (2007). Ligand-selective determinants in gonadotropin receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology* *260-262*, 144–152.
- Bonomi, M., Busnelli, M., Persani, L., Vassart, G., and Costagliola, S. (2006). Structural differences in the hinge region of the glycoprotein hormone receptors: evidence from the sulfated tyrosine residues. *Mol Endocrinol* *20*, 3351–3363.
- Bouvier, M. (2001). Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nature Reviews. Neuroscience* *2*, 274–286.
- Bruysters, M., Verhoef-Post, M., and Themmen, A.P. (2008). Asp330 and Tyr331 in the C-terminal cysteine-rich region of the luteinizing hormone receptor are key residues in hormone-induced receptor activation. *J Biol Chem* *283*, 25821–25828.
- Caltabiano, G., Campillo, M., De Leener, A., Smits, G., Vassart, G., Costagliola, S., and Pardo, L. (2008). The specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences* □: *CMLS* *65*, 2484–2492.
- Casarini, L., Lispi, M., Longobardi, S., Milosa, F., La Marca, A., Tagliasacchi, D., Pignatti, E., and Simoni, M. (2012). LH and hCG Action on the Same Receptor Results in Quantitatively and Qualitatively Different Intracellular Signalling. *PloS One* *7*, e46682.
- Cereghino, J.L., and Cregg, J.M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews* *24*, 45–66.
- Chazenbalk, G.D., Tanaka, K., Nagayama, Y., Kakinuma, A., Jaume, J.C., McLachlan, S.M., and Rapoport, B. (1997). Evidence that the thyrotropin receptor ectodomain contains not one, but two, cleavage sites. *Endocrinology* *138*, 2893–2899.
- Choi, J.H., and Lee, S.Y. (2004). Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* *64*, 625–635.
- Cornvik, T., Dahlroth, S.-L., Magnusdottir, A., Flodin, S., Engvall, B., Lieu, V., Ekberg, M., and Nordlund, P. (2006). An efficient and generic strategy for producing soluble human proteins and domains in *E. coli* by screening construct libraries. *Proteins* *65*, 266–273.
- Costagliola, S., Panneels, V., Bonomi, M., Koch, J., Many, M.C., Smits, G., and Vassart, G. (2002). Tyrosine sulfation is required for agonist recognition by glycoprotein hormone receptors. *EMBO J* *21*, 504–513.
- Costagliola, S., Urizar, E., Mendive, F., and Vassart, G. (2005). Specificity and promiscuity of gonadotropin receptors. *Reproduction* *130*, 275–281.
- Couch, V.A., Cheng, N., Nambiar, K., and Fink, W. (2006). Structural characterization of alpha-helices of implicitly solvated poly-alanine. *J Phys Chem B* *110*, 3410–3419.

- Daly, R., and Hearn, M.T.W. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*: JMR 18, 119–138.
- Davis, D., Liu, X., and Segaloff, D.L. (1995). Identification of the sites of N-linked glycosylation on the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor and assessment of their role in FSH receptor function. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 9, 159–170.
- Davis, D.P., Rozell, T.G., Liu, X., and Segaloff, D.L. (1997). The six N-linked carbohydrates of the lutropin/choriogonadotropin receptor are not absolutely required for correct folding, cell surface expression, hormone binding, or signal transduction. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 11, 550–562.
- Denton, H., Smith, M., Husi, H., Uhrin, D., Barlow, P.N., Batt, C. a, and Sawyer, L. (1998). Isotopically labeled bovine beta-lactoglobulin for NMR studies expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 14, 97–103.
- Devi, L.A. (2001). Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking. *Trends in Pharmacological Sciences* 22, 532–537.
- Dias, J.A. (2005). Endocrinology: fertility hormone in repose. *Nature* 433, 203–204.
- Dyson, M.R., Perera, R.L., Shadbolt, S.P., Biderman, L., Bromek, K., Murzina, N.V., and McCafferty, J. (2008). Identification of soluble protein fragments by gene fragmentation and genetic selection. *Nucleic Acids Research* 36, e51.
- Fan, Q.R., and Hendrickson, W.A. (2005). Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature* 433, 269–277.
- Fan, Q.R., and Hendrickson, W.A. (2007). Assembly and structural characterization of an authentic complex between human follicle stimulating hormone and a hormone-binding ectodomain of its receptor. *Mol.Cell Endocrinol.* 260-262, 73–82.
- Fan, Q.R., and Hendrickson, W.A. (2008). Comparative structural analysis of the binding domain of follicle stimulating hormone receptor. *Proteins* 72, 393–401.
- Fanelli, F. (2007). Dimerization of the lutropin receptor: insights from computational modeling. *Mol Cell Endocrinol* 260-262, 59–64.
- Faure, M., Voyno-Yasenetskaya, T.A., and Bourne, H.R. (1994). cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 7851–7854.
- Fernandez, L.M., and Puett, D. (1996). Identification of amino acid residues in transmembrane helices VI and VII of the lutropin/choriogonadotropin receptor involved in signaling. *Biochemistry* 35, 3986–3993.
- Galet, C., and Ascoli, M. (2005). The differential binding affinities of the luteinizing hormone (LH)/choriogonadotropin receptor for LH and choriogonadotropin are dictated by different extracellular domain residues. *Mol Endocrinol* 19, 1263–1276.
- George, S.R., O'Dowd, B.F., and Lee, S.P. (2002). G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 1, 808–820.

Gershengorn, M.C., and Osman, R. (2001). Minireview: Insights into G protein-coupled receptor function using molecular models. *Endocrinology* 142, 2–10.

Grasberger, H., Van Sande, J., Hag-Dahood Mahameed, A., Tenenbaum-Rakover, Y., and Refetoff, S. (2007). A familial thyrotropin (TSH) receptor mutation provides in vivo evidence that the inositol phosphates/Ca<sup>2+</sup> cascade mediates TSH action on thyroid hormone synthesis. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 2816–2820.

Gromoll, J., Eiholzer, U., Nieschlag, E., and Simoni, M. (2000). Male hypogonadism caused by homozygous deletion of exon 10 of the luteinizing hormone (LH) receptor: differential action of human chorionic gonadotropin and LH. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 2281–2286.

Gromoll, J., Wistuba, J., Terwort, N., Godmann, M., Muller, T., and Simoni, M. (2003). A new subclass of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor lacking exon 10 messenger RNA in the New World monkey (*Platyrrhini*) lineage. *Biol Reprod* 69, 75–80.

Gromoll, J., Simula, A.P., Norman, R., and Simoni, M. (2004). The Carboxyterminal Peptide of Chorionic Gonadotropin Facilitates Activation of the Marmoset LH Receptor.

Guan, R., Feng, X., Wu, X., Zhang, M., Zhang, X., Hebert, T.E., and Segaloff, D.L. (2009). Bioluminescence resonance energy transfer studies reveal constitutive dimerization of the human lutropin receptor and a lack of correlation between receptor activation and the propensity for dimerization. *J Biol Chem* 284, 7483–7494.

Guan, R., Wu, X., Feng, X., Zhang, M., Hebert, T.E., Segaloff, D.L., and Hébert, T.E. (2010). Structural determinants underlying constitutive dimerization of unoccupied human follitropin receptors. *Cell Signal* 22, 247–256.

Gudermann, T., Birnbaumer, M., and Birnbaumer, L. (1992). Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca<sup>2+</sup> mobilization. Studies with the cloned murine luteinizing hormone receptor expressed in L cells. *The Journal of Biological Chemistry* 267, 4479–4488.

Guilligay, D., Tarendeau, F., Resa-Infante, P., Coloma, R., Crepin, T., Sehr, P., Lewis, J., Ruigrok, R.W.H., Ortin, J., Hart, D.J., et al. (2008). The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nature Structural & Molecular Biology* 15, 500–506.

Haas, A.-K., Kleinau, G., Hoyer, I., Neumann, S., Furkert, J., Rutz, C., Schülein, R., Gershengorn, M.C., and Krause, G. (2011). Mutations that silence constitutive signaling activity in the allosteric ligand-binding site of the thyrotropin receptor. *Cellular and Molecular Life Sciences*: CMLS 68, 159–167.

Hart, D.J., and Tarendeau, F. (2006). Combinatorial library approaches for improving soluble protein expression in *Escherichia coli*. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 62, 19–26.

Heery, D.M., Gannon, F., and Powell, R. (1990). A simple method for subcloning DNA fragments from gel slices. *Trends in Genetics*: TIG 6, 173.

Hirakawa, T., Galet, C., and Ascoli, M. (2002). MA-10 cells transfected with the human lutropin/choriogonadotropin receptor (hLHR): a novel experimental paradigm to study the functional properties of the hLHR. *Endocrinology* 143, 1026–1035.

- Ho, S.C., Van Sande, J., Lefort, A., Vassart, G., and Costagliola, S. (2001). Effects of mutations involving the highly conserved S281HCC motif in the extracellular domain of the thyrotropin (TSH) receptor on TSH binding and constitutive activity. *Endocrinology* *142*, 2760–2767.
- Ho, S.C., Goh, S.S., Li, S., Khoo, D.H., and Paterson, M. (2008). Effects of mutations involving cysteine residues distal to the S281HCC motif at the C-terminus on the functional characteristics of a truncated ectodomain-only thyrotropin receptor anchored on glycosylphosphatidylinositol. *Thyroid* *18*, 1313–1319.
- Horvat, R.D., Roess, D.A., Nelson, S.E., Barisas, B.G., and Clay, C.M. (2001). Binding of agonist but not antagonist leads to fluorescence resonance energy transfer between intrinsically fluorescent gonadotropin-releasing hormone receptors. *Mol Endocrinol* *15*, 695–703.
- IUPHAR (2000). The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification.
- Jacoby, E., Bouhelal, R., Gerspacher, M., and Seuwen, K. (2006). The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem* *1*, 761–782.
- Jaeschke, H., Neumann, S., Kleinau, G., Mueller, S., Claus, M., Krause, G., and Paschke, R. (2006). An aromatic environment in the vicinity of serine 281 is a structural requirement for thyrotropin receptor function. *Endocrinology* *147*, 1753–1760.
- Jaeschke, H., Schaarschmidt, J., Gunther, R., and Mueller, S. (2011). The hinge region of the TSH receptor stabilizes ligand binding and determines different signaling profiles of human and bovine TSH. *Endocrinology* *152*, 3986–3996.
- Jeoung, M., Lee, C., Ji, I., and Ji, T.H. (2007). Trans-activation, cis-activation and signal selection of gonadotropin receptors. *Mol.Cell Endocrinol.* *260-262*, 137–143.
- Ji, I., Lee, C., Song, Y., Conn, P.M., and Ji, T.H. (2002). Cis- and trans-activation of hormone receptors: the LH receptor. *Mol Endocrinol* *16*, 1299–1308.
- Ji, I., Lee, C., Jeoung, M., Koo, Y., Sievert, G. a, and Ji, T.H. (2004). Trans-activation of mutant follicle-stimulating hormone receptors selectively generates only one of two hormone signals. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* *18*, 968–978.
- Jiang, X., Liu, H., Chen, X., Chen, P., Fischer, D., Sriraman, V., and Yu, H.N. (2012). Structure of follicle-stimulating hormone in complex with the entire ectodomain of its receptor. 1–8.
- Kajava, A.V. (1998). Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. *Journal of Molecular Biology* *277*, 519–527.
- Katritch, V., Cherezov, V., and Stevens, R.C. (2012). Structure-Function of the G Protein-Coupled Receptor Superfamily. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1–25.
- Kawasaki, M., and Inagaki, F. (2001). Random PCR-based screening for soluble domains using green fluorescent protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *280*, 842–844.

- Kero, J., Ahmed, K., Wettschureck, N., Tunaru, S., Wintermantel, T., Greiner, E., Schutz, G., and Offermanns, S. (2007). Thyrocyte-specific Gq/G11 deficiency impairs thyroid function and prevents goiter development. *J Clin Invest* 117, 2399–2407.
- Kleinau, G., and Krause, G. (2009). Thyrotropin and homologous glycoprotein hormone receptors: structural and functional aspects of extracellular signaling mechanisms. *Endocrine Reviews* 30, 133–151.
- Kleinau, G., Jaschke, H., Neumann, S., Lattig, J., Paschke, R., and Krause, G. (2004). Identification of a novel epitope in the thyroid-stimulating hormone receptor ectodomain acting as intramolecular signaling interface. *J Biol Chem* 279, 51590–51600.
- Kleinau, G., Claus, M., Jaeschke, H., Mueller, S., Neumann, S., Paschke, R., and Krause, G. (2007). Contacts between extracellular loop two and transmembrane helix six determine basal activity of the thyroid-stimulating hormone receptor. *J Biol Chem* 282, 518–525.
- Kleinau, G., Jaeschke, H., Mueller, S., Raaka, B.M., Neumann, S., Paschke, R., and Krause, G. (2008). Evidence for cooperative signal triggering at the extracellular loops of the TSH receptor. *FASEB J* 22, 2798–2808.
- Kleinau, G., Kreuchwig, A., Worth, C.L., and Krause, G. (2010a). An interactive web-tool for molecular analyses links naturally occurring mutation data with three-dimensional structures of the rhodopsin-like glycoprotein hormone receptors. *Hum Mutat* 31, E1519–25.
- Kleinau, G., Haas, A.K., Neumann, S., Worth, C.L., Hoyer, I., Furkert, J., Rutz, C., Gershengorn, M.C., Schulein, R., and Krause, G. (2010b). Signaling-sensitive amino acids surround the allosteric ligand binding site of the thyrotropin receptor. *FASEB J* 24, 2347–2354.
- Kleinau, G., Hoyer, I., Kreuchwig, A., Haas, A.K., Rutz, C., Furkert, J., Worth, C.L., Krause, G., and Schulein, R. (2011a). 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* 286, 25859–25871.
- Kleinau, G., Mueller, S., Jaeschke, H., Grzesik, P., Neumann, S., Diehl, A., Paschke, R., and Krause, G. (2011b). Defining structural and functional dimensions of the extracellular thyrotropin receptor region. *J Biol Chem* 286, 22622–22631.
- Kniazeff, J., Prézeau, L., Rondard, P., Pin, J.-P., and Goudet, C. (2011). Dimers and beyond: The functional puzzles of class C GPCRs. *Pharmacology & Therapeutics* 130, 9–25.
- Kopp, P. (2001). The TSH receptor and its role in thyroid disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*: CMLS 58, 1301–1322.
- Kosugi, S., Ban, T., Akamizu, T., and Kohn, L.D. (1991). Site-directed mutagenesis of a portion of the extracellular domain of the rat thyrotropin receptor important in autoimmune thyroid disease and nonhomologous with gonadotropin receptors. Relationship of functional and immunogenic domains. *J Biol Chem* 266, 19413–19418.
- Kosugi, S., Sugawa, H., and Mori, T. (1996). TSH receptor and LH receptor, 1996. *Endocr J* 43, 595–604.

Kristiansen, K. (2004). 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* 103, 21–80.

Kudo, M., Osuga, Y., Kobilka, B.K., and Hsueh, A.J. (1996). Transmembrane regions V and VI of the human luteinizing hormone receptor are required for constitutive activation by a mutation in the third intracellular loop. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 22470–22478.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

Latif, R., Graves, P., and Davies, T.F. (2002). Ligand-dependent inhibition of oligomerization at the human thyrotropin receptor. *J Biol Chem* 277, 45059–45067.

De Leener, A., Caltabiano, G., Erkan, S., Idil, M., Vassart, G., Pardo, L., and Costagliola, S. (2008). Identification of the first germline mutation in the extracellular domain of the follitropin receptor responsible for spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Mutat* 29, 91–98.

Lezoualc'h, F., Hassan, A.H., Giraud, P., Loeffler, J.P., Lee, S.L., and Demeneix, B.A. (1992). 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. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 6, 1797–1804.

Liang, Y., Fotiadis, D., Filipek, S., Saperstein, D.A., Palczewski, K., and Engel, A. (2003). Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 21655–21662.

Loosfelt, H., Pichon, C., Jolivet, A., Misrahi, M., Caillou, B., Jamous, M., Vannier, B., and Milgrom, E. (1992). Two-subunit structure of the human thyrotropin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3765–3769.

Millar, R.P., and Newton, C.L. (2010). The year in G protein-coupled receptor research. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 24, 261–274.

Misrahi, M., Meduri, G., Pissard, S., Bouvattier, C., Beau, I., Loosfelt, H., Jolivet, A., Rappaport, R., Milgrom, E., and Bougneres, P. (1997). Comparison of immunocytochemical and molecular features with the phenotype in a case of incomplete male pseudohermaphroditism associated with a mutation of the luteinizing hormone receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 2159–2165.

Mizutori, Y., Chen, C.R., McLachlan, S.M., and Rapoport, B. (2008). The thyrotropin receptor hinge region is not simply a scaffold for the leucine-rich domain but contributes to ligand binding and signal transduction. *Mol Endocrinol* 22, 1171–1182.

Mueller, S., Kleinau, G., Jaeschke, H., Paschke, R., and Krause, G. (2008). Extended hormone binding site of the human thyroid stimulating hormone receptor: distinctive acidic residues in the hinge region are involved in bovine thyroid stimulating hormone binding and receptor activation. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 18048–18055.

Mueller, S., Jaeschke, H., Gu, R., and Paschke, R. (2009a). The hinge region: an important receptor component for GPCR function. *409*.

- Mueller, S., Kleinau, G., Szkudlinski, M.W., Jaeschke, H., Krause, G., and Paschke, R. (2009b). The superagonistic activity of bovine thyroid-stimulating hormone (TSH) and the human TR1401 TSH analog is determined by specific amino acids in the hinge region of the human TSH receptor. *J Biol Chem* 284, 16317–16324.
- Mueller, S., Szkudlinski, M.W., Schaarschmidt, J., Gunther, R., Paschke, R., and Jaeschke, H. (2011). Identification of novel TSH interaction sites by systematic binding analysis of the TSHR hinge region. *Endocrinology* 152, 3268–3278.
- Mueller, T., Gromoll, J., and Simoni, M. (2003). Absence of Exon 10 of the Human Luteinizing Hormone (LH) Receptor Impairs LH, But Not Human Chorionic Gonadotropin Action. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88, 2242–2249.
- Mujumdar, R., Railkar, R., Dighe, R.R., and Majumdar, R. (2012). Insight into differential modulation of receptor function by hinge region using novel agonistic lutropin receptor and inverse agonistic thyrotropin receptor antibodies. *FEBS Lett*.
- Muller, T., Gromoll, J., and Simoni, M. (2003). Absence of exon 10 of the human luteinizing hormone (LH) receptor impairs LH, but not human chorionic gonadotropin action. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2242–2249.
- Muller, T., Gromoll, J., Simula, A.P., Norman, R., Sandhowe-Klaverkamp, R., and Simoni, M. (2004). The carboxyterminal peptide of chorionic gonadotropin facilitates activation of the marmoset LH receptor. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 112, 574–579.
- Nagayama, Y., and Rapoport, B. (1992). Role of the carboxyl-terminal half of the extracellular domain of the human thyrotropin receptor in signal transduction. *Endocrinology* 131, 548–552.
- Nagayama, Y., Wadsworth, H.L., Chazenbalk, G.D., Russo, D., Seto, P., and Rapoport, B. (1991). Thyrotropin-luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor extracellular domain chimeras as probes for thyrotropin receptor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 902–905.
- Nagayama, Y., Nishihara, E., Namba, H., Yamashita, S., and Niwa, M. (2000). Identification of the sites of asparagine-linked glycosylation on the human thyrotropin receptor and studies on their role in receptor function and expression. *J Pharmacol Exp Ther* 295, 404–409.
- Nurwakagari, P., Breit, A., Hess, C., Salman-Livny, H., Ben-Menahem, D., and Gudermann, T. (2007). A conformational contribution of the luteinizing hormone-receptor ectodomain to receptor activation. *J Mol Endocrinol* 38, 259–275.
- Osuga, Y., Hayashi, M., Kudo, M., Conti, M., Kobilka, B., and Hsueh, A.J. (1997). Co-expression of defective luteinizing hormone receptor fragments partially reconstitutes ligand-induced signal generation. *J Biol Chem* 272, 25006–25012.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., et al. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739–745.
- Reich, S., Puckey, L.H., Cheetham, C.L., Harris, R., Ali, A.A.E., Bhattacharyya, U., Maclagan, K., Powell, K.A., Prodromou, C., Pearl, L.H., et al. (2006). Combinatorial Domain Hunting: An effective approach for the identification of soluble protein domains adaptable to

high-throughput applications. *Protein Science*: a Publication of the Protein Society *15*, 2356–2365.

Rivero-Muller, A., Chou, Y.Y., Ji, I., Lajic, S., Hanyaloglu, A.C., Jonas, K., Rahman, N., Ji, T.H., and Huhtaniemi, I. (2010). Rescue of defective G protein-coupled receptor function in vivo by intermolecular cooperation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 2319–2324.

Rodien, P., Brémont, C., Sanson, M.L., Parma, J., Van Sande, J., Costagliola, S., Luton, J.P., Vassart, G., and Duprez, L. (1998). Familial gestational hyperthyroidism caused by a mutant thyrotropin receptor hypersensitive to human chorionic gonadotropin. *The New England Journal of Medicine* *339*, 1823–1826.

Ryu, K., Gilchrist, R.L., Tung, C.S., Ji, I., and Ji, T.H. (1998). High affinity hormone binding to the extracellular N-terminal exodomain of the follicle-stimulating hormone receptor is critically modulated by exoloop 3. *The Journal of Biological Chemistry* *273*, 28953–28958.

Samama, P., Cotecchia, S., Costa, T., and Lefkowitz, R.J. (1993). A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *The Journal of Biological Chemistry* *268*, 4625–4636.

Sambrook, J., and Russell, D. (2001). *Molecular Cloning*.

Sanders, J., Chirgadze, D.Y., Sanders, P., Baker, S., Sullivan, A., Bhardwaja, A., Bolton, J., Reeve, M., Nakatake, N., Evans, M., et al. (2007). Crystal structure of the TSH receptor in complex with a thyroid-stimulating autoantibody. *Thyroid* *17*, 395–410.

Sanders, P., Young, S., Sanders, J., Kabelis, K., Baker, S., Sullivan, A., Evans, M., Clark, J., Wilmot, J., Hu, X., et al. (2011). Crystal structure of the TSH receptor (TSHR) bound to a blocking-type TSHR autoantibody. *J Mol Endocrinol* *46*, 81–99.

Sangkuhl, K., Schulz, A., Schultz, G., Schoneberg, T., Scho, T., Franklin, B., and Universita, F. (2002). Structural requirements for mutational lutropin/choriogonadotropin receptor activation. *J Biol Chem* *277*, 47748–47755.

Saunier, B., Tournier, C., Jacquemin, C., and Pierre, M. (1995). Stimulation of mitogen-activated protein kinase by thyrotropin in primary cultured human thyroid follicles. *The Journal of Biological Chemistry* *270*, 3693–3697.

Schöneberg, T., Schulz, A., Biebermann, H., Hermsdorf, T., Rompler, H., and Sangkuhl, K. (2004). Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases. *Pharmacol Ther* *104*, 173–206.

Simoni, M., Gromoll, J., and Nieschlag, E. (1997). The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev* *18*, 739–773.

Standfuss, J., Edwards, P.C., D'Antona, A., Fransen, M., Xie, G., Oprian, D.D., and Schertler, G.F. (2011). The structural basis of agonist-induced activation in constitutively active rhodopsin. *Nature* *471*, 656–660.

Stenkamp, R.E., Teller, D.C., and Palczewski, K. (2005). Rhodopsin: a structural primer for G-protein coupled receptors. *Archiv Der Pharmazie* *338*, 209–216.

Stockell Hartree, A., and Renwick, A.G. (1992). Molecular structures of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components. *The Biochemical Journal* 287 ( Pt 3, 665–679.

van Straten, N.C.R., Schoonus-Gerritsma, G.G., van Someren, R.G., Draaijer, J., Adang, A.E.P., Timmers, C.M., Hanssen, R.G.J.M., and van Boeckel, C.A.A. (2002). The first orally active low molecular weight agonists for the LH receptor: thienopyr(im)idines with therapeutic potential for ovulation induction. *Chembiochem*: a European Journal of Chemical Biology 3, 1023–1026.

van Straten, N.C.R., van Berkel, T.H.J., Demont, D.R., Karstens, W.-J.F., Merckx, R., Oosterom, J., Schulz, J., van Someren, R.G., Timmers, C.M., and van Zandvoort, P.M. (2005). Identification of substituted 6-amino-4-phenyltetrahydroquinoline derivatives: potent antagonists for the follicle-stimulating hormone receptor. *Journal of Medicinal Chemistry* 48, 1697–1700.

Szkudlinski, M.W., Fremont, V., Ronin, C., and Weintraub, B.D. (2002). Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiol Rev* 82, 473–502.

Tanaka, K., Chazenbalk, G.D., McLachlan, S.M., and Rapoport, B. (1999a). The shed thyrotropin receptor is primarily a carboxyl terminal truncated form of the A subunit, not the entire A subunit. *Mol Cell Endocrinol* 150, 113–119.

Tanaka, K., Chazenbalk, G.D., McLachlan, S.M., and Rapoport, B. (1999b). Thyrotropin receptor cleavage at site 1 involves two discontinuous segments at each end of the unique 50-amino acid insertion. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 2093–2096.

Tao, Y.X. (2006). Inactivating mutations of G protein-coupled receptors and diseases: structure-function insights and therapeutic implications. *Pharmacol Ther* 111, 949–973.

Tao, Y.X., Johnson, N.B., and Segaloff, D.L. (2004). Constitutive and agonist-dependent self-association of the cell surface human lutropin receptor. *J Biol Chem* 279, 5904–5914.

Teichmann, A., Rutz, C., Kreuchwig, A., Krause, G., Wiesner, B., and Schüle, R. (2012). The Pseudo Signal Peptide of the Corticotropin-releasing Factor Receptor Type 2A Prevents Receptor Oligomerization. *The Journal of Biological Chemistry* 287, 27265–27274.

Terrillon, S., Barberis, C., and Bouvier, M. (2004). Heterodimerization of V1a and V2 vasopressin receptors determines the interaction with beta-arrestin and their trafficking patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 1548–1553.

Themmen, A.P.N., and Huhtaniemi, I.T. (2000). Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocr Rev* 21, 551–583.

Tournier, C., Gavaret, J.M., Jacquemin, C., Pierre, M., and Saunier, B. (1995). Stimulation of mitogen-activated protein kinase by thyrotropin in astrocytes. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 228, 16–22.

- Urizar, E., Montanelli, L., Loy, T., Bonomi, M., Swillens, S., Gales, C., Bouvier, M., Smits, G., Vassart, G., and Costagliola, S. (2005). Glycoprotein hormone receptors: link between receptor homodimerization and negative cooperativity. *EMBO J* 24, 1954–1964.
- Valant, C., Robert Lane, J., Sexton, P.M., and Christopoulos, A. (2012). The best of both worlds? Bitopic orthosteric/allosteric ligands of G protein-coupled receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 52, 153–178.
- Vassart, G., and Costagliola, S. (2004). A physiological role for the posttranslational cleavage of the thyrotropin receptor? *Endocrinology* 145, 1–3.
- Vassart, G., and Dumont, J.E. (1992). The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocrine Reviews* 13, 596–611.
- Vassart, G., Pardo, L., and Costagliola, S. (2004). A molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors. *Trends Biochem.Sci.* 29, 119–126.
- Vilardaga, J.P., Nikolaev, V.O., Lorenz, K., Ferrandon, S., Zhuang, Z., and Lohse, M.J. (2008). Conformational cross-talk between alpha2A-adrenergic and mu-opioid receptors controls cell signaling. *Nat Chem Biol* 4, 126–131.
- Vischer, H.F., Granneman, J.C.M., Noordam, M.J., Mosselman, S., and Bogerd, J. (2003). Ligand selectivity of gonadotropin receptors. Role of the beta-strands of extracellular leucine-rich repeats 3 and 6 of the human luteinizing hormone receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 15505–15513.
- Vischer, H.F., Granneman, J.C.M., and Bogerd, J. (2006). Identification of follicle-stimulating hormone-selective beta-strands in the N-terminal hormone-binding exodomain of human gonadotropin receptors. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 20, 1880–1893.
- Vlaeminck-Guillem, V., Ho, S.C., Rodien, P., Vassart, G., and Costagliola, S. (2002). Activation of the cAMP pathway by the TSH receptor involves switching of the ectodomain from a tethered inverse agonist to an agonist. *Mol Endocrinol* 16, 736–746.
- Waldo, G.S., Standish, B.M., Berendzen, J., and Terwilliger, T.C. (1999). Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* 17, 691–695.
- Weeks, S.D., Drinker, M., and Loll, P.J. (2007). Ligation independent cloning vectors for expression of SUMO fusions. *Protein Expression and Purification* 53, 40–50.
- Yumerefendi, H., Desravines, D.C., and Hart, D.J. (2011). Library-based methods for identification of soluble expression constructs. *Methods (San Diego, Calif.)* 55, 38–43.
- Zeng, H., Phang, T., Song, Y.S., Ji, I., and Ji, T.H. (2001). The role of the hinge region of the luteinizing hormone receptor in hormone interaction and signal generation. *J Biol Chem* 276, 3451–3458.
- Zhang, M., Tong, K.P., Fremont, V., Chen, J., Narayan, P., Puett, D., Weintraub, B.D., and Szekudlinski, M.W. (2000). The extracellular domain suppresses constitutive activity of the transmembrane domain of the human TSH receptor: implications for hormone-receptor interaction and antagonist design. *Endocrinology* 141, 3514–3517.

Zhang, M., Guan, R., and Segaloff, D.L. (2012). Revisiting and questioning functional rescue between dimerized LH receptor mutants. *Mol Endocrinol* 26, 655–668.

Zhang, M.L., Sugawa, H., Kosugi, S., and Mori, T. (1995). Constitutive activation of the thyrotropin receptor by deletion of a portion of the extracellular domain. *Biochem Biophys Res Commun* 211, 205–210.

Zhang, R., Buczko, E., and Dufau, M.L. (1996). Requirement of cysteine residues in exons 1-6 of the extracellular domain of the luteinizing hormone receptor for gonadotropin binding. *J Biol Chem* 271, 5755–5760.

Zoenen, M., Urizar, E., Swillens, S., Vassart, G., and Costagliola, S. (2012). Evidence for activity-regulated hormone-binding cooperativity across glycoprotein hormone receptor homomers. *Nat Commun* 3, 1007.

## 8. Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
bd	bindungsdefizient
bp	Basenpaare
bzg	bezüglich
bzw	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cb	Cysteinbox
CH	Schweiz
CI	Konfidenzintervall
cm	Zentimeter
D	Deutschland
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
ECL	extrazelluläre Schleife
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	<i>extracellular signal-related kinase</i>
et al.	<i>et alii</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCCS	<i>Fluorescent cross-correlation spektroskopie</i>

FSH	Follitropin
FSHR	Follitropinrezeptor
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GPHR	Glykoproteinhormon-Rezeptor
h	Stunde
CG	Choriongonadotropin
HEK	humane embryonale Nierenzellen
LH	Lutropin
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
ICL	intrazelluläre Schleife
IU/ml	International Units /Milliliter
kDa	Kilodalton
l	Liter
IgG	Immunglobulin G
LHR	Lutropinrezeptor
LRR	<i>leucine-rich repeat</i>
LRRD	<i>leucine-rich repeat</i> -Domäne
M	Molar
MAPK	<i>mitogen-activated-protein-kinase</i>
mCh	<i>mCherry</i>
min	Minute
mM	Millimolar
nm	Nanometer
nt	Nukleotide

OD	Optische Dichte
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia Pastoris</i>
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKA	Protein-Kinase A
RT	Raumtemperatur
sd	signalisierungsdefizient
SD	transmembranäre Serpentindomäne
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
T3	Triiodthyronin
T4	Thyroxin
Tab	Tabelle
TBS	trisgepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TMH	transmembranäre Helix
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSH	Thyreotropin
TSHR	Thyreotropinrezeptor
UK	<i>United Kingdom</i>
µl	Mikroliter
US	<i>United States</i>
V	Volt
w/v	Gewicht/Volumen
x	mal

z.B. zum Beispiel  
°C Grad Celsius

## 8.2 Abkürzung der Aminosäuren

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

### 8.3 Themenrelevante Publikationen, Vorträge, Poster und Abstracts

#### 8.3.1 Themenrelevante Publikationen

Kleinau, G., Mueller, S., Jaeschke, H., Grzesik, P., Neumann, S., Diehl, A., Paschke, R., and Krause, G. 2011. Defining structural and functional dimensions of the extracellular thyrotropin receptor region. *J Biol Chem* 286, 22622–22631.

Grzesik, P. Teichmann, A., Furkert, J., Rutz, C., Wiesner, B., Kleinau, G., Schülein, R., Gromoll, J., and Krause, G. 2013. Differences between lutropin- and – choriongonadotropin-mediated receptor activation. *FEBS*, *submitted*

#### 8.3.2 Vorträge

2013

56. Symposium der Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie, Düsseldorf, DE

Different intra- and intermolecular activation mechanisms at the human lutropin receptor: Lutropin induces only cis- and choriongonadotropin also trans-activation

#### 8.3.3 Poster und Abstracts

2012

55. Symposium Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie, Mannheim DE, Posterpräsentation:

*Elucidation of molecular determinants for dysfunction of hLH/CGR-Exon10 mutant causing Leydig cell hypoplasia type II*

Grzesik P, Teichmann A, Furkert J, Rutz C, Wiesner B, Schülein R, Gromoll J, Krause G

15. International Congress of Endocrinology, 14 European Congress of Endocrinology, Florence, IT, Posterpräsentation:

*The homologous hormones lutropin and choriongonadotropin are interacting differently with the LH/CG receptor*

Grzesik P, Teichmann A, Furkert J, Rutz C, Wiesner B, Schülein R, Gromoll J, Krause G

**9. Erklärung**

Ich versichere hiermit, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt und die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben habe. Diese Dissertation hat noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen und ist abgesehen von den Teilpublikationen nicht veröffentlicht worden. 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.

Paul Grzesik