Charakterisierung der Bindungsregion kleiner Molekülliganden im Rezeptor des schilddrüsenstimulierenden Hormons

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

Ann-Karin Haas aus Hennigsdorf bei Berlin

Berlin, 2011

Diese Arbeit wurde von Juni 2007 bis Juni 2011 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 14. Mai 2012

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie in Berlin-Buch in der Arbeitsgruppe von Dr. Gerd Krause angefertigt. Ihm danke ich sehr herzlich für die stets hervorragende Betreuung meiner Arbeit. Jeder Zeit konnte ich mich auf seine wissenschaftliche Unterstützung und Beratung verlassen.

Sehr dankbar bin ich Herrn Prof. Dr. Hartmut Oschkinat für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen im Institut und die Übernahme des Gutachtens.

Ein besonderer Dank geht an Herrn PD Dr. Ralf Schülein für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die konstruktive Kritik während der Anfertigung dieser Arbeit.

Vielen Dank auch an Herrn Dr. Gunnar Kleinau, der mir während der gesamten Zeit kompetent beratend, motivierend und kollegial zur Seite stand. Seine immer vorhandene Diskussionsbereitschaft hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. Claudia Rutz und Herrn Dr. Jens Furkert für ihre fachkundige Unterstützung, ihre praktischen Ratschläge und Tipps.

Für die gute Zusammenarbeit danke ich unseren Kooperationspartnern Marvin C. Gershengorn, M.D., und Dr. Susanne Neumann (NIDDK,NIH, Maryland, USA).

Mein Dank gilt ebenfalls allen meinen Kollegen, die hier nicht namentlich erwähnt wurden. Ihre Unterstützung bei den Problemen der täglichen Laborarbeit war für mich eine große Hilfe während dieser Zeit.

Die abschließenden Worte gelten meiner Familie. Sie ist mir immer ein starker Rückhalt gewesen.

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
1.1.	Summary	4
2.	Einleitung	6
2.1.	Der Thyrotropinrezeptor gehört als Glykoproteinhormonrezeptor z	ur
	Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren	6
2.2.	Die Glykoproteinhormonrezeptoren	7
2.3.	Der TSH-Rezeptor	8
	2.3.1. Die Topologie und Struktur des TSH-Rezeptors	8
	2.3.1.1. Die Ektodomäne	8
	2.3.1.2. Die Transmembrandomäne	10
	2.3.1.3. Der intrazelluläre C-Terminus	10
	2.3.2. Die Aktivierung des TSH-Rezeptors	11
	2.3.3. Signalisierungswege des TSH-Rezeptors	12
2.4.	Die physiologische Rolle des TSH-Rezeptors	13
2.5.	Die Rolle des TSH-Rezeptors bei der Pathogenese vo	on
	Schilddrüsenerkrankungen	15
	2.5.1. Natürlich vorkommende Mutationen des TSH-Rezeptors	15
	2.5.2. Autoimmunerkrankungen	15
2.6.	Das Potential kleiner Molekülliganden zur Behandlung v	on
	Fehlfunktionen des TSH-Rezeptors	16
2.7.	Kleine Molekülliganden die allosterisch am TSHR binden	17
2.8.	Zielsetzung der Arbeit	19
3	Material und Methoden	21
3.1	Materialien	21
0.1.	3.1.1 Reagenzien und Kits	21
	3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien	21
	3 1 3 Antikörper	21
	311 Enzyme	+2
	315 Software	+2
	3.1.6 Duffer und Lögungen	+2
		20

	3.1.7.	Oligonukleotide	25
	3.1.7.1.	Sequenzierprimer	25
	3.1.7.2.	Mutageneseprimer	25
	3.1.8.	Plasmide	26
	3.1.9.	Zelllinie	27
	3.1.10.	Bakterien	27
3.2.	Methoden	1	27
	3.2.1.	Molekularbiologische Methoden	27
	3.2.1.1.	Präparation von Plasmid-DNA	27
	3.2.1.2.	Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA	27
	3.2.1.3.	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	27
	3.2.1.4.	Agarosegelelektrophorese	28
	3.2.1.5.	Elution von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel	28
	3.2.1.6.	Ligation von DNA-Fragmenten	28
	3.2.1.7.	Zielgerichtete Mutagenese der TSHR-Sequenz	28
	3.2.1.8.	Transformation in elektrokompetente <i>E.coli</i> DH5α	29
	3.2.1.8.1.	Herstellung elektrokompetenter Zellen	29
	3.2.1.8.2.	Transformation	29
	3.2.1.9.	DNA-Sequenzierung	30
	3.2.1.10.	Klonierung der TSHR-Sequenz in den Vektor pcDNA3	30
	3.2.2.	Zellkulturtechniken	30
	3.2.2.1.	Kultur von HEK293-Zellen	30
	3.2.2.2.	Beschichtung von Deckgläsern und Zellkulturschalen mit	
		Poly-L-Lysin	31
	3.2.2.3.	Kotransfektion	31
	3.2.2.4.	Transiente Transfektion der TSHR-Konstrukte	31
	3.2.3.	Proteinbiochemische Techniken	32
	3.2.3.1.	Immunpräzipitation	32
	3.2.3.2.	Untersuchung des Glykosylierungsstatus	33
	3.2.3.3.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	
		(SDS-PAGE) und Western Blot	34
	3.2.4.	Messung der Oberflächenexpression der Rezeptoren mittels	
		Durchflusszytometrie	35
	3.2.5.	Pharmakologische Methoden	36

	3.2.5.1.	Messung	der	cAMP-A	Akkumula	ation	mittels
		Radioimmuno	assay				
	3.2.5.1.1.	cAMP-Akkum	ulationsme	essung	zur	Testung	des
		Antagonisten	c52				37
	3.2.5.2.	Messung der I	Inositolpha	osphat-Bild	lung		37
	3.2.6.	Statistik					
	3.2.7.	Anfertigung ho	omologer l	Molekülmo	delle		
	3.2.8.	Ballesteros-W	einstein-N	lomenklatu	ır		39
4.	Ergebnis	se					40
4.1.	Die Ausv	vahl der cha	rakterisier	ten Amin	osäurepo	ositionen	in der
	transmem	branären Bind	ungsregio	n kleiner N	Nolekülliç	ganden de	s TSH-
	Rezeptors	5					40
4.2.	Zielgerich	tete Einführu	ng von	Aminosä	ureausta	uschen	in die
	wildtypisc	he Sequenz de	s humane	n TSH-Re	zeptors		42
	4.2.1.	Die Klonierung	g der wildt	ypischen T	SHR-Se	quenz	42
	4.2.2.	Die Auswahl o	der eingefü	ührten Am	inosäure	austausch	e in die
		wildtypische T	SHR-Seq	uenz			42
	4.2.3.	Zielgerichtete	Mutage	nese de	r wildty	pischen	TSHR-
		Sequenz					44
4.3.	Die Expr	ession des	wildtypiscl	hen TSH	-Rezepto	ors und	dessen
	Mutanten	in HEK293-Zel	len				45
	4.3.1.	Die Transfekti	on der TS	HR-Konstr	ukte in ⊢	IEK293-Ze	ellen45
	4.3.2.	Die Austestu	ng von ⁻	TSHR-spe	zifischen	Antikörp	ern für
		Immunpräzipit	ation und	Western E	Blot		45
	4.3.3.	Die Zuordnun	g der Pro	oteinbande	n des T	SH-Rezep	otors im
		Western Blot r	mittels Deg	glykosylier	ung		46
4.4.	Die Funkt	ionelle Charak	terisierunę	g der Muta	anten de	s humane	n TSH-
	Rezeptors	S					47
	4.4.1.	Die Bestimm	ung der	Oberfläch	nenexpre	ssion de	r TSH-
		Rezeptoren					47
	4.4.2.	Die Messung	der cAMP	-Akkumula	tion der	TSH-Reze	ptoren48
	4.4.2.1.	Die Konzentra	tions-Wirk	kungs-Kurv	ve des w	ildtypische	en TSH-
		Rezeptors					49

	4.4.2.2.	Die cAMP-Akkumulation der TSHR-Mutanten50	
	4.4.3.	Die Messung der Inositolphosphatproduktion der TSH-	
		Rezeptoren50	
	4.4.3.1.	Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve des wildtypischen TSH-	
		Rezeptors52	
	4.4.3.2.	Die Inositolphosphatakkumulation der TSHR-Mutanten53	
4.5.	Die Testu	ung der antagonistischen Wirkung von c52 an der TSHR-	
	Mutante M	<i>I</i> 572A54	
4.6.	Struktur-F	unktions-Beziehungen innerhalb der allosterischen	
	Bindungs	region des TSH-Rezeptors55	
	4.6.1.	Die Lage konstitutiv aktivierender Mutationen und deren	
		Einfluss auf die Rezeptorfunktion55	
	4.6.2.	Die Lage konstitutiv inaktivierender Mutationen und deren	
		Einfluss auf die Rezeptorfunktion58	
F	Diekweei	on (0)	
Э. 5 1		on	
J.T.	Die Bedeutung konstitutiv aktivierender und konstitutiv inaktivierender		
5.2	Konstituti	v aktiviaranda Mutationan in dar Bindungsragion klainar	
J.Z.	Moloküllic	v aktivierende indtationen in der bindungsregion kleiner	
	5 2 1	Die konstitutiv aktiven TSHR-Mutanten M637C und M637W 70	
	5211	Aktivierungsmodell für Position 6.48	
	5212	Die Wechselwirkung der TSHR-Mutanten M637C und	
	0.2.1.2.	M637W mit kleinen Molekülliganden 74	
53	Konstituti	v inaktivierende Mutationen in der Bindungsregion kleiner	
0.0.	Moleküllic	anden des TSH-Rezentors 75.	
5.4	Die Signa	lisierung des TSH-Rezeptors über Ga	
5.5.	Die Verteilung konstitutiv aktivierender und inaktivierender Mutationen		
	in der allo	sterischen Bindungsregion des TSH-Rezeptors	
5.6.	Die Lage	kleiner Molekülliganden innerhalb der Bindungsregion	
	5.6.1.	Der Wechsel zwischen agonistischem und antagonistischem	
		Effekt kleiner Molekülliganden	
6.	Literatur		

7.	Anhang		101
7.1.	Konzentr	ations-Wirkungs-Kurven der TSHR-Mutanten	101
7.2.	Die Amin	osäuresequenz des humanen TSH-Rezeptors	104
7.3.	Abkürzur	ngsverzeichnis	105
7.4.	Abkürzur	ngen der Aminosäuren	109
7.5.	Publikatio	onen, Vorträge, Poster und Abstracts	110
	7.5.1.	Publikationen	110
	7.5.2.	Vorträge	110
	7.5.3.	Poster und Abstracts	111
7.6.	Erklärung	g	112

1. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird die transmembranäre allosterischen Bindungsregion des humanen Thyrotropinrezeptors (TSHR) funktional untersucht. Der TSHR gehört als Rhodopsin-ähnlicher G-Protein gekoppelter Rezeptor zur Untergruppe der Glykoproteinhormonrezeptoren. Er wird hauptsächlich in der Schilddrüse exprimiert, kommt aber auch in extrathyroidalem Gewebe vor. Seine endogene Aktivierung erfolgt durch die Bindung des Glykoproteinhormons Thyrotropin (TSH) an den extrazellulären Teil des Rezeptors. Die Bindung von Autoantikörpern an diese orthosterische Bindungsstelle oder das Vorkommen inaktivierender oder aktivierender Mutationen löst pathogene Mechanismen aus, die zu Hypo- oder Hyperthyreose führen. Die derzeitige Therapie dieser Erkrankungen basiert hauptsächlich auf der Beeinflussung der Schilddrüsenhormonproduktion. Diese Erkrankungen sind aber oft von Symptomen in extrathyroidalem Gewebe begleitet, wie beispielsweise bei endokriner Orbithopathie. Die Entwicklung eines kausalen Therapieansatzes, mittels allosterisch bindender Liganden am TSHR, ist eine Möglichkeit, diese Lücken zu schließen. Deshalb wurden in dieser Arbeit die funktionalen Eigenschaften von 21 TSHR-Mutanten im Bereich der allosterischen Bindungsregion im Detail charakterisiert, für die bis dahin noch keine Daten vorlagen. Als Resultat sind nun Angaben für alle auskleidenden Aminosäurereste der Bindungsregion verfügbar.

Der TSHR weist, wie fast 20% aller G-Protein gekoppelten Rezeptoren, eine Liganden unabhängige permanente G-Protein Stimulation auf. Durch die Einführung gezielter Mutationen kann diese Basalaktivität des TSH-Rezeptors herab (konstitutiv inaktivierend) oder (konstitutiv aktivierend) herauf reguliert werden. Aminosäurenaustausche, welche die Aktivität des Rezeptors verändern, geben dabei auf bestehende Struktur-Funktions-Beziehungen, Hinweise die den Signalisierungsmechanismus des Rezeptors beeinflussen.

Als Ergebnis dieser Arbeit wurden sechs konstitutiv aktivierende Mutationen und zehn konstitutiv inaktivierende Mutationen innerhalb der allosterischen Bindungsregion des TSH-Rezeptors gefunden.

Konstitutiv aktivierende Mutationen verändern die Rezeptorstruktur zu einer aktiveren Konformation hin. Insbesondere die konstitutiv aktivierenden Mutationen an

Position 637 (6.48) der Transmembranhelix 6 weisen auf eine eine zentrale Rolle im Zusammenwirken der Transmembranhelizes während des Aktivierungsprozesses hin. Bei den meisten Rhodopsin-ähnlichen G-Protein gekoppelten Rezeptoren befindet sich an Position 6.48 ein Tryptophan. Dieser Seitenkette wird im Prozess der Rezeptoraktivierung eine Schlüsselrolle zugeschrieben. In allen Glykoproteinhormonrezeptoren, und somit auch im TSHR, befindet sich an dieser Position 6.48 ein Methionin. Für das M637 (M6.48) des TSH-Rezeptors kann eine ähnliche Funktion angenommen werden, wie für das korrespondierende Tryptophan anderer G-Protein gekoppelter Rezeptoren.

Konstitutiv inaktivierende Mutationen verschieben das Gleichgewicht in Richtung einer inaktiveren Konformation. Diese Mutationen sind, entsprechend des Homologiemodells der Transmembrandomäne des TSH-Rezeptors, als Anhäufung in den Bereichen zwischen den Transmembranhelizes 3, 4, 5 und der extrazellulären Schleife 2 (Cluster I) sowie den Transmembranhelizes 1, 2 und 7 (Cluster II) zu finden. Ihre Ansammlung in diesen Gebieten weist auf die Bedeutung dieser Bereiche bei der Aufrechterhaltung des basal aktiven Zustandes hin. Die räumliche Orientierung der einzelnen Aminosäureseitenketten an diesen Positionen macht deutlich, Zustand dass der basal aktive des TSH-Rezeptors durch Seitenkettenwechselwirkungen innerhalb der Cluster aufrecht erhalten wird. Die Störung dieser Wechselwirkungen durch eine eingeführte Mutation lässt den Rezeptor in eine inaktivere Konformation übergehen, die sich in der Reduktion der Basalaktivität ausdrückt.

Es konnte gezeigt werden, dass sich im Bereich der allosterischen Bindungsregion eine hohe Dichte an signalisierungssensitiven Aminosäureresten befindet. Das mit diesen Untersuchungen gewonnene tiefere Verständnis über die molekularen Mechanismen in diesem Bereich, ist die Grundlage für die Erklärung und für die Vorhersage der Wirkungsweise kleiner Molekülliganden. So war es in dieser Arbeit möglich den antagonistischen Effekt des allosterischen Liganden c52, durch eine gezielte Mutation der Bindungsregion des TSH-Rezeptors, in einen agonistischen Effekt umzuwandeln. Die Lage und Orientierung dieses Liganden bestätigt die vorhergesagten Wechselwirkungsmodelle und zeigt, dass die korrespondierenden wildtypischen Aminosäuren konstitutiv aktivierender Mutationen und konstitutiv inaktivierender Mutationen potentielle Interaktionspunkte für allosterische Agonisten bzw. Antagonisten sind.

Die sich daraus ergebenden pharmakophoren Muster, für eine intramolekulare Stabilisierung oder Aktivierung des Rezeptors, können Ansatzpunkte zukünftiger Studien sein. Mit Kenntnis der sensitiven Signalisierungseigenschaften und des pharmakologischen Potentials dieser transmembranären Region sind neue über Modulationsmöglichkeiten im Bereich der allosterischen Hypothesen Bindungsregion des **TSH-Rezeptors** Gemeinsam mit zu erwarten. bekannter allosterischer Interaktionsmustern bisher Liganden bilden diese Ergebnisse, als komplementäres Abbild der Bindungsregion, eine deutlich verbesserte Vorraussetzung für die Entwicklung und Verfeinerung allosterischer Antagonisten und Agonisten, um deren therapeutischer Anwendung zu ermöglichen.

Des Weiteren sind diese Ergebnisse nicht nur für die Glykoproteinhormonrezeptoren von Interesse. Sie sind auch auf andere G-Protein gekoppelte Rezeptoren übertragbar, denn dieser konservierte Bereich der allosterischen Bindungsregion ist in verschiedenen Rezeptoren von Liganden besetzt.

1.1. Summary

This study focuses on the functional characterization of the transmembranal allosteric binding region of the human thyroid stimulating hormone receptor (TSHR). The TSHR is a rhodopsin-like G-protein coupled receptor (GPCR) and belongs to the subclass of the glycoprotein hormone receptors. It is endogenously activated by the thyroid stimulating hormone (TSH, thyrotropin), which binds to the extracellular region of the receptor. The TSHR is mostly expressed in the thyroid gland, but it was also found in multiple extrathyroidal tissues. Antibodies directed against TSHR (Graves) disease) and naturally occurring mutations in TSHR are determinants of several thyroid malfunctions, which are characterized by a hyper- or hypofunctioning thyroid gland. The current therapy is confined to influence thyroid function. However, very often these diseases are accompanied by symptoms caused in other tissues, for instance in the case of endocrine orbitopathy. A potential approach for treatment of Graves' disease or endocrine orbitopathy could be the direct suppression of the TSHR activation by low molecular weight (LMW) drug like molecules. In contrast to TSH or activating antibodies, that bind to the TSHR extracellular region, LMW synthetic ligands bind allosterically into a binding pocket within the transmembrane domain.

Therefore we want to understand the intramolecular events that occur in the proximity of the allosteric binding pocket, in order to support the development of new LMW ligands. Guided by homology modelling 21 amino acid residues surrounding the allosteric binding region were selected for site-directed mutagenesis. These mutants were characterized in terms of cell-surface expression, basal and thyrotropin-induced cAMP and IP accumulation. As a result there are now functional data available for all amino acids covering the binding pocket.

We observed two interesting types of signalling-sensitive TSHR mutations, ten constitutively inactivating mutations and six constitutely activating mutations. As already known, the TSHR exhibits an elevated level of cAMP accumulation in the basal state (in absence of TSH). Mutations can lead to a decrease (constitutively inactivation) or an increase (constitutively activation) of the receptor's basal activity. These side-chain alterations, modifying the activity state of the receptor, provide evidence for structure-function-relationships concerning the signalling mechanism.

Constitutively activating mutations induce a shift towards the active receptor conformation and mark potential trigger points for receptor activation by LMW agonists. Especially the constitutively activating mutations at position 637 (6.48) at transmembrane helix (TMH) 6 seem to indicate a key role of this residue during the activation process. In most rhodopsin-like GPCRs there is a tryptophan located at position 6.48, which is potentially involved in the activation process. Nevertheless, in case of glycoprotein hormone receptors this position is occupied by a methionin. It appears to function similar to the corresponding tryptophan in other GPCRs.

Constitutive inactivating mutations alter the receptor conformation towards a more inactive state. Therefore they are preferred contact points where potential inactivating molecules can block receptor activation. According to our homology model these residues are flanking the binding pocket in two spatial clusters and their amino acid side chains are interacting with each other. Based on the decreased basal activity of the mutants we hypothesize, that the interactions of their wild-type amino acids are important to maintain the basally active TSHR conformation.

We could show, that there is a high density of signalling-sensitive amino acids surrounding the allosteric binding region of the TSHR. This gained knowledge about the molecular mechanisms in this area is the basis for the explanation and prediction of the effectiveness of small molecules. In this study we showed the functional switch of the allosteric antagonist c52 to an agonistic acting molecule by site-directed mutagenesis of the binding region. The position and orientation of this molecule supports the predicted interplay between the ligand and the amino acid side chains. It provides evidence for the notion, that the corresponding wild-type amino acid residues of constitutive activating or inactivating mutations are potential interaction points for allosteric agonists or antagonists.

The resulting pharmacophoric pattern forms a basis for future studies, to construct new hypothesis relevant for the development and refinement of allosteric ligands. Altogether, with the interaction models of already known small molecules, it might facilitate new therapeutic approaches for treating diseases caused by pathogenic TSHR action. Our findings are also of general importance for GPCRs, as this transmembrane binding site appears to be evolutionarily retained and is occupied by various endogenous ligands.

2. Einleitung

2.1. Der Thyrotropinrezeptor gehört als Glykoproteinhormonrezeptor zur Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren

Der Thyrotropinrezeptor (TSHR), auch als Rezeptor des Thyroidea stimulierenden Hormons (TSH) bezeichnet, ist ein Mitglied der Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR), welche als größte Rezeptorfamilie einen erheblichen Anteil an der transmembranären Signaltransduktion in eukaryotischen Zellen hat (Gudermann T, 1995; Nagayama & Rapoport, 1992). Diese kann in fünf Hauptklassen unterteilt werden: Rhodopsin, Sekretin, Glutamat, Adhäsionsrezeptoren und *Frizzled-taste-2* (Fredriksson R, 2008). Der TSHR gehört als Glykoproteinhormonrezeptor (GPHR) der Familie der Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren an.

Das Ligandenspektrum G-Protein gekoppelter Rezeptoren reicht von biogenen Aminen, Peptiden, Glykoproteinen, Lipiden, Nukleotiden, bis hin zu Ionen und Photonen (Schwartz TW, 2006). Trotz dieser Vielfalt sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren durch zwei grundlegende gemeinsame Merkmale gekennzeichnet. 1. Sie führen zur Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen. 2. Sie besitzen einen ähnlichen strukturellen Aufbau aus sieben transmembranären α -Helizes, verbunden durch intra- und extrazelluläre Schleifen, einer extrazellulären N-terminalen Domäne und einer intrazellulären C-terminalen Domäne (Pierce KL, 2002; Shacham S, 2001; Bockaert & Pin, 1999).

Ihre Aufgabe ist die Vermittlung extrazellulärer Signale in das Zellinnere. Voraussetzung dafür ist die spezifische Interaktion der Liganden mit ihrem Rezeptor. Diese Interaktion aktiviert den Rezeptor, wodurch es zur Konformationsänderung des Rezeptors und zur Propagierung des Aktivierungssignals in den Zellinnenraum kommt. Als Resultat kommt es zur Aktivierung von G-Proteinen, indem GDP durch GTP ausgetauscht wird. Der Vielzahl von G-Protein gekoppelten Rezeptoren und ihrer Liganden steht dabei nach Aktivierung nur eine limitierte Anzahl von vier G-Protein-Familien zur Verfügung (G_s, G_{i/o}, G_{g/11}, G_{12/13}) (Simon MI, 1991).

Zahlreiche Krankheitsbilder beruhen auf Fehlfunktionen G-Protein gekoppelter Rezeptoren. Deshalb sind viele G-Protein gekoppelte Rezeptoren Angriffspunkte von Medikamenten. Das betrifft schätzungsweise mehr als 60 % aller verordneten Arzneimittel (Schöneberg T, 2004).

2.2. Die Glykoproteinhormonrezeptoren

Zu den Glykoproteinhormonrezeptoren zählen der Thyrotropinrezeptor, der Follitropinrezeptor (FSHR), der Rezeptor für das luteinisierende Hormon und Choriogonadotropin (LHCGR) und die LG-Rezeptoren (*Leucin-rich repeat-containing G protein-coupled receptor*) (Kristiansen K, 2004; Ascoli M, 2002; Dias & Van Roey, 2001; Simoni M, 1997; Szkudlinski MW, 2002; Vassart G, 2004).



Abbildung 2.1: Schema der Struktur der Glykoproteinhormonrezeptoren

Die Ektodomäne setzt sich aus der Cysteinbox 1, 10 Leucin-Rich-Repeats, der Cysteinbox 2, der Cysteinbox 2/3-Verknüpfung (Cb2/3-Verknüpfung) und der Cysteinbox 3 zusammen. Die Transmembrandomäne enthält sieben transmembranäre Helizes (TMHs) die über extrazelluläre und intrazelluläre Schleifen (EZS; IZS) miteinander verbunden sind. Intrazellulär schließt sich eine potentielle 8. α-Helix an.

Eine Besonderheit der Glykoproteinhormonrezeptoren ist ihre große N-terminale extrazelluläre Domäne, bestehend aus 350 bis 500 Aminosäureresten, die 10

Leucine-rich repeats enthält (Ascoli M, 2002; Dias JA & Van Roey P, 2001; Simoni M, 1997; Szkudlinski MW, 2002; Vassart G, 2004) (Abbildung 2.1).

Die Ektodomänen von TSHR, FSHR und LHCGR weisen eine Sequenzidentität von etwa 40% auf, wogegen die Sequenz ihrer Serpentindomänen zu 70 % identisch ist (Szkudlinski MW, 2002, Vassart G, 2004, Vassart & Dumont, 1992) (Abbildung 2.2).



Abbildung 2.2: Sequenzhomologie zwischen den A) Ektodomänen und B) Transmembrandomänen der Glykoproteinhormonrezeptoren (nach Vassart G, 2004)

2.3. Der TSH-Rezeptor

2.3.1. Die Topologie und Struktur des TSH-Rezeptors

Das TSHR-Protein besteht aus 764 Aminosäuren und kann strukturell eingeteilt werden in eine N-terminale Ektodomäne (Aminosäurereste 1 bis 410), eine transmembranäre Serpentindomäne mit sieben Transmembranhelizes, drei extrazellulären Schleifen und drei intrazellulären Schleifen (Aminosäurereste 411 bis 680) und in eine C-terminale intrazelluläre Domäne (Aminosäurereste 681 bis 764) (Szkudlinski MW, 2002) (Abbildung 2.3). Für einen Teil der extrazellulären Domäne ist eine Kristallstruktur verfügbar (Sanders J, 2007). Für die Transmembrandomäne wurde in dieser Arbeit auf homologe Computermodelle zurück gegriffen (Kleinau G, 2008b; Kleinau & Haas, 2010).

2.3.1.1. Die Ektodomäne

Die Ektodomäne wird in fünf weitere strukturelle Komponenten unterteilt: (1.) die Cysteinbox 1, (2.) ein *Leucin-rich repeat*-Motiv (LRR) mit 10 Wiederholungen, (3.) die Cysteinbox 2, (4.) die Cysteinbox 2/3-Verknüpfung und (5.) die Cysteinbox 3 (Loosfelt H, 1992; Kleinau & Krause, 2009). Der Bereich aus den Komponenten (3.) bis (5.) wird als Hinge-Region bezeichnet.



Abbildung 2.3: Schema der Struktur des TSH-Rezeptors

Die Ektodomäne setzt sich aus der Cysteinbox 1, 10 Leucin-Rich-Repeats, der Cysteinbox 2, der Cysteinbox 2/3-Verknüpfung (Cb2/3-Verknüpfung) und der Cysteinbox 3 zusammen. Sie enthält 6 potentielle N-Glykosylierungsstellen und einen Sulfatrest. Über Proteaseschnittstellen kommt es zur Trennung in je eine Untereinheit A und B, die über Disulfidbrücken verbunden bleiben. Die Transmembrandomäne enthält 7 transmembranäre Helizes (TMH) die über extrazelluläre und intrazelluläre Schleifen (EZS; IZS) miteinander verknüpft sind. Intrazellulär schließt sich eine potentielle 8. α-Helix und ein Palmitoylierungsmotiv an.

Als Besonderheit innerhalb der Glykoproteinhormonrezeptoren wurden beim TSHR zwei Proteasespaltstellen beobachtet, die zur Abspaltung eines Peptidfragmentes (C Peptid) im Bereich der Cysteinbox 2/3-Verknüpfung führen (Tanaka K, 1999). Dadurch entstehen zwei Untereinheiten, A und B, die über Disulfidbrücken zwischen den Cysteinboxen 2 und 3 verbunden sind (Misrahi & Milgrom, 1997; Chen CR, 2006).

30 bis 40% der molekularen Masse der Ektodomäne sind auf die Anfügung von N-Glykosylierungen zurückzuführen. Insgesamt sind sechs N-Glykosylierungsmotive an den Positionen N77, N99, N113, N177, N198 und N302 bekannt (Rapoport B, 1996; Nagayama Y, 2000). Des Weiteren wird innerhalb der Cysteinbox 3 am Y385 ein Sulfatrest angefügt (Costagliola S, 2002). Beide posttranslationalen Modifikationen bilden die Voraussetzung für die korrekte Oberflächenexpression und die einwandfreie Signalisierungsfähigkeit des Rezeptors (Nagayama Y, 1998; Costagliola S, 2002).

2.3.1.2. Die Transmembrandomäne

Die transmembranären Domänen der Glykoproteinhormonrezeptoren besitzen eine hohe Sequenzhomologie (Vassart G, 2004). Die größte Variabilität findet sich dabei in den extrazellulären und intrazellulären Schleifen. Da noch keine Kristallstruktur für die Transmembrandomäne des TSH-Rezeptors verfügbar ist, wurden auf Basis der Strukturen von bovinem Rhodopsin (inaktive Konformation) und Opsin (aktivierte Konformation) Homologiemodelle entwickelt (Kleinau & Haas, 2010; Haas & Kleinau, 2011). Diese dienen als Ausgangspunkt zur Vorhersage potentieller Interaktionen zwischen den Transmembranhelizes und ermöglichen somit einen Einblick in die Anordnung des Helixbündels und dessen strukturelle Veränderung während der Rezeptoraktivierung. In Verbindung mit experimentellen Studien sind diese Modelle ein Hilfsmittel zur Interpretation und Visualisierung der Ergebnisse.

Als Rhodopsin-ähnlicher G-Protein gekoppelter Rezeptor besitzt der TSH-Rezeptor neben der typischen heptahelikalen Struktur auch verschiedene bekannte Sequenzmotive. Dazu gehört das NPXXY-Motiv (N7.49 bzw. N674 beim TSHR) der TMH7 sowie das [D/E]R[Y/W]-Motiv am Übergang zwischen TMH3 und der intrazellulären Schleife 2. Beide Sequenzenmotive stehen im Zusammenhang mit dem Aktivierungsmechanismus des Rezeptors oder der Übertragung dieses Signals auf die G-Proteine (Ahuja S, 2009; Rovati GE, 2007).

Ein weiterer in G-Protein gekoppelten Rezeptoren hochkonservierter Aminosäurerest ist das Tryptophan an Position 6.48. Diesem wird eine zentrale Bedeutung während der transmembranären Aktivierungsweiterleitung zugeschrieben. (Schwartz TW, 2006). Im TSHR, ebenso wie in den anderen Glykoproteinhormonrezeptoren, befindet sich hier jedoch ein Methionin.

2.3.1.3. Der intrazelluläre C-Terminus

Kurz nach der 7. Transmembranhelix schließt sich eine potentielle 8. intrazelluläre Helix an (Aminosäurereste 676 bis 694). Auf diese folgt ein Palmitoylierungsmotiv am Cystein 699 (Tanaka K, 1998).

2.3.2. Die Aktivierung des TSH-Rezeptors

Die Bindung des natürlichen Liganden TSH an die extrazelluläre Domäne des TSH-Rezeptors löst ein Aktivierungssignal aus, welches über die extrazellulären Schleifen und die Transmembranhelizes bis an die intrazellulären Bereiche weitergegeben wird. Das führt zur Ausbildung einer aktiven Rezeptorstruktur und ermöglicht intrazellulär die Aktivierung von G-Proteinen.

Die endogenen Liganden der Glykoproteinhormonrezeptoren sind die ca. 30 kDA großen Glykoproteinhormone Thyrotropin (TSH), Lutropin (LH), Choriogonadotropin (CG) und Follitropin (FSH). Sie bestehen aus einer gemeinsamen α-Untereinheit und je einer spezifischen β-Untereinheit (Stockell HA, 1992). Die Sequenzhomologie zwischen den Hormonen TSH, LH und FSH liegt bei 40%, die zwischen LH und CG bei 80% (Costagiola S, 2005). Bindung und Spezifität dieser Liganden an die Glykoproteinhormonrezeptoren werden über die primäre Bindung der Hormone an die jeweilige LRR-Domäne vermittelt (Braun T, 1991; Cornelis S, 2001). Der Beitrag der Hinge-Region, als Verbindungsstück zwischen LRR-Domäne und TMH1, ist auf Grund der unbekannten dreidimensionalen Struktur nicht vollständig geklärt. Sie ist aber ebenfalls in den Prozess der Hormonbindung und Signalübermittlung involviert (Mizutori Y, 2008; Chen CR, 2011).

Über die extrazellulären wird das Aktivierungssignal Schleifen an die transmembranären Helizes weitergegeben (Kleinau G, 2008b). Die Transmembranregion ist der funktionell am besten charakterisierte Bereich der Glykoproteinhormonrezeptoren. Die komplexe Anordnung der Transmembranhelizes wird durch ein Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatischen Wechselwirkungen und Van-der Waals-Kräften vermittelt. Der TSHR ist bereits im Grundzustand basal aktiv. Das heißt, bereits ohne Ligandenbindung ist die Produktion von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) geringfügig angeregt (Cetani F, 1996). Diese Tatsache spricht für nur schwach ausgeprägte intramolekulare Wechselwirkungen, die den inaktiven Zustand stabilisieren. Dem entsprechend ist es leicht diese Interaktionen, beispielsweise durch Mutationen, zu stören und eine Erhöhung (konstitutive Aktivierung) oder eine Senkung (konstitutive Inaktivierung) der Basalaktivität des Rezeptors hervorzurufen. Das wird von dem Sachverhalt unterstützt, dass die meisten konstitutiv aktivierenden Mutationen innerhalb der Transmembranhelizes gefunden wurden (Datenbank: www.ssfagphr.de; Kleinau G, 2007b). Es sind mehr als 40 natürlich vorkommende konstitutiv aktivierende Mutationen im Bereich der Transmembranhelizes bekannt. Besonders fällt auf, dass ein Großteil der aktivierenden *in vivo* Mutationen auf die TMH6 entfallen, aber bislang noch keine in der TMH4 gefunden wurde. Die TMH6 spielt offensichtlich eine zentrale Rolle bei der Übertragung von Konformationsänderungen auf andere Regionen des TSH-Rezeptors (Neumann S, 2001; Kleinau G, 2011).

Um Einblick in die Aktivierungsprozesse innerhalb der Transmembrandomäne des TSH-Rezeptors zu erhalten, ist die Betrachtung bekannter Mechanismen innerhalb der gleichen Rezeptorfamilie hilfreich. Zur Zeit sind dreidimensionale Strukturen der Transmembrandomänen von Rhodopsin, Opsin, dem β-Adrenorezeptor und dem Adenosinrezeptor bekannt (Palczewski K, 2000; Park JH, 2008; Rasmussen SG, 2007; Warne A, 2008; Jaakola VP, 2008; Choe HW, 2011; Rasmussen SGF, 2011; Standfuss J, 2011). Einige Strukturen davon zeigen einen G-Protein gekoppelten Rezeptor im inaktiven Zustand, andere geben eine aktivierte Struktur wider.

Der Vergleich dieser Strukturen zeigt, dass der Hauptunterschied zwischen inaktiver und aktiver Struktur in einer relativ starken Neigung der TMH5 und TMH6, sowie einer dem gegenüber kleineren Bewegung der TMH7 zur intrazellulären Seite hin, liegt (Standfuss J, 2011). Diese Bewegungen öffnen eine Spalte zur zytoplasmatischen Seite, die als Bindungsstelle für G-Proteine fungiert. Das ist deutlich erkennbar im Kristallkomplex von Opsin mit dem C-terminalen Peptidfragment des G_a-Proteins (Scheerer P, 2008).

Die Summe aller zur Aktivierung beitragenden Strukturveränderungen bewirkt die vollständige Aktivität des TSH-Rezeptors. Als Resultat kommt es zum Austausch von GDP gegen GTP in den gebundenen G_{α} -Proteinen und somit zur Weitergabe des Aktivierungssignals innerhalb der Signalkaskade.

2.3.3. Signalisierungswege des TSH-Rezeptors

Der TSHR interagiert mit den G-Protein-Familien G_s , $G_{q/11}$, G_i und $G_{12/13}$ (Laugwitz KL, 1996; Allgeier A, 1997). Eine biologische Bedeutung konnte bislang nur den Signalisierungswegen über G_s und $G_{q/11}$ zugeordnet werden (Kero J, 2007; Grasberger H, 2007). Der Hauptsignalisierungsweg des TSH-Rezeptors verläuft über die Aktivierung von G_s und erst nach 5- bis 10-fach stärkerer Stimulation durch TSH wird auch $G_{q/11}$ angeregt (Laurent E, 1987; Allgeier A, 1994).

Die Aktivierung von G_s führt über die Stimulation der Adenylylcyclase zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels und nachfolgend zur Anregung der Proteinkinase A. Dieser Signalweg ist an der Regulation der Differenzierung und Proliferation der follikulären Schilddrüsenzellen beteiligt. Er hat ebenfalls stimulierende Wirkung auf die Iodaufnahmefähigkeit und Hormonsekretion der Schilddrüsenzellen (Vassart G, 1992; Dumont JE, 1992).

Die Stimulation von $G_{q/11}$ führt zur Anregung der Phospholipase C und dem zufolge zu einer Erhöhung der Konzentrationen von Diacylglycerol und Inositol-1,4,5triphosphat. Die funktionelle Bedeutung des Phospholipase C-Signalweges liegt in seiner anregenden Wirkung auf die Produktion und Iodierung der Schilddrüsenhormone und des Vorläuferproteins Thyroglobulin (Kero J, 2007).

Es gibt ebenfalls Hinweise darauf, dass der TSHR nach TSH-Stimulation cAMP unabhängig auch über die Aktivierung von p42-MAPK direkt die MAPK-Kaskade aktivieren kann (Saunier B, 1995; Tournier C, 1995). Gleichfalls bestehen Anhaltspunkte, dass der TSHR aktivierend auf die Transkriptionsfaktoren AP1 und NF κ B wirkt (Voigt C, 2007).

2.4. Die physiologische Rolle des TSH-Rezeptors

Der TSHR wird in den Follikelzellen der Schilddrüse exprimiert, kommt aber auch in vielen anderen Zellen und Geweben vor. Dazu zählen beispielsweise Lymphozyten, Thymus, Hypophyse, Hoden, Niere, Gehirn, Knochen, Fettzellen und Fibroblasten (Davies TF, 2005). Die Aufgabe des TSH-Rezeptors in den extrathyroidalen Geweben ist noch weitgehend ungeklärt. Vermutlich ist er an der Regulation einer Vielzahl intrazellulärer Prozesse beteiligt. So wird ein Zusammenhang mit der Beeinflussung von Lipolyse und Osteoklastenaktivität diskutiert (Vizek K, 1979; Abe E, 2003).

Der TSHR spielt eine zentrale Rolle in der Funktion der Schilddrüse. Die Schilddrüse selbst ist Teil der Hypothalamus-Hypophysen-Achse (Abbildung 2.4). Das vom Hypothalamus ausgeschüttete Tripeptid Thyreoliberin (TRH) bewirkt in der Hypophyse die Freisetzung des Glykoproteinhormons TSH. TSH bindet an den TSHR der Schilddrüsenzellen und ist hauptsächlich für die Ausschüttung der Schilddrüsenhormone Triiodthyronin (T₃) und Thyroxin (T₄) verantwortlich (Kopp P, 2001). Um einen gleichbleibenden Schilddrüsenhormonspiegel zu gewährleisten,

wird deren erhöhte Konzentration in der Hypophyse wahrgenommen und führt dort zu einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber TRH. Dieser negative Rückkopplungsmechanismus bewirkt eine gesenkte Ausschüttung von TSH und damit eine nachlassende Synthese von T_3 und T_4 (Lezoualc'h F, 1992).



Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse Regulation der Schilddrüsenfunktion durch TRH, TSH, T_3 und T_4

TSH kontrolliert als Hauptregulator der Schilddrüsenaktivität maßgeblich die Funktion und den Stoffwechsel der Schilddrüsenzellen (Postiglione MP, 2002). Es regelt die mRNA-Expression schilddrüsenspezifischer Gene, wie die von Thyroglobulin, der Thyreoperoxidase oder dem Natrium-Iod-Symporter. Gleichzeitig stimuliert es das Wachstum der Follikelzellen sowie die Synthese und Freisetzung von T₃ und T₄ (Kimura T, 2001, Marians RC, 2002).

Die Schilddrüsenhormone bewirken in den verschiedensten Zielgeweben eine Veränderung der Genexpression und eine Steigerung der Stoffwechselaktivität.

2.5. Die Rolle des TSH-Rezeptors bei der Pathogenese von Schilddrüsenerkrankungen

2.5.1. Natürlich vorkommende Mutationen des TSH-Rezeptors

Der TSHR ist wesentlich empfänglicher für aktivierende oder inaktivierende Mutationen, als die anderen Glykoproteinhormonrezeptoren oder auch viele andere G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Bislang sind für den TSHR 53 konstitutiv aktivierende und 23 konstitutiv inaktivierende Mutationen bekannt. Im Vergleich dazu wurden für den FSHR 7 aktivierende und 9 inaktivierende und für den LHCGR 14 aktivierende und 13 inaktivierende Mutationen beschrieben (Datenbank: www.ssfagphr.de; Kleinau G, 2010b).

Der Hauptteil der konstitutiv aktivierenden Mutationen des TSH-Rezeptors befindet sich in der Transmembrandomäne mit einer Häufung in der TMH6. Die Verteilung inaktivierender Mutationen zeigt kein auffallendes Muster.

Es werden zwei Arten natürlicher konstitutiv aktivierender Mutationen unterschieden: somatische Mutationen und Keimbahnmutationen. Somatische Mutationen treten in einzelnen Zellen auf. Die hormonunabhängige Rezeptoraktivität führt zur klonalen Expansion der betroffenen Zelle, die ununterbrochen funktionell aktiv ist, was zur Hyperthyreose führt. Keimbahnmutationen betreffen alle Zellen des Körpers. Sie führen ebenfalls zu einer Schilddrüsenüberfunktion und zu einer erblich bedingten Hyperplasie der Schilddrüse (Kopp P, 2001).

Zur phänotypischen Ausprägung inaktivierender Mutationen ist oft die Mutation beider Allele notwendig. Patienten, bei denen beide Allele betroffen sind, leiden schwerer an Hypothyreose, als Patienten mit nur einem betroffenen Allel (Davies TF, 2005). Durch die TSHR bedingte Resistenz gegenüber TSH ist die Größe der Schilddrüse normal bis verkleinert. Der TSH-Spiegel im Serum ist jedoch hoch, da die Konzentration der Schilddrüsenhormone, auf Grund mangelnder Synthese und Freisetzung, verringert ist (Kopp P, 2002).

2.5.2. Autoimmunerkrankungen

Der TSHR ist dafür bekannt, als potentes Autoantigen zu wirken. Es gibt verschiedene Faktoren, die die Ausbildung dieser Autoimmunreaktionen unterstützen. Dabei werden externe und interne Faktoren, sowie die genetische

Prädisposition, unterschieden. Externe Faktoren sind zum Beispiel Infektionen, Verletzungen, Stress, Iodaufnahme oder radioaktive Strahlung. Zu den internen Faktoren gehören Autoantikörper gegen die Schilddrüse, Sexualhormone und Schwangerschaft. Die genetische Prädisposition schließt Gene mit ein, die an Immunreaktionen beteiligt sind, aber auch Gene die mitverantwortlich für die Expression des TSH-Rezeptors sind. Die Wirkung der gebildeten Autoantikörper ist, je nach Bindungsstelle an den TSHR, unterschiedlich. Es gibt aktivierende, blockierende und neutrale Antikörper (Davies TF, 2005).

Aktivierende Antikörper sind für die Ausprägung der Schilddrüsenüberfunktion bei Morbus Basedow verantwortlich. Hashimoto Thyreoditis wird durch blockierende TSHR-Antikörper hervorgerufen (Noh JY, 2000). Oft inhibieren Autoantikörper gleichzeitig die Bindung des natürlichen Liganden TSH, wenn sich ihre Bindungsregion innerhalb der LRR-Domäne befindet. Neutrale Antikörper erkennen einen Bereich innerhalb des C-Peptids und haben deshalb keinen Einfluss auf die Aktivierung oder Blockierung des TSH-Rezeptors (Davies TF, 2005).

Da der TSHR auch in Geweben außerhalb der Schilddrüse exprimiert wird, können TSHR spezifische Autoantikörper hier ebenfalls zu Immunreaktionen führen. Beispielsweise kann es in vielen Fällen von Morbus Basedow zur Ausprägung einer endokrinen Orbitopathie kommen, womit Hashimoto Thyreoditis nur zu 10% assoziiert ist (Wall JR, 2010).

2.6. Das Potential kleiner Molekülliganden zur Behandlung von Fehlfunktionen des TSH-Rezeptors

In der Gesamtheit der Schilddrüsenerkrankungen, die mit Schilddrüsenvergrößerung (Struma), mit Hypo- und Hyperthyreose, mit entzündlichen Veränderungen oder Autoimmunerkrankungen verbunden sind, ist insbesondere bei Morbus Basedow und bei sekundärer Hypothyreose die Signalübertragung über den TSHR entscheidend. Bei Morbus Basedow werden Autoantikörper gebildet, die den TSHR dauerhaft stimulieren (LATS: *long acting thyroid stimulator*). Dadurch kommt es zur Hyperthyreose, mit gesteigerter Schilddrüsenhormonproduktion und deren sekundären Krankheitserscheinungen. Zur Therapie werden Thiourazilderivate eingesetzt, welche die Synthese der Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 senken und auf ein normales Maß regulieren. Diese Substanzen haben aber keinen Einfluss auf

Symptome in extrathyroidalen Geweben. So ist etwa bei endokriner Orbitopathie keine kausale Therapie möglich. Hier wird symptomatisch behandelt mit Tränenersatzflüssigkeit, Kortikosteroiden oder operativ. Allosterische Liganden des TSH-Rezeptors, die direkt an der Krankheitsursache angreifen, könnten diese therapeutische Lücke schließen.

Die sekundäre Hypothyreose wird durch die Störung der TSH-Produktion in der Hypophyse und der damit verbundenen mangelnden Stimulation des TSH-Rezeptors hervorgerufen. Die Applikation von allosterischen TSHR-Agonisten wäre hier eine Alternative zur Substitution mit rekombinantem TSH.

Beim Auftreten aktivierender oder inaktivierender Mutationen des TSH-Rezeptors ist der Einsatz von kleinen Molekülen mit invers agonistischer beziehungsweise agonistischer Wirkung denkbar. Es gibt bereits erste Hinweise darauf, dass die Applikation inverser Agonisten die konstitutive Aktivität pathogener TSHR-Mutanten herabsetzen kann und die Anwendung von Antagonisten die Aktivierung des Rezeptors durch TSHR-Autoantikörper inhibiert (Neumann S, 2010; Neumann S, 2008).

2.7. Kleine Molekülliganden die allosterisch am TSHR binden

Es ist bekannt, dass kleine Liganden wie Retinal, Katecholamine oder kleine Peptide ihre Bindungsstelle im Inneren der Transmembrandomäne von Rhodopsin oder anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren haben (Tunaru S, 2005; Stenkamp RE, 2005; Gershengorn MC, 2001).

Auch für die Glykoproteinhormonrezeptoren konnte eine allosterische Bindungsregion für kleine Moleküle in der Transmembrandomäne abgeleitet werden. Auf Grundlage von Dockingstudien, basierend auf dreidimensionalen Modellen des TSH-Rezeptors und LHCG-Rezeptors, wurde diese Bindungsstelle innerhalb der Transmembrandomäne nahe der extrazellulären Schleife 2 lokalisiert (Jäschke H, 2006) (Abbildung 2.5). Diese Aussage wird durch experimentelle Befunde unterstützt. So ist ein Agonist des FSH-Rezeptors nicht in der Lage gebundenes FSH zu verdrängen (van Straten NC, 2005), und ein Agonist des LHCG-Rezeptors (org41841) konkurriert nicht mit radioaktiv markiertem LH um die orthosterische Bindungsstelle an der Ektodomäne (van Straten NC, 2002).



Abbildung 2.5: Die orthosterische und die allosterische Bindungsstelle am TSH-Rezeptor (Kleinau & Haas, 2010) Der TSHR weist die generelle Struktur Rhodopsin-ähnlicher G-Protein gekoppelter Rezeptoren auf. Er besitzt eine große Ektodomäne von ca. 400 Aminosäuren, die in die Leucin-rich-repeat-Domäne (LRRD) und die Hinge-Region unterteilt wird. Beide Bereiche sind notwendig für die selektive Bindung des Hormons TSH, hier dargestellt mit seinen beiden Untereinheiten α und β . Die allosterische Bindungsregion kleiner Moleküle befindet sich innerhalb der Transmembranregion zur extrazellulären Seite hin gelegen. Die Ausdehnung ihrer Oberfläche ist gelb dargestellt. Gezeigt ist die Position des gebundenen Agonisten compound 2 (Neumann S, 2009).

Daneben sind auch für den TSHR allosterische Liganden bekannt, welche aber größtenteils unspezifisch mit anderen Glykoproteinhormonrezeptoren interagieren und nur eine geringer Affinität aufweisen.

Im Jahr 2006 wurde der erste allosterische Ligand des TSH-Rezeptors, org41841, publiziert (Jäschke H, 2006). Er war ursprünglich als Agonist des LHCG-Rezeptors

entwickelt worden (van Straten NC, 2002). Org41841 aktiviert mit hoher Affinität den LHCGR. Es agiert am TSHR als Partialagonist mit sehr schwacher Affinität. Durch Mutationen im Bereich der allosterischen Bindungsregion des TSH-Rezeptors war es hier bereits gelungen die Affinität, und auch die maximale Stimulation, durch diesen Liganden zu verbessern (Jäschke H, 2006).

Als Derivat von org41841 wirkt Compound 52 (c52) als schwacher Partialantagonist des TSH-Rezeptors, welcher ebenfalls die Aktivität des LHCG-Rezeptors beeinflussen kann (Neumann S, 2008).

Auch die allosterischen Liganden Compound 1 (c1) und Compound 2 (c2) sind strukturell miteinander verwandt. Beide interagieren selektiv mit dem TSH-Rezeptor. Der Agonist c2 zeichnet sich durch seine hohe Affinität aus (Neumann S, 2009), wohingegen der inverse Agonist c1 nur schwach affin ist (Neumann S, 2010).

In Hinblick auf eine potentielle therapeutische Anwendung allosterischer Liganden des TSH-Rezeptors ist eine deutliche Verbesserung ihrer Spezifität und Affinität notwendig. Insbesondere ist dabei die Entwicklung eines potenten Antagonisten von Interesse.

2.8. Zielsetzung der Arbeit

Zusammen mit seinem natürlichen Liganden TSH ist der TSHR ein Schlüsselprotein in der Regulation der Schilddrüsenaktivität. Er ist auch verantwortlich für die Ausbildung pathogener Fehlfunktionen, wie Schilddrüsenunter- oder Überfunktion. Autoantikörper gegen den TSHR oder natürlich vorkommende Mutationen des Rezeptors sind ursächlich für verschiedenste Krankheitsbilder, zum Beispiel Morbus Basedow oder Endokrine Orbitopathie. Die Therapie dieser Erkrankungen setzt jedoch nicht kausal am TSHR an. Die Entwicklung von Liganden des TSH-Rezeptors mit agonistischer, antagonistischer oder invers agonistischer Wirkung würde dem entsprechend therapeutische Lücken schließen.

Seit kurzem ist bekannt, dass kleine Molekülliganden allosterisch im Inneren der Transmembrandomäne des TSH-Rezeptors binden können und dort zur Aktivierung oder Inaktivierung des Rezeptors führen. Ihnen fehlt größtenteils eine adäquate Affinität oder Spezifität. Um die Entwicklung und Verbesserung allosterischer Liganden des TSH-Rezeptors auf molekularer Ebene zu unterstützen, ist es notwendig, die Signalisierungseigenschaften der die Bindungstasche auskleidenden Aminosäuren zu kennen.

Die Zielsetzung die grundsätzliche dieser Arbeit ist es deshalb, Signalisierungseigenschaften der Aminosäurereste zu beschreiben, die die allosterische Bindungsregion auskleiden. Basierend auf Homologiemodellen der inaktiven und aktiven Konformation des TSH-Rezeptors sollten Aminosäurereste durch zielgerichtete Mutagenese identifiziert werden, die eine Schlüsselstellung während des Signalisierungsprozesses in diesem Bereich innehaben. Insbesondere konstitutiv aktivierende oder inaktivierende Mutationen sind dabei Indikatoren für sensible Kontaktpunkte potentieller Liganden.

Bildet man das Signalisierungspotenzial der auskleidenden Aminosäurereste in einem dreidimensionalen Modell der transmembranären Domäne des TSH-Rezeptors ab, so kann man zwischen aktivierenden und inaktivierenden Positionen unterscheiden. Dabei ist anzunehmen, dass ein allosterischer Ligand als komplementärer Gegenspieler der zugrunde liegenden Mutationen agiert. Ausgehend davon ist es möglich, die Gestalt und Eigenschaften der Interaktionen bereits bekannter allosterischer Liganden herauszuarbeiten. Gleichfalls können die Ergebnisse zur Erarbeitung eines 3D-Pharmakophor-Modells dienen, um die gezielte Optimierung kleiner Molekülliganden in Richtung Aktivierung oder Inaktivierung des Rezeptors zu unterstützen.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Reagenzien und Kits

β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
7-AAD	BD Biosciences, Heidelberg, D
Acrylamid 30 %	Carl Roth Karlsruhe D
(Acrylamid-Bisacrylamid 37,5:1)	
Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe, D
Agarose	Peqlab, Erlangen, D
Aquasafe 300 Plus Szintillator	Zinsser Analytics, Frankfurt am Main, D
BigDye [®] Terminator Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
BSA	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ameisensäure (CH ₂ O ₂)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumformiat (HCOONH ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ampicillin-Na-Salz	Carl Roth, Karlsruhe, D
APS $(H_8N_2O_8S_2)$	Carl Roth, Karlsruhe, D
BCIP (Brom-Chloro-Indolyl-Phosphat)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Biotin	Pierce, Rockford, USA
Bromphenolblau-Na-Salz	Carl Roth, Karlsruhe, D
bTSH	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Calziumchlorid (CaCl ₂)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Casyton (isotonische Kochsalzlösung)	CASY [®] ton, Innovatis AG, Reutlingen, D
Chlorwasserstoffsäure (HCI)	VWR BDH Prolabo, Leuven, B
D-(+)-Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe, D
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe, D
DNA-Marker 1kb-Leiter	GeneRuler [™] , Fermentas, St.Leon-Rot, D
DMEM	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe, D
dNTP-Mix	Fermentas, St.Leon-Rot, D
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe, D
EGTA	Carl Roth, Karlsruhe, D
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Essigsäureanhydrid (C ₄ H ₆ O ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ethanol (C_2H_6O)	J.T.Baker, Deventer, NL
Ethidiumbromid	Fluka Chemie, Buchs, CH
FKS	Invitrogen, Karlsruhe, D
FuGENE [®] HD Transfection Reagent	Roche Diagnostics, Karlsruhe, D
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, D
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, D
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe, D
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe, D

IBMX	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Isopropanol	VWR International, Darmstadt, D
¹²⁵ J-cAMP-Tryrosylester	IBL, Hamburg, D
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Lithiumchlorid (LiCl)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Lipofectamine [™] 2000 Reagent	Invitrogen, Karlsruhe, D
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	J.T.Baker, Deventer, NL
Methanol (CH₄O)	VWR International, Darmstadt, D
Natriumazid (NaN ₃)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumchlorid (NaCl)	VWR International, Darmstadt, D
Natriumformiat (HCOONa)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Natriumtetraborat (N ₂ B ₄ O ₇)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Natriumhydroxid (NaOH)	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
NBT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
NucleoBond [®] Xtra Midi/Maxi-Kit	Machery & Nagel, Düren, D
NucleoSpin [®] Extract II Kit	Machery & Nagel, Düren, D
NucleoSpin Plasmid Quick Pure	Machery & Nagel, Düren, D
PageRuler [™] Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot, D
Pepton	AppliChem, Darmstadt, D
PMSF	Fluka, Basel, CH
Poly-L-Lysinhydrobromid	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
ProteinA-Sepharose	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
RotiLoad, 4fach konzentriert	Carl Roth, Karlsruhe, D
Sac-Cel anti-Kaninchen	IBL, Hamburg, D
SDS	Serva, Heidelberg, D
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Triethylamin (C ₆ H ₁₅ N)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Trifluoressigsäure (C ₂ HF ₃ O ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, D
TritonX-100	Carl Roth, Karlsruhe, D
Trypton	AppliChem, Darmstadt, D
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe, D

3.1.2. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Blotkammern	BioRad, München, D
Brutschränke	Binder, Camariilo, USA CellSafe Integra Biosciences, CH Heraeus, Osterode, D
Clean-Bench	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen, D
Cryogefäße	Nunc, Roskilde, DK
Deckgläser	Menzel, Braunschweig, D
Durchflusszytometer FACSCanto II,	Becton Dickinson, Heidelberg, D

Elektrophoresekammer	peqlab, Erlangen, D	
Elektroporationsgerät GenePulser Xcell	BioRad München D	
Elektroporation System		
Elektroporationsküvette	BioRad, München, D	
Feinwaage	Mettler Toledo, Greifensee, CH	
Fluoreszenzmikroskop Leica DMLB	Leica Camera, Solms, D	
Gefrierschränke -80°C	New Brunswick Sciences, Nürtingen, D	
-20°C	Liebherr, Biberach an der Riß, D	
Glaswaren (Kolben, Pipetten, etc.)	Schott, Mainz, D	
Hamiltonpipette	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, CH	
Heizplatte	Kiko Werke, Staufen, D	
Horizontalschüttler	Edmund Bühler, Hechingen, D New Brunswick Sciences, Nürtingen, D	
Kühlschränke	Liebherr, Biberach an der Riß, D	
Magnetrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen, D	
Mikroskop	Carl Zeiss, Göttingen, D	
Mikrowelle	AEG, Berlin, D	
Multishaker Rotator RS-24	BioSan, Warren, USA	
Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schuell, Dassel, D	
Objektträger	Menzel GmbH, Braunschweig, D	
Parafilm	Laboratory Film Chicago USA	
	Eppendorf, Hamburg, D	
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Applied Biosystems, Foster City, USA	
pH-Messgerät	Knick® Portamess®, Berlin, D	
Photometer GeneQuant II	Pharmacia Biotech, Cambridge, UK	
Pipettierhilfe	Pipettboy, Integra Biosciences, Fernwald, D	
	Gilson, Columbus, USA	
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, D	
Pipetten (5, 10, 25 ml)	TPP, Zürich, CH	
Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, D	
Pipettierrobotor Plato	Zinsser Analytics, Frankfurt am Main, D	
· ·	CoTech, Berlin, D	
Reaktionsgefäße	Nunc, Roskilde, DK	
	Eppendorf, Hamburg, D	
Reinstwasseranlage, Typ MilliQ plus	Fa. Millipore, Schwalbach, D	
Sep-Pak® Vac 3cc Accell™ Plus QMA Kartuschen	Waters GmbH, Eschborn, D	
Sequenziergerät	Abi Prism [™] 3100 Avant Genetic Analyzer,	
	Applied Biosystems, Foster City, USA	
	Hoefer, San Francisco, USA	
Spannungsgerate	EPS 3500, EPS 600, Pharmacia Biotech,	
Thermonycler	Slockholm, S Riemetre, Cättingen, D	
	Somera, Gouingen, D	
Tiechzentrifugen: MiniSpin plus	Eppendorf, Hamburg, D	
Riofuge nico	Eppenuon, namburg, D Heraeus Instruments: Osterode: D	
	Christ Osterode D	
Vakuumzentrifugen	Savarant, Minnesota. USA	
Vortexer	Janke & Kunkel, Staufen, D	

Waage	Sartorius, Göttingen, D Scaltec, Heiligenstadt, 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, Schärfe System, CASY®ton, Stuttgart, D
Zentrifugen	Sorvall RC 50, Thermo Scientific, USA
Zentrifugengefäße	Beckman, Biomedical Research, Krefeld, D TPP, Zürich, CH
Wallace 1470 Wizard	GMI, Ramsey, USA
Tri-Carb 2810 TR	PerkinElmer, Rodgau, D

3.1.3. Antikörper

IgG1 Isotypkontrolle	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Maus-anti-Human TSH-Rezeptor, Klon 2C11 (monoklonal)	AbD Serotec, Düsseldorf, D
Maus-anti-Human TSH-Rezeptor, Klon 4C1 (monoklonal)	AbD Serotec, Düsseldorf, D
Kaninchen-anti-Human TSH-Rezeptor, H-155 (polyklonal)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Ziege-anti-Kaninchen IgG, AP-konjugiert	Clontech, Heidelberg, D
Ziege-anti-Maus IgG, AP-konjugiert	Dianova, Hamburg, D
Kaninchen-anti-cAMP-Succinimidyl- Protein-Konjugat	Eigenherstellung des Instituts

3.1.4. Enzyme

BamH	NEB, Frankfurt am Main, D
Dpnl	NEB, Frankfurt am Main, D
Bglll	NEB, Frankfurt am Main, D
Kpnl	NEB, Frankfurt am Main, D
Endo H	NEB, Frankfurt am Main, D
PNGase F	NEB, Frankfurt am Main, D
T4 DNA Ligase	NEB, Frankfurt am Main, D
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe, D
Pfu DNA-Polymerase	Stratagene Europe, Amsterdam, NL

3.1.5. Software

Clone Manager 5.0 für Windows, FCSExpress v3, Finch TV 1.4.0, GraphPad Prism Version 4.0, Microsoft Office 2003, PhotoFiltre, Pymol v0.99

3.1.6. Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen für den routinemäßigen Gebrauch wurden nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt. Die hierfür benötigten Chemikalien wurden in doppelt destilliertem Wasser gelöst, welches mit dem Milli-Q Plus Wasseraufbereitungssystem gereinigt und nach Bedarf autoklaviert wurde.

3.1.7. Oligonukleotide

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

3.1.7.1. Sequenzierprimer

Primer	Sequenz 5' \rightarrow 3'
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
SP6	CA TTT AGG TGA CAC TAT AG
hTSHR-3a-jw	AAG CTG GAT GCT GTT TAC C
hTSHR-12a	GGC CAG GAG CTC
hTSHR-7a	GCC ATC GAC TGC
hTSHR-7a-jw	AAC CAT GCC ATC GAC TGG C
hTSHR-1b	GGA GTG TGA TTC CAG C
hTSHR-2a	CTC ATC ACT GTT AGC
hTSHR-3a	GGA GGA GTA TAC
hTSHR-4b	GTA TAC TCC TCC
hTSHR-5a	GCT CTA TAT TAC
hTSHR-6b	CGT AAT AAT GAG C
hTSHR-7a	GCC ATC GAC TGG
hTSHR-8b	CCA GTC GAT GGC
hTSHR-9b	GCT AAC AGT GAT G

Tabelle 3.1: Oligonukleotide zur Sequenzierung der TSHR-Konstrukte

3.1.7.2. Mutageneseprimer

Tabelle 3.2: Oligonukleotide zur Einführung einer Kpnl-Schnittstelle mit dem Ziel der Umklonierung in den Vektor pcDNA3. Dargestellt ist der Forward-Primer. Der Reverse-Primer ergibt sich aus der komplementären Basenfolge. Die Positionen der ausgetauschten Nukleotide sind fett unterlegt. Vorlage der Reaktion war der wildtypische TSH-Rezeptor im Vektor pSVL.

Primer	Sequenz 5' \rightarrow 3'	Resultierendes rekombinantes Plasmid
TSHR-KPN1-A	CCC TCG AGG GTA C C A GTC CCG	pTSHR.KPN1

Tabelle 3.3: Oligonukleotide zur Herstellung von TSHR-Mutanten. Dargestellt sind die Sequenzen der Forward-Primer. Die Reverse-Primer ergeben sich aus der komplementären Basenfolge und tragen im Namen den Anhang -B. Die Positionen der ausgetauschten Nukleotide sind fett unterlegt. Als Vorlage der Mutagenesereaktion diente das Plasmid pTSHR.cDNA3.

Primer	Sequenz 5' \rightarrow 3'	Resultierendes rekombinantes Plasmid
TSHR-S281Q-A	CTT ACC CA C AA C ACT GCT GTG C	pTSHR.S281Q
TSHR-V421I-A	GAA TTG TG A T T T GGT TCG TTA G	pTSHR.V421I
TSHR-V424I-A	GGT GTG GTT CAT TAG TCT GCT GG	pTSHR.V424I
TSHR-Y466A-A	GCA TGG GGA TG G C CC TGC TCC TC	pTSHR.Y466A
TSHR-L467V-A	GGG GAT GTA C G T GCT CCT CAT CG	pTSHR.L467V
TSHR-V502A-A	GTT TCT TCA CTG C CT TTG CAA GC	pTSHR.V502A
TSHR-M572A-A	CTG CCT GCC C GC GGA CAC CGA GAC	pTSHR.M572A
TSHR-Y582A-A	GCT CTG GCA GC T ATT GTT TTT G	pTSHR.Y582A
TSHR-Y582F-A	GCT CTG GCA T T T ATT GTT TTT G	pTSHR.Y582F
TSHR-F585T-A	CAT ATA TTG TT A C TG TTC TGA CG	pTSHR.F585T
TSHR-V586I-A	CAT ATA TTG TTT TT A TTC TGA CGC TC	pTSHR.V586I
TSHR-L589V-A	GTT CTG ACG G TC AAC ATA GTT GC	pTSHR.L589V
TSHR-F594I-A	CAT AGT TGC CAT CGT CAT CGT CTG	pTSHR.F594I
TSHR-D619A-A	CAG GGG ACA AAG C TA CCA AAA TTG	pTSHR.D619A
TSHR-F634I-A	CTT CAC CGA C A T CAT ATG CAT GG	pTSHR.F634I
TSHR-M637C-A	CTT CAT ATG C TG C GC CCC AAT CTC	pTSHR.M637C
TSHR-M637W-A	CTT CAT ATG C TG GGC CCC AAT CTC	pTSHR.M637W
TSHR-F642I-A	CCC CAA TCT CA A TCT ATG CTC TGT C	pTSHR.F642I
TSHR-Y643A-A	CAA TCT CAT TC G C TG CTC TGT CAG	pTSHR.Y643A
TSHR-Y643F-A	CAA TCT CAT TCT T TG CTC TGT CAG	pTSHR.Y643F
TSHR-L645V-A	CAT TCT ATG CT G TGT CAG CAA TTC	pTSHR.L645V
TSHR-I648V-A	GCT CTG TCA GCA G TT CTG AAC AAG CC	pTSHR.I648V
TSHR-L665V-A	CTT GCT GGT AGT CTT CTA TCC AC	pTSHR.L665V
TSHR-Y667F-A	GGT ACT CTT CT T TCC ACT TAA CTC	pTSHR.Y667F

3.1.8. Plasmide

Plasmid	Vektor	Funktionelle Bereiche	Herkunft
pcDNA3	pcDNA3	Amp ^R	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
pEGFP-N1	pEGFP-N1	EGFP Kana ^R	Clontech, Heidelberg, D
pTSHR.SVL	pSVL	Wildtypischer humaner TSHR, Amp ^R	AG Paschke, Leipzig, D
pTSHR.cDNA3	pcDNA3	Wildtypischer humaner TSHR, Amp ^R	In dieser Arbeit hergestellt.

3.1.9. Zelllinie

Bezeichnung	Merkmale	Herkunft
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen, transformiert mit dem Adenovirus Typ 5, (DSMZ-Nr. ACC 305)	DSMZ, D

3.1.10. Bakterien

Bezeichnung	Genotyp
Escherichia coli DH5 α	supU44 Δ U169 [fi 80 lacZ Δ M15], hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1

3.2. Methoden

3.2.1. Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1. Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA in unterschiedlichen Maßstäben wurde das NucleoSpin Plasmid Quick Pure-Kit und das Nucleobond Xtra Midi/Maxi-Kit benutzt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die DNA wurde in Wasser aufgenommen und die Qualität der DNA wurde durch Agarose-Gelelektropherese überprüft.

3.2.1.2. Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch mit dem GeneQuantII-Photometer. Es wurde die Absorption einer verdünnten Lösung bei 260nm und 280nm im Verhältnis zum Leerwert (Wasser) gemessen. Das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ lässt eine qualitative Aussage über die Verunreinigung der DNA-Lösung mit Proteinen zu. Akzeptabel sind Werte zwischen 1,5 und 2,0 (Mülhardt C, 2003).

3.2.1.3. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Der DNA-Verdau wurde mit Typ II Restriktionsenzymen, nach den Angaben des Herstellers, durchgeführt. Es wurden pro Ansatz insgesamt 10 U Restriktionsenzym mit je 1 µg DNA eingesetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mittels DNA-Ladepuffer gestoppt und im Agarosegel analysiert.

3.2.1.4. Agarosegelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde ein 1%iges horizontales Agarosegel mit TAE-Puffer genutzt. Die Proben wurden mit 10 x DNA-Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Es wurde eine konstante Spannung von 5 V/cm angelegt. Zur Visualisierung der Fragmente im UV-Licht diente Ethidiumbromid. Die Länge der Fragmente wurde im Verhältnis zu einem mitgeführten DNA-Größenstandard ermittelt.

20 x TAE	1,6 M Tris, 22,8 ml/l Essigsäure, 74,4 g/l EDTA
10 x DNA-Ladepuffer	250 mg Bromphenolblau, 250 mg Xylen Cyanol, 33 ml 150 mM Tris, pH 7,6, 60 ml Glycerin, 7 ml H ₂ O
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/ml

3.2.1.5. Elution von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die entsprechenden DNA-Fragmente aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Diese wurden mit dem NucleoSpin[®] Extract II Kit nach den Angaben des Herstellers herausgelöst.

3.2.1.6. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation wurde zur Insertion von linearisierten DNA-Fragmenten in einen entsprechend komplementär linearisierten Vektor genutzt. Ein Reaktionsansatz enthielt 20 U T4 DNA Ligase und $0,5 - 2 \mu g$ DNA. Die Konzentration des Inserts war 5 bis 10 fach höher als die Konzentration des Vektors. Der Reaktionsansatz wurde bei 16 °C über Nacht inkubiert.

3.2.1.7. Zielgerichtete Mutagenese der TSHR-Sequenz

Tabelle 3.4: Ansatz der Mutagenese-PCR, Primer A und Primer B bezeichnen das komplementäre Mutagenese-Primerpaar.

50 ng	DNA	
10 pmol	Primer A	
10 pmol	Primer B	
2 μl	10x Puffer	
2 nmol	dNTP-Mix	
2 U	Pfu DNA-Polymerase	
ad 20 μl	H ₂ O	
94 °C	30 s	
-------	---------------------	------
94 °C	30 s	
55 °C	1 min	16 x
68 °C	16 min (2 min/1 kb)	
68 °C	16 min	
4 °C	∞	

Tabelle 3.5: Standardprogramm	der Mutagenese-PCR
-------------------------------	--------------------

In die wildtypische TSHR-Sequenz wurden Punktmutationen durch eine Mutagenese-PCR eingefügt. Als Vorlage diente das Plasmid pTSHR.cDNA3. Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurde zu jeder Probe 20 U *Dpn*I zugegeben und bei 37°C für eine Stunde inkubiert.

3.2.1.8. Transformation in elektrokompetente *E.coli* DH5α

3.2.1.8.1. Herstellung elektrokompetenter Zellen

Von *E.coli*-DH5 α -Bakterien wurde in LB-Medium bei 37 °C eine Vorkultur angezogen. Von dieser Vorkultur wurde eine Übernachtkultur angesetzt. Je 25 ml davon wurden mit je 475 ml LB-Medium versetzt und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,35 bis 0,4 angezogen. Nach 25 minütiger Abkühlung auf Eis wurde die Suspension für 15 Minuten bei 4 °C und 1000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde nacheinander mit kaltem Wasser und kaltem 10%igen Glycerin gewaschen und im Anschluss in GYT-Medium aufgenommen. Die OD₆₀₀ sollte dabei zwischen 0,6 und 0,8 liegen. Die Bakteriensuspension wurde bis zum Gebrauch bei –80 °C als Aliquots a 40 µl gelagert.

LB-Medium	10 g/l Pepton, 5 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, pH 7,5
GYT-Medium	10 % Glycerin, 0,125 % Hefeextrakt, 0,25 % Trypton

3.2.1.8.2. Transformation

Aliquots elektrokompetenter Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut und für eine Minute mit 4 μ l PCR-Ansatz oder 1 μ l gereinigter Plasmid-DNA inkubiert. Das Gemisch wurde in einer Elektroporationsküvette bei 1250 V elektroporiert und in 1 ml LB-Medium aufgenommen. Nach Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C wurde der Ansatz auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht angezogen.

LB-Agar	10 g/l Pepton, 5 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, pH 7,5, 15 g/l Agar, 100 μg/ml Ampicillin
LB-Medium	Kapitel 3.2.1.8.1

3.2.1.9. DNA-Sequenzierung

Die Sequenz der generierten Plasmide wurde durch Sequenzierung nach der Didesoxymethode überprüft. Für die Standard-Sequenzier-Reaktion wurde der *BigDye[®] Terminator V.1.1 Cycle Sequencing Kit* verwendet.

Zur Fällung der DNA wurde der Ansatz mit 42 µl Fällungsmix versetzt und nach 20 minütiger Inkubation auf Eis bei 13000 x g für 30 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die Auswertung erfolgte im ABI PRISM[™] 3100 Avant Genetic Analyzer.

Tabelle 3.6: Ansatz der Standard-Sequenzier-PCR

300 - 900 ng	DNA
10 pmol	Sequenzierprimer
1 μl	BigDye [®]
1,5 μl	5x Sequenzierpuffer
ad 20 μl	H ₂ O

Tabelle 3.7: Standardprogramm der Sequenzier-PCR

96 °C	2 min	
96 °C	10 s	
50 °C	5 s	35 x
60 °C	4 min	
4 °C	∞	

5x Sequenzierpuffer	400 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , pH 9
Fällungsmix	1,45 ml H ₂ O, 300 μ l 3 M Natriumacetat, 6,25 ml Ethanol, pH 4,6

3.2.1.10. Klonierung der TSHR-Sequenz in den Vektor pcDNA3

In das Plasmid pTSHR.SVL wurde vor die Sequenz des wildtypischen humanen TSH-Rezeptors durch Mutagenese eine *Kpnl*-Schnittstelle eingefügt. Nach Verdau mit *Kpnl* und *BamHI* wurde das TSHR-kodierende Fragment in den Vektor pcDNA3 umkloniert.

3.2.2. Zellkulturtechniken

3.2.2.1. Kultur von HEK293-Zellen

HEK293 Zellen wurden in Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM) mit NaHCO₃ und fetalem Kälberserum (FKS) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Zum Umsetzen der

Zellen wurden diese mit Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst, in Kulturmedium aufgenommen und je nach Experiment in der entsprechenden Zelldichte ausgesät.

Kulturmedium	DMEM-Pulver, 2 g/l NaHCO ₃ , 10 % (v/v) FKS, pH 7,2
Trypsin-EDTA	0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA, in PBS
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH ₂ P ₄ , 8,1mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4

3.2.2.2. Beschichtung von Deckgläsern und Zellkulturschalen mit Poly-L-Lysin

Die Beschichtung mit Poly-L-Lysin verbessert die Anhaftung der HEK293-Zellen am Untergrund durch elektrostatische Interaktion zwischen der negativ geladenen Zellmembran und dem positiv geladenen Überzug.

Dazu wurde die Grundfläche mit Poly-L-Lysin-Lösung (0,1 mg/ml) bedeckt und nach einer Einwirkzeit von 30 Minuten wieder abgesaugt. Die Oberfläche wurde anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet.

3.2.2.3. Kotransfektion

Zur Austestung geeigneter Transfektionsbedingungen wurde die Methode der Kotransfektion eingesetzt. Dazu wurde ein Plasmidgemisch aus 80 % pTSHR.cDNA3 und 20 % pEGFP-N1 transfiziert. pEGFP-N1 enthält die kodierende Sequenz für das Protein GFP und ermöglicht somit die Visualisierung des Transfektionsergebnisses unter dem Fluoreszenzmikroskop. Es wurden die Transfektionsreagenzien FuGENE[®] HD und Lipofectamine[™] 2000 ausgetestet.

75000 HEK293-Zellen wurden auf mit PolyL-Lysin beschichtete Deckgläser in einer 24-well-Platte ausgesät. Die Durchführung der Transfektion erfolgte nach 24 Stunden entsprechend den Angaben der Hersteller. Es wurden 0,2 µg oder 0,6 µg DNA je Ansatz eingesetzt und im Verhältnis 1:1, 1:2 oder 1:4 mit dem Transfektionsreagenz gemischt. Am darauffolgenden Tag wurde die Transfektionseffizienz unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

3.2.2.4. Transiente Transfektion der TSHR-Konstrukte

24 Stunden nach Aussaat der HEK293-Zellen wurden diese mit Hilfe von LipofectamineTM 2000 transient transfiziert. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Zellkulturgefäß	Zellzahl am Tag der Aussaat	DNA-Menge (μg)	Lipofectamine [™] 2000 (μl)
100 mm	4 000 000	18	36
6-well	300 000	2,4	4,8
24-well	75 000	0,6	1,2

Tabelle 3.8: Transiente Transfektion von HEK293-Zellen in unterschiedlichen Maßstäben

3.2.3. Proteinbiochemische Techniken

3.2.3.1. Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation werden Antikörper an eine feste Sepharose-Matrix gebunden. Das ermöglicht die Präzipitation des Antigens, gegen welches der Antikörper gerichtet ist. Die Analyse des Präzipitats erfolgt im Anschluss über ein reduzierendes SDS-Polyacrylamidgel und Western Blot.

Vorbereitung der ProteinA-Sepharose:

Je 100 mm Schale wurden 10 mg Sepharose eingewogen und für 15 Minuten in PBS auf Eis gequollen. Anschließend wurde die Sepharose zweimal mit PBS gewaschen (700 x g, 2 Minuten, 4 °C) und in 1 ml Puffer A aufgenommen. Zur Kopplung der Antikörperseren wurden diese in folgendem Verhältnis zugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert:

Maus-anti-Human TSH-Rezeptor (Klon 4C1)	1:200
Maus-anti-Human TSH-Rezeptor (Klon 2C11)	1:200

Kaninchen-anti-Human TSH-Rezeptor (H-155, polyklonal) 1:100

Der Überstand der Kopplung wurde vor Zugabe des Zelllysats zum Sepharosepellet verworfen.

4 Millionen HEK293-Zellen wurden je 100 mm-Schalen ausgesät, am Tag danach transfiziert und am zweiten Tag nach der Aussaat analysiert. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Nach dem Absaugen des Mediums wurde jede Zellkulturschale zwei Mal mit PBS-CM gewaschen und mit 800 μ l Lysispuffer für 1 Stunde bei 180 rpm inkubiert. Dieses Lysat wurde für 30 Minuten bei 12000 x g abzentrifugiert und der Überstand wurde auf das mit Antikörper beladene ProteinA-Sepharose-Pellet gegeben und über Nacht rotierend inkubiert. Die Sepharose wurde bei 700 x g für 2 Minuten pelletiert, einmal mit Waschpuffer I und zweimal mit Waschpuffer II gewaschen und für den Auftrag auf das SDS-Gel in 100 μ l 1x Rotiload Probenpuffer aufgenommen.

Puffer A	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % (v/v) Triton X-100, 0,1 % (w/v) SDS
PBS-CM	PBS (Kapitel 3.2.2.1), 0,1 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂
Lysispuffer	Puffer A, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM Benzamidin, 1,4 µg/ml Aprotinin, 3,2 µg/ml Trypsin-Inhibitor, pH 8
Waschpuffer I	50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 % (v/v) Triton X-100, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8
Waschpuffer II	50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,5 % (v/v)Triton X-100, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8

3.2.3.2. Untersuchung des Glykosylierungsstatus

Zur eindeutigen Zuordnung der Proteinbanden im Western Blot wurde das N-Glykosylierungsmuster mit Hilfe von Endoglykosidasen bestimmt. Dieses gibt Aufschluss über die Lokalisation des Proteins innerhalb des sekretorischen Weges. Im Endoplasmatischen Retikulum werden mannosereiche Glykosylierungen angefügt, welche im Golgi-Apparat zur komplex-glykosylierten Form umgebaut werden. N-Glykosidase F (PNGase F) ist in der Lage beide Formen abzuspalten. Endoglykosidase H (Endo H) spaltet nur mannosereiche Glykosylierungen.

Tabelle 3.9: Ansatz und Durchführung des Glykosidaseverdaus der Immunpräzipitate

	Verdau mit PNGase F	Verdau mit Endo H	
PBS	54 μl	59 μl	
Denaturierungspuffer	5,5 μl	6 μl	
PMSF	0,5 μl	0,5 μl	
Proteaseinhibitor-Mix	0,5 μl	0,5 μl	
8 min, 95°C			
NP-40	6,05 μl		
G7-Puffer	6,05 μl		
G5-Puffer		6,6 μl	
Enzym	1 μl	1,5 μl	
1 h, 37°C			
4x Rotiload Probenpuffer	25,4 μl	25,9 μl	

Mittels Immunpräzipitation wurde das zu untersuchende Protein immobilisiert. Für den Verdau wurde das Sepharose-Pellet vollständig trocken gesaugt und nach den Angaben des Glykosidaseanbieters weiter bearbeitet. Zusätzlich wurden Proteaseinhibitoren zugegeben.

PBS	(Kapitel 3.2.2.1)
PMSF	40 mM in Ethanol
Proteaseinhibitor-Mix	0,4 g/l Trypsin-Inhibitor, 0,25 g/l Apotinin, 9,78 g/l Benzamidin

3.2.3.3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

Über SDS-PAGE können Proteine unabhängig von ihrer Ladung nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Im anschließenden Western Blot werden diese auf eine Nitrozellulosemembran überführt und mit Hilfe spezifischer Primär- und enzymkonjugierter Sekundärantikörper sichtbar gemacht. In dieser Arbeit wurde ein an Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelter Sekundärantikörper verwendet.

Die in Rotiload Probenpuffer aufgenommenen Proben wurden für 5 Minuten bei 95°C gekocht und anschließend auf ein 8 %iges Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 0,25 mA/cm² für 60 bis 80 Minuten. Für den Nachweis des TSH-Rezeptors im Western Blot wurden die Proteine aus dem Polyacrylamidgel im Tankblotverfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (1,7 mA/cm², 1,5 Stunden). Anschließend wurde der Rezeptor mittels eines monoklonalen Antikörpers, der spezifisch gegen den TSHR gerichtet ist, nachgewiesen.

Zur Austestung optimaler Detektionsbedingungen wurden folgende Antikörper eingesetzt:

Maus-anti-Human TSH-Rezeptor (Klon 4C1):	1:200 in Blockpuffer
Kaninchen-anti-Human TSH-Rezeptor (H-155, polyklonal):	1:100 in Blockpuffer
AP-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen-IgG:	1:1000 in TBS-T

Blockpuffer	Über Nacht, 4 °C
Primärantikörper	1 h, RT
TBS-T	3 x 10 min, RT
Sekundärantikörper	1 h, RT
TBS-T	2 x 10 min, RT
10 mM Tris-HCl, pH 9,5	1 x 10 min, RT
AP-Detektionsreagenz	Färben bis zur gewünschten Intensität, Stopp der Reaktion mit Wasser

Trenngelpuffer	750 mM Tris-HCI, pH 8,8
Sammelgelpuffer	625 mM Tris-HCI, pH 6,8
Blotpuffer	20 mM Tris-HCl pH 8,3, 150 mM Glycin, 0,015 % (w/v) SDS
Blockpuffer	2 % (w/v) BSA in TBS-T

TBS-T	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween20, pH 7,2
Primärantikörper: Maus-anti-Human TSH-Rezeptor (Klon 2C11)	1 : 200 in Blockpuffer
Sekundärantikörper: AP-konjugiertes Ziege-anti-Maus-IgG	1 : 1500 in TBS-T
AP-Detektionsreagenz	0,2 mg/ml BCIP, 0,45 mg/ml NBT, in 10 mM Tris-HCl, pH 9,5

3.2.4. Messung der Oberflächenexpression der Rezeptoren mittels Durchflusszytometrie

Das Ziel war, die Oberflächenexpression der TSHR-Mutanten im Verhältnis zum Wildtyp zu messen. Dazu wurden die Rezeptormoleküle an der Zelloberfläche mit die fluorophorgekoppelter spezifischen Antikörpern markiert. an ein Sekundärantikörper binden konnte. lm Durchflusszytometer wurde die Fluoreszenzintensität jeder Zelle bestimmt. Verglichen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität pro Zelle zwischen Mutante und Wildtyp. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm FCSExpress v3.

HEK293-Zellen wurden in 6-well Platten ausgesät und am darauffolgenden Tag transfiziert. Alle weiteren Arbeitsschritte der Immunfärbung wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen mit EDTA-EGTA-Lösung abgelöst und in FACS-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden für 3 Minuten bei 300 x g pelletiert und für 10 Minuten in FACS-Puffer inkubiert. Daran schloss sich eine 30 minütige Inkubation mit dem Primärantikörper an. Die Zellen wurden zwei Mal mit FACS-Puffer gewaschen und für 30 Minuten in Sekundärantikörperlösung aufgenommen. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen wurden diese mit 7-AAD angefärbt. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer FACSCanto II von Becton Dickinson.

EDTA/ EGTA	1 mM EDTA, 1 mM EGTA in PBS (Kapitel 3.2.2.1)
FACS-Puffer	0,5 % BSA in PBS (Kapitel 3.2.2.1)
Primärantikörper	Maus-anti-Human TSH-Rezeptor (Klon 2C11), 1:200 in FACS- Puffer
Sekundärantikörper	Dylight 488-konjugiertes Ziege-anti-Maus-IgG (H+L), 1:400 in FACS-Puffer

3.2.5. Pharmakologische Methoden

3.2.5.1. Messung der cAMP-Akkumulation mittels Radioimmunoassay

Um zu klären, ob die eingeführte Mutation einen Einfluss auf die G_s vermittelte Signalisierung des Rezeptors hat, wurde die cAMP-Akkumulation ohne oder nach Stimulation mit bovinem TSH durch einen Radioimmunoassay gemessen. Dieser Assay basiert auf der kompetetiven Bindung von endogenem und radioaktiv markiertem cAMP an einen Antikörper. Die Konzentration an endogenem cAMP wird in Relation zu einer mitgeführten Standardkurve ermittelt.

In Poly-L-Lysin-beschichteten 24-well Platten wurden HEK293-Zellen ausgesät und am nächsten Tag transfiziert. Zwei Tage danach wurden die Zellen mit Stimulationsmedium gewaschen und für eine Stunde mit ansteigenden Konzentrationen von bovinem TSH (1 μIU/mI – 100 mIU/mI in Stimulationspuffer) im Zellkulturschrank stimuliert. Anschließend wurde das Stimulationsmedium abgesaugt und die Zellen mit Extraktionsmedium für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Das Lysat wurde für 10 Minuten bei 95 °C gekocht und vakuumgetrocknet. Die getrockneten Pellets wurden in RIA-Puffer aufgenommen, 20 Minuten bei 4 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert (15 min, 23000 x g, 4 °C). Die Überstände wurden entsprechend vorverdünnt und im Radioimmunoassay analysiert. Zur Erhöhung der Sensitivität der Messung wurden die Proben und die mitgeführten cAMP-Standards acetyliert (Smith BJ, 1993).

Die acetylierten Proben und Standards wurden mit ¹²⁵I-cAMP-Tyrosylmethylester (10000 cpm) und polyklonalem Kaninchen-anti-cAMP-Antiserum (Endverdünnung 1:160000) versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Trennung von antikörpergebundenem und freiem cAMP erfolgte anschließend über die Bindung des Anti-cAMP-Antikörpers an Zellulose-konjugiertes Schaf-anti-Kaninchen-IgG (Sac-Cel anti-Kaninchen; Inkubation für 40 min bei 4 °C). Das Präzipitat wurde mit RIA-Puffer gewaschen und bei 4200 x g und 4 °C für 40 Minuten pelletiert. Die Radioaktivität der Pellets wurde in einem γ -Counter gemessen.

Mit Hilfe des Programms GraphPad Prism wurden die Konzentrations-Wirkungs-Kurven nach iterativer, nicht linearer Regression erstellt und der EC₅₀-Wert daraus ermittelt. Die spezifische basale Aktivität (SBA) wurde wie folgt berechnet (Urizar E, 2005b):

$$SBA = (cAMP_{Mutante} - cAMP_{Vektor})/(FI_{Mutante} - FI_{Vektor})$$

(cAMP - hier basale cAMP-Konzentration; FI - mittlere Fluoreszenzintensität pro Zelle als Maß der Oberflächenexpression des Rezeptors)

Stimulationsmedium	DMEM mit 10 mM HEPES, 0,5 % BSA, 0,25 mM IBMX
Extraktionsmedium	0,1 % Trifluoressigsäure, 0,005 % TritonX-100
RIA-Puffer	100 mM Natriumacetatpuffer pH=6,0, 0,1 % BSA, 0,1 % TritonX-100

3.2.5.1.1. cAMP-Akkumulationsmessung zur Testung des Antagonisten c52

Getestet werden sollte der Einfluss des partiellen Antagonisten c52 auf die cAMP-Signalisierung des TSH-Rezeptors (Neumann S, 2008). Die Durchführung der Stimulation und des Radioimmunoassays blieb grundsätzlich gleich, wie in Kapitel 3.2.5.1 beschrieben. Es wurde aber ein Stimulationsmedium auf HBSS-Basis (Hank's Buffered Salt Solution) eingesetzt.

Stimulationsmedium (für c52-Testung)	HBSS mit 10 mM HEPES, 0,5 % BSA, 0,25 mM IBMX
	,

3.2.5.2. Messung der Inositolphosphat-Bildung

Die Stimulation des TSH-Rezeptors führt neben der Aktivierung von G_s auch zur Aktivierung von $G_{q/11}$. Es sollte geklärt werden, ob TSHR-Mutanten, deren Signalisierung über G_s verändert ist, auch eine Veränderung der Inositoltriphosphat-Akkumulation zeigen.

HEK293-Zellen wurden in Poly-L-Lysin-beschichteten 24-well Platten ausgesät und nach 24 Stunden transfiziert. Am folgenden Tag wurde das Kulturmedium gegen mit myo-[2-³H]-Inositol versetztes Kulturmedium ausgetauscht (74 kBq/ml in Kulturmedium, spezifische Aktivität= 630 Gbq/mmol). Einen Tag darauf wurden die Zellen mit Inkubationspuffer gewaschen und für eine Stunde bei 37 °C in Inkubationspuffer mit ansteigenden Konzentrationen an bovinem TSH (1 µIU/mI -100 mIU/mI) inkubiert. Nach Absaugen der Stimulationslösung wurden die Zellen mit 0,1 M Natronlauge lysiert. Durch Zugabe von 0,2 M Ameisensäure und Auftragspuffer wurden die geeigneten Ausgangsbedingungen für die Ionenaustauschchromatographie eingestellt. Zelltrümmer wurden durch eine 20minütige Zentrifugation bei 23000 x g entfernt. Das überschüssige Inositol wurde durch Ionenaustauschchromatographie abgetrennt. Dazu wurde die Säule

nacheinander mit 0,5 M NaOH, Regenerationspuffer und Wasser behandelt. Nach Auftragen des Zelllysats wurde die Säule mit Wasser und Waschpuffer gewaschen und das gebundene Inositolphosphat mit Elutionspuffer abgelöst. Nach Aufnahme des Eluats in Szintillatorlösung wurden die Zerfälle pro Minute in einem Szintillationszähler gemessen.

Inkubationspuffer	DMEM mit 10 mM LiCl, 10 mM HEPES, 0,5% BSA
Auftragspuffer	5 mM Natriumtetraborat, 0,5 mM EDTA
Regenerationspuffer	0,1 M Ameisensäure, 3 M Ammoniumformiat
Waschpuffer	5 mM Natriumtetraborat, 60 mM Natriumformiat
Elutionspuffer	0,1 M Ameisensäure, 0,4 M Ammoniumformiat

3.2.6. Statistik

Die Signifikanz der Ergebnisse im Verhältnis zum Wildtyp wurde durch den Student`schen t-Test mit dem Programm GraphPad Prism ermittelt.

3.2.7. Anfertigung homologer Molekülmodelle

Die homologen Molekülmodelle der Transmembrandomäne des TSH-Rezeptors, die dieser Arbeit zugrunde liegen, wurden von Dr. Gunnar Kleinau entwickelt (Kleinau G, 2008b; Kleinau & Haas, 2010). Das Modell der inaktiven Struktur der TSHR-Transmembrandomäne basiert auf der Kristallstruktur von Rhodopsin (Proteindatenbank-Zugangscode: 1F88, 2I35, 2J4Y). Für den aktiven Zustand wurde ein Modell, welches auf der Kristallstruktur von Opsin beruht, genutzt (Proteindatenbank-Zugangscode: 3CAP).

Basierend auf Sequenzvergleichen mit dem Programm SeqLab (Wisconsin Package, Version 10.2, Accelrys Inc., San Diego, USA) wurden einige TSHR spezifische Korrekturen vorgenommen. Rhodopsin interagieren In und Opsin zwei aufeinanderfolgende Threoninseitenketten mit dem Helixrückgrat vorangegangener Aminosäurereste, was zu einer Wölbung der TMH2 führt. Im TSHR gibt es diese beiden aufeinanderfolgenden Threoninreste nicht. Das legt eine reguläre α -helikale Struktur der TMH2 nahe, die sich bis zur Position 2.71 fortsetzt. Der N-terminale Teil der TMH5 wurde um circa 10 bis 15 Grad gedreht, denn im Vergleich zu Rhodopsin/Opsin ist im TSHR kein Prolin an Position 5.50 vorhanden. Die intra- und extrazellulären Schleifen wurden in Verbindung mit bekannten Peptidstrukturen modelliert (PDB 3D-Datenbank; Brookhaven National Laboratory; Brookhaven; USA). Lücken in der Schleifenstruktur wurden mit dem loop search Hilfsprogramm von Sybyl 7.35 (Tripos Inc., St. Louis, USA) geschlossen. Die Aminosäureseitenketten und die Schleifen wurden mittels Energiedynamiksimulation im Amber 8.0 Kraftfeld auf eine minimale Energieänderung von $\Delta E < 0.05 \text{ kcal/(mol*Å)}$ optimiert (Case D, 2002). Die Qualität und Stabilität der Modelle konnte mit Procheck bestätigt werden (Laskowski RA, 1993).

3.2.8. Ballesteros-Weinstein-Nomenklatur

Diese Nomenklatur dient der Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen verschiedenen G-Protein gekoppelten Rezeptoren im α -helikalen transmembranären Bereich (Ballesteros & Weinstein, 1995). Die Zahl vor dem Punkt gibt die Nummer der α -Helix an. Nach dem Punkt ist die Position des jeweiligen Aminosäurerestes in der Helix angegeben. Diese Angabe geschieht in Korrelation zu einer hochkonservierten Position in dieser Helix, welche willkürlich als 50 definiert ist (Kapitel 7.2).

4. Ergebnisse

4.1. Die Auswahl der charakterisierten Aminosäurepositionen in der transmembranären Bindungsregion kleiner Molekülliganden des TSH-Rezeptors

Im Gegensatz zur orthosterischen Hormonbindungsstelle des TSH, binden kleine Molekülliganden allosterisch in der Transmembranregion des TSH-Rezeptors (Jäschke H, 2006; Neumann S, 2008; Neumann S, 2009; Neumann S, 2010). Diese Bindungsregion befindet sich im gleichen Bereich, in dem auch endogene Liganden anderer G-Protein gekoppelter Rezeptoren, zum Beispiel vom Rhodopsin oder dem β -Adrenorezeptor, binden. (Surgand JS, 2006) Die Transmembranhelizes 1, 2, 3, 5, 6 und 7 sind hauptsächlich an der Auskleidung dieser Bindungsregion beteiligt (Tabelle 4.1).

Es ist nur wenig über die von kleinen Molekülliganden ausgelösten intramolekularen Aktivierungs- und Inaktivierungsmechanismen bekannt (Neumann S, 2008; Heitman LH, 2008; Moore S, 2006). Insbesondere gab es keine Darstellung der Signalisierungseigenschaften aller Aminosäurereste die die allosterische Bindungstasche auskleiden.

Basierend auf der Röntgenstruktur von bovinem Rhodopsin (Modell im inaktiven Zustand) oder Opsin (Modell im aktiven Zustand) hat Dr. Gunnar Kleinau homologe Molekülmodelle der Transmembrandomäne des TSH-Rezeptors entworfen (Palczewski K, 2000; Park J, 2008; Kleinau & Haas, 2010; Haas & Kleinau, 2011). Damit wurden diejenigen Aminosäurereste ermittelt, die die allosterische Bindungstasche auskleiden könnten. Zum anderen waren sie ein Werkzeug zum Vergleich der mutierten TSH-Rezeptoren mit dem wildtypischen Rezeptor.

Die Auswahl der Aminosäureseitenketten zur funktionellen Charakterisierung geschah nach folgenden Kriterien:

- sie befinden sich in räumlicher Nähe zur allosterischen Bindungsregion kleiner Molekülliganden im TSH-Rezeptor
- 2. für sie waren bis jetzt noch keine funktionellen Daten verfügbar.

Insgesamt entsprachen 18 Aminosäurepositionen diesen Kriterien (Tabelle 4.1 und Abbildung 4.1).

Tabelle 4.1: Zusammenfassung von Aminosäurenresten die sich in räumlicher Nähe zur transmembranären Bindungstasche kleiner Molekülliganden im TSHR befinden. Dieser Überblick basiert auf Molekülmodellen des TSH-Rezeptors und auf früheren Studien, die sich mit dieser allosterischen Bindungsregion beschäftigen (Neumann S, 2008, 2009; Moore S, 2006). Aminosäurepositionen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, sind fett unterlegt. Für alle anderen Aminosäurereste waren bereits experimentelle Daten verfügbar (Datenbank: www.ssfa-gphr.de).

Lage	Ballesteros & Weinstein Nummerierung	Aminosäure hTSHR
TMH1	1.35	L417
	1.39	V421
	1.42	V424
TMH2	2.53	M463
	2.56	Y466
	2.57	L467
	2.60	1470
	2.64	D474
TMH3	3.32	T501
	3.33	V502
	3.36	S505
	3.37	E506
	3.40	V509
TMH4	4.56	L552
EZS2		1568
		L570
		P571
		M572
TMH5	5.39	Y582
	5.40	1583
	5.42	F585
	5.43	V586
	5.44	L587
	5.46	L589
	5.47	N590
	5,51	F594
TMH6	6,45	F634
	6.48	M637
	6.50	P639
	6.51	I 640
	6.52	S641
	6,53	F642
	6.54	Y643
	6.56	L645
	6.55	A644
	6.59	I648
TMH7	7.39	V664
	7.40	L665
	7.42	Y667



Abbildung 4.1: Homologes Molekülmodell der transmembranären Domäne des wildtypischen TSH-Rezeptors basierend auf der Struktur von inaktivem bovinen Rhodopsin; Ausschnitt des Bereiches, der zur extrazellulären Seite hin gelegen ist. Dargestellt in rot sind alle Aminosäureseitenketten, die zur Charakterisierung ausgewählt wurden

4.2. Zielgerichtete Einführung von Aminosäureaustauschen in die wildtypische Sequenz des humanen TSH-Rezeptors

4.2.1. Die Klonierung der wildtypischen TSHR-Sequenz

In das Plasmid pTSHR.SVL (Libert F, 1989) wurde durch Mutagenese vor die kodierende Sequenz des wildtypischen humanen TSH-Rezeptors eine *Kpn*l-Schnittstelle eingeführt. Die Rezeptorsequenz wurde dann über die Schnittstellen *Kpn*I und *BamH*I in den Vektor pcDNA3 insertiert. Als Resultat lag das Plasmid pTSHR.cDNA3 vor. Die anschließende Sequenzierung zeigte keine Veränderungen in der Basenabfolge des TSHR-Wildtyps.

4.2.2. Die Auswahl der eingeführten Aminosäureaustausche in die wildtypische TSHR-Sequenz

Für die in Tabelle 4.1 genannten zu untersuchenden Positionen mussten nun die einzuführenden Aminosäurereste festgelegt werden. Dieser Auswahl lagen folgende Überlegungen zu Grunde.

- 1. Es sollten möglichst nur kleine Veränderungen an der jeweiligen Aminosäureseitenkette vorgenommen werden. um faltungsbedingte Signalisierungsprobleme minimieren. Gleichzeitig zu ist die Signalisierungsempfindlichkeit einer solchen Mutante ein Indikator dafür, dass an bereits minimale Änderung dieser eine Position zu einem signalisierungsrelevanten Ergebnis führt.
- 2. Die Transmembrandomäne des humanen TSH-Rezeptors besitzt mit den beiden homologen humanen Glykoproteinhormonrezeptoren, LHR und FSHR, eine Sequenzidentität von circa 70%. (Costagliola S, 2005) Befindet sich an den entsprechenden Positionen der homologen Rezeptoren eine andere Aminosäure, so wurde diese in die Auswahl mit einbezogen.
- 3. Im Hinblick auf Signalisierungsmechanismen, die von grundlegender Bedeutung für G-Protein gekoppelte Rezeptoren der Klasse A sind, wurde überprüft, ob es in diesem Bereich hochkonservierte Aminosäurenpositionen gibt, die funktionell mit der transmembranären Signalweiterleitung verbunden sind.

In Tabelle 4.2 sind die eingeführten Aminosäureaustausche zusammengefasst.

Dominierendes Element, zur Charakterisierung der Wechselwirkung von Aminosäurenseitenketten innerhalb der allosterischen Bindungsregion des TSH-Rezeptors, war in dieser Studie die Verkürzung der substituierten Aminosäurereste. Das war für alle durchgeführten Austausche, bis auf die Mutationen V4211 (V1.39I), V424I (V1.42I), V586I (V5.43I) und M637W (M6.48W), der Fall.

Bei den Mutanten V421I (V1.39I), V424I (V1.42I), F585T (F5.42T), V586I (V5.43I) und Y643F (Y6.54F) wurden Aminosäurereste eingeführt, die an den entsprechenden Positionen der homologen humanen Glykoproteinhormonrezeptoren vorkommen.

Oft ging die Verkürzung der Seitenkette mit dem Verlust des aromatischen Charakters oder dem Potenzial der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen einher. Das traf auf folgende Mutanten zu: Y466A (Y2.56A), Y582A (Y5.39A), Y582F (Y5.39F), F585T (F5.42T), F594I (F5.51I), F634I (F6.45I), F642I (F6.53I), Y643A (Y6.54A), Y643F (Y6.54F) und Y667F (Y7.42F).

Die Einführung von Tryptophan an Position 637 (6.48) der TMH6 beruht auf dem Sequenzvergleich Rhodopsin-ähnlicher G-Protein gekoppelter Rezeptoren. Dort

befindet sich meist ein Tryptophan, welchem eine Schlüsselposition in der intramolekularen Signalübertragung zugeordnet wird. (Sum CS, 2009; Schwartz TW, 2006).

Tabelle4.2: AuflistungderAminosäurepositionen,derenSeitenkettenzurCharakterisierungausgewähltwurden.Es sind die eingeführtenAminosäureaustauscheund die homologenAminosäuren am humanenLHCGR und FSHR zusammengefasst.

Lage	Ballesteros & Weinstein Nummerierung	Aminosäure hTSHR	Eingeführte Mutation	Homologe Aminosäure beim hLHCGR/hFSHR
TMH1	1.39	V421	I	1/1
	1.42	V424	I	1/1
TMH2	2.56	Y466	Α	Y / Y
	2.57	L467	V	L/L
TMH3	3.33	V502	Α	V / V
TMH5	5.39	Y582	A/F	Y / Y
	5.42	F585	Т	T/S
	5.43	V586	I	I/L
	5.46	L589	V	L/L
	5.51	F594	I	F/F
TMH6	6.45	F634	I	F/F
	6.48	M637	C/W	M / M
	6.53	F642	I	F/F
	6.54	Y643	A/F	F/F
	6.56	L645	V	1/1
	6.59	I648	V	A/S
TMH7	7.40	L665	V	L/L
	7.42	Y667	F	Y/H

4.2.3. Zielgerichtete Mutagenese der wildtypischen TSHR-Sequenz

Mittels Mutagenese wurden zielgerichtet Mutationen in die wildtypische Sequenz des humanen TSH-Rezeptors, kloniert in den Vektor pcDNA3, eingeführt, um einzelne Aminosäuren auszutauschen. Durch Sequenzierung wurden die gewünschten Punktmutationen nachgewiesen und ebenfalls sichergestellt, dass keine zusätzlichen polymeraseabhängigen Sequenzveränderungen vorhanden waren.

4.3. Die Expression des wildtypischen TSH-Rezeptors und dessen Mutanten in HEK293-Zellen

4.3.1. Die Transfektion der TSHR-Konstrukte in HEK293-Zellen

Zur ersten Einschätzung der Transfektionseffizienz wurde, zur Visualisierung der Ergebnisse, ein GFP-kodierendes Plasmid kotransfiziert, da an die Sequenz des TSH-Rezeptors kein kodierender Bereich für einen Detektionsmarker, wie beispielsweise ein fluoreszierendes Protein, angefügt worden war. Damit sollte eine Beeinflussung der Signalisierungseigenschaften des Rezeptors durch diese zusätzliche Veränderung vermieden werden. Dieser Marker hätte aber den Expressionsnachweis über bereits etablierte Methoden ermöglicht.

Es wurden verschiedene Transfektionsreagenzien ausgetestet. Dabei wurde nach den Angaben der Hersteller vorgegangen und die eingesetzte Menge Plasmid-DNA sowie das Verhältnis DNA zu Transfektionsmittel variiert. (Daten nicht gezeigt)

Die besten Transfektionsergebnisse wurden bei Transfektion mit Lipofectamin2000[™] erzielt. Dazu wurde je 24-well Schale 0,6µg Plasmid-DNA im Verhältnis 1:2 mit dem Transfektionsmittel gemischt.

Die Einstellung der Transfektionsbedingungen wurde für das Plasmid pTSHR.cDNA3 vorgenommen, welches den wildtypischen TSHR kodiert. Die TSHR-Mutanten wurden dem entsprechend wie der Wildtyp behandelt.

4.3.2. Die Austestung von TSHR-spezifischen Antikörpern für Immunpräzipitation und Western Blot

Der TSHR-Wildtyp und auch die TSHR-Mutanten wurden ohne angefügten Detektionsmarker in HEK293-Zellen exprimiert. Zur Kontrolle des transienten Expressionssystems wurde die Expression über Immunpräzipitation und Western Blot nachgewiesen. Dazu wurden drei verschiede Antikörper getestet, die spezifisch mit Bereichen der N-terminalen extrazellulären Domäne reagieren.

Die besten Detektionsergebnisse wurden mit dem Einsatz folgender Antikörperkombination erreicht (Abbildung 4.2):

Immunpräzipitation:Maus-anti-HumanTSHR (Klon 4C1)Primärantikörper im Western Blot:Maus-anti-Human TSHR (Klon 2C11)

	HEK	WT	HEK	WT	HEK	WT	HEK	WT	HEK	WТ	HEK	WТ	
kDa								-					8
100 -								Sec.944	100	10.000			₩
75 -					-	_			_	1		88	
50 -	-		-		-	-	-	=	-	-	-	=	
IP	н-	155	H-1	55	20	C11	2C	11		4C1	4	C1	
WB	40	C1	2C	11	н-	155	40	21	E	1-155	20	C11	

Abbildung 4.2: Testung verschiedener Antikörperkombinationen für Immunpräzipitation (IP) und Western Blot (WB) zum Nachweis der transienten Expression des wildtypischen TSH-Rezeptors (WT) in HEK293-Zellen (HEK); Nach transienter Expression wurden die Zelllysate über an ProteinA-Sepharose gekoppelte spezifische Antikörper gegen die N-terminale Domäne des TSH-Rezeptors aufgereinigt und mittels Western Blot detektiert. Dafür wurde ein AP-gekoppelter Sekundärantikörper eingesetzt. Die jeweils benutzten TSHR-spezifischen Antikörper für Immunpräzipitation und Western Blot sind unter dem Bildausschnitt des Western Blots angegeben. Die Laufhöhe der beiden spezifischen TSHR-Hauptbanden sind durch Pfeile markiert. H-155, 2C11, 4C1 – Antiseren gegen die N-terminale Domäne des TSH-Rezeptors

4.3.3. Die Zuordnung der Proteinbanden des TSH-Rezeptors im Western Blot mittels Deglykosylierung

Der TSHR besitzt sechs potentielle N-Glykosylierungsstellen, deren Glykosylierung von essentieller Bedeutung für seine Funktion ist (Nagayama Y, 2000). Unglykosyliert hat der TSH-Rezeptor ein Molekulargewicht von 84 kDa. Zur direkten Zuordnung der Banden im Western Blot und zur Klärung, ob es sich dabei um die komplex-glykosylierte oder die mannosereiche Form handelt, wurden die Immunpräzipitate einem Glykosidaseverdau unterzogen.

PNGase F ist in der Lage die Zuckerketten der komplex-glykosylierten und der mannosereichen Form abzuspalten. In diesem Ansatz sollte demzufolge nur noch die unglykosylierte Form des TSH-Rezeptors zu erkennen sein.

Endo H schneidet nur Zuckerreste der mannosereichen Form. Der Rezeptoranteil mit komplexer Glykosylierung bleibt demnach unverändert nachweisbar. Die Bande mit mannosereicher Glykosylierung verschwindet und wird als unglykosylierte Form detektiert.



Abbildung 4.3: Zuordnung der Proteinbanden im Western Blot mittels Deglykosylierung; HEK293-Zellen (HEK) wurden transient mit dem wildtypischen TSH-Rezeptor (WT) transfiziert, die Zelllysate wurden über Immunpräzipitation gereinigt und die Immunpräzipitate anschließend verdaut. Zum Einsatz kamen die Glykosidasen PNGase F und Endo H. Im Western Blot wurde mit Antikörpern gegen die N-terminale Domäne des TSH-Rezeptors und einem AP-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. k – komplexglykosylierte Form des TSH-Rezeptors, m – mannosereiche Form des TSH-Rezeptors, u – unglykosylierte Form des TSH-Rezeptors

Die Auswertung der Deglykosylierungsansätze ergab, dass die Proteinbande bei circa 120 kDa der komplex-glykosylierten Form des TSH-Rezeptors zugeordnet werden kann. Mit einer Größe von etwa 100 kDA ist die mannosereiche Form nachweisbar (Abbildung 4.3). Dieses Ergebnis stimmt mit bereits publizierten Expressionsdaten überein (Oda Y, 1999).

4.4. Die Funktionelle Charakterisierung der Mutanten des humanen TSH-Rezeptors

4.4.1. Die Bestimmung der Oberflächenexpression der TSH-Rezeptoren

Um die Vergleichbarkeit der Signalisierungsergebnisse einschätzen zu können, ist es von grundlegender Bedeutung, die Zelloberflächenexpression der mutierten TSH-Rezeptoren im Vergleich zum wildtypischen TSHR zu kennen. Im Besonderen ist die Oberflächenexpression für die Beurteilung der basalen Aktivität des TSH-Rezeptors von Interesse. Es ist bekannt, dass ein linearer Zusammenhang zwischen der Basalaktivität eines Rezeptors und der Oberflächenexpression besteht (Ballesteros JA, 2001).



Abbildung 4.4: Oberflächenexpression der TSHR-Mutanten; Die Messung der Rezeptormenge an der Zelloberfläche erfolgte nach transienter Transfektion in HEK293-Zellen mittels Durchflusszytometrie. Angegeben ist der arithmetische Mittelwert ± Standardabweichung der relativen Fluoreszenzintensität je Zelle im Vergleich zum mitgeführten Wildtyp. Resultate mit einem Signifikanzniveau p<0,05 sind durch * gekennzeichnet.

Die Bestimmung der Oberflächenexpression erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Dabei wurde, nach spezifischer Fluoreszenzmarkierung der Oberflächenrezeptoren, die Fluoreszenzintensität jeder einzelnen Zelle als Maß für die Oberflächenexpression des Rezeptors gemessen.

Die Oberflächenexpression der meisten Mutanten war unter unseren experimentellen Bedingungen mit dem Wildtyp vergleichbar. Die Mutanten V502A (V3.33A), Y582A (Y5.39A), F634I (F6.45I), M637W (M6.48W), F642I (F6.53I), I648V (I6.59V) und Y667F (Y7.42F) zeigten ein signifikant verringertes oder erhöhtes Expressionsniveau (Abbildung 4.4).

4.4.2. Die Messung der cAMP-Akkumulation der TSH-Rezeptoren

Die Stimulation des wildtypischen TSH-Rezeptors kann zur Aktivierung von G-Proteinen aller vier Subfamilien führen (G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ und $G_{12/13}$) (Allgeier A, 1994, 1997; Laugwitz KL, 1996; Büch TR, 2008). Der Hauptsignalweg des TSH-Rezeptors verläuft über die Aktivierung von G_s . Diese führt zur Aktivierung der Adenylylcyclase und damit zu einer gesteigerten cAMP-Produktion.

Der TSHR besitzt eine erhöhte Basalaktivität (Cetani F, 2002). Das heißt, auch ohne Ligandenstimulation kommt es zu einer G_s -vermittelten cAMP-Produktion. Die zu

bestimmenden Messgrößen sind also die basale und maximale cAMP-Bildung und die TSH-Konzentration bei halbmaximaler Rezeptorstimulation (EC₅₀).

Die Bestimmung der cAMP-Konzentration erfolgte durch einen Radioimmunoassay. Die Daten der Mutanten wurden im Verhältnis zum mitgeführten Wildtyp berechnet. Abbildungen von Konzentrations-Wirkungskurven für jede Mutante und dem mitgeführten Wildtyp sind in Kapitel 7.1 zu finden.

4.4.2.1. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve des wildtypischen TSH-Rezeptors

Nach transienter Transfektion des wildtypischen TSH-Rezeptors in HEK293-Zellen und der Stimulation mit ansteigenden Konzentrationen an bovinem TSH wurde der intrazelluläre cAMP-Gehalt gemessen.

Im Vergleich zu HEK293-Zellen, die mit dem leeren Vektor transfiziert wurden, haben Zellen, die mit dem TSHR-Wildtyp transfiziert sind, einen dreifach höheren cAMP-Basalwert.

Der EC₅₀-Wert des Wildtyps liegt bei Stimulation mit bovinem TSH bei 59,3 μ IU/ml (41,3 – 84,9 μ IU/ml) beziehungsweise 1,16 nmol/l (0,81 – 1,66 nmol/l) (Abbildung 4.5).



Abbildung 4.5: Konzentrations-Wirkungs-Kurve des wildtypischen TSH-Rezeptors stimuliert mit ansteigenden Konzentrationen an bovinem TSH (bTSH); Die Bestimmung der cAMP-Konzentration erfolgte in transient transfizierten HEK293-Zellen durch einen Radioimmunoassay. Diese Kurve steht exemplarisch für insgesamt 25 ermittelte Dosis-Wirkungs-Kurven. Jeder Datenpunkt wurde als Doppelwert bestimmt. Angegeben ist der jeweilige arithmetische Mittelwert ± Standardabweichung.

4.4.2.2. Die cAMP-Akkumulation der TSHR-Mutanten

Von den 21 untersuchten Mutanten zeigen 16 eine signifikante Veränderung der basalen cAMP-Akkumulation. Die Mutationen V4211 (V1.39I), Y466A (Y2.56A), M637C (M6.48C), M637W (M6.48W), Y643F (Y6.54F) und L645V (L6.56V) bewirken eine Erhöhung des Basalwertes. Die Einführung der Mutationen V424I (V1.42I), L467V (L2.57V), V502A (V3.33A), Y582A (Y5.39A), Y582F (Y5.39F), F594I (F5.51I), F634I (F6.45I), F642I (F6.53I), Y643A (Y6.54A) und L665V (L7.40V) führen zu einer Verringerung der basalen cAMP-Produktion, bis hin zum völligen Verschwinden (Abbildung 4.6A).

Fast alle getesteten Mutanten erreichen nach Stimulation mit bovinem TSH ein maximales Aktivitätsniveau vergleichbar mit dem Wildtyp. Nur durch die Mutationen V424I (V1.42I), Y466A (Y2.56A), M637W (M6.48W) und F642I (F6.53I) gelangt der Rezeptor nicht mehr zur vollständigen maximalen Aktivität (Abbildung 4.6C).

Die Signalisierungsempfindlichkeit ist bei acht der mutierten TSH-Rezeptoren deutlich verschlechtert. Die Aminosäureaustausche Y466A (Y2.56A), L467V (L2.57V), V502A (3.33A), Y582A (Y5.39A), F594I (F5.51I), F634I (F6.45I), F642I (F6.53I) und Y643A (Y6.54A) bewirken eine signifikante Erhöhung des EC_{50} -Wertes (Abbildung 4.6B).

4.4.3. Die Messung der Inositolphosphatproduktion der TSH-Rezeptoren

Neben dem Hauptsignalisierungsweg des TSH-Rezeptors über G_s , konnte auch der Aktivierung von G_q durch den TSHR eine biologische Relevanz zugeordnet werden (Van Sande J, 1990, 1995). Diese führt, über die Aktivierung der Phospholipase C, zur Produktion von Inositol-1,4,5-triphosphat.

Die Bestimmung der Inositolphosphatkonzentration erfolgte mittels Einbau von [³H]Inositol. Zur Vergleichbarkeit der unabhängigen Experimente wurden die Messwerte auf die Menge des eingebauten [³H]Inositols bezogen. Die Daten der TSHR-Mutanten wurden im Verhältnis zum mitgeführten Wildtyp berechnet.



Abbildung 4.6: Messung der cAMP-Produktion der TSHR-Mutanten mit und ohne Stimulation durch bTSH; HEK293-Zellen wurden transient mit dem wildtypischen TSHR oder einer TSHR-Mutante transfiziert. Mittels Radioimmunoassay wurde die intrazelluläre cAMP-Konzentration in Abhängigkeit von der Konzentration an bTSH gemessen. Die Werte für den mitgeführten Wildtyp wurden mit 1 gleichgesetzt und die Ergebnisse der Mutanten wurden dem entsprechend als das n-fache des Wildtyps angegeben. Resultate mit einem Signifikanzniveau p<0,05 sind durch * gekennzeichnet. A) cAMP-Basalwerte ohne bTSH-Stimulation; Angegeben ist der arithmetische Mittelwert \pm Standardabweichung B) EC₅₀-Werte nach Stimulation mit bTSH; Gezeigt sind die geometrischen Mittelwerte mit dem 95%igen Konfidenzintervall C) cAMP-Maximalwerte nach Stimulation mit bTSH; Gezeigt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardabweichung

4.4.3.1. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve des wildtypischen TSH-Rezeptors

Es ist bekannt, dass für den TSHR-Wildtyp die Signalisierung über G_q erst bei wesentlich höheren TSH-Konzentrationen angesprochen wird, als die Signalisierung über G_s (Allgeier A, 1994). Eine basale Inositolphosphatproduktion durch den wildtypischen TSHR, wie sie für die cAMP-Produktion beschrieben wird, ist nicht bekannt (Van Sande J, 1995).

Diese Effekte sind auch in unserem experimentellen System sichtbar. In Zellen die mit dem Wildtyp transfiziert wurden, unterscheidet sich der intrazelluläre Inositolphosphatgehalt ohne Ligandenstimulation nicht signifikant von dem der in Zellen gemessen wird, die mit dem leeren Vektor transfiziert wurden. (Abbildung 4.8A) Während sich ein Anstieg der cAMP-Akkumulation schon bei einer bTSH-Stimulation mit ca. $4x10^{-6}$ IU/ml zeigt (Abbildung 4.5), beginnt die Aktivierung des G_q-Signalweges erst bei einer bTSH-Konzentration von ca. $2x10^{-3}$ IU/ml (Abbildung 4.7). Mit der höchsten experimentell eingesetzten bTSH-Konzentration wurde kein Plateau der Inositolakkumulation erreicht, so wie das für die cAMP-Produktion der Fall war. Hier wurde gerade der lineare Bereich der Dosis-Wirkungs-Kurve verlassen. Deshalb wurde auf die Bestimmung von EC₅₀-Werten des Inositoltriphosphatsignals der einzelnen TSHR-Mutanten verzichtet.



Abbildung 4.7: Konzentrations-Wirkungs-Kurve des wildtypischen TSH-Rezeptors stimuliert mit ansteigenden Konzentrationen an bovinem TSH (bTSH); Die Bestimmung der Inositolphosphatkonzentration (InsP) erfolgte in transient transfizierten HEK293-Zellen durch die Messung des eingebauten [3 H]Inositols. Diese Kurve steht exemplarisch für zwei unabhängige Experimente, jeweils ausgeführt in Dreifachwerten. Es ist der arithmetische Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

4.4.3.2. Die Inositolphosphatakkumulation der TSHR-Mutanten

Für Mutanten mit signifikanten Unterschieden in der G_s-Signalisierung wurde die Inositolphosphatproduktion ohne Stimulation und nach Stimulation mit der maximalen bTSH-Konzentration gemessen. Die basale Inositolphosphatkonzentration der Mutanten zeigt keine Veränderungen gegenüber dem Wildtyp. Bei maximaler bTSH-Stimulation zeigen 9 der 18 getesteten Mutanten eine gesenkte Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Das betrifft folgende TSHR-Mutationen: V424I (V1.42I), Y466A (Y2.56A), L467V (L2.57V), V502A (V3.33A), Y582A (Y5.39A), F594I (F5.51I), F634I (F6.45I), F642I (F6.53I) und Y643A (Y6.54A) (Abbildung 4.8).



Abbildung 4.8: Messung der Inositolphosphatkonzentration (InsP) nach maximaler und ohne Stimulation durch bTSH; HEK293-Zellen wurden transient mit dem TSHR-Wildtyp oder einer Mutante transfiziert. Durch den Einbau von [³H]Inositol wurde die intrazelluläre Inositolphosphatkonzentration gemessen. Die Werte für den mitgeführten Wildtyp wurden mit 1 gleichgesetzt und die Ergebnisse der Mutanten wurden dem entsprechend als das n-fache des Wildtyps angegeben. Gezeigt ist der arithmetische Mittelwert ± Standardabweichung. Resultate mit einem Signifikanzniveau p<0,05 sind durch * gekennzeichnet. A) Inositolphosphatkonzentration ohne Ligandenstimulation B) Inositolphosphatkonzentration nach maximaler Stimulation durch bTSH

4.5. Die Testung der antagonistischen Wirkung von c52 an der TSHR-Mutante M572A

Um die intramolekularen Veränderungen zu verstehen, die in der Umgebung der allosterischen Bindungsregion des TSH-Rezeptors während der Aktivierung beziehungsweise Inaktivierung des Rezeptors ablaufen, ist es von Interesse das Zusammenspiel eines kleinen Moleküls mit den umgebenden Aminosäureseitenketten zu erfassen. Als Beispielmolekül wurde der Antagonist c52 untersucht (Neumann S, 2008).

Es ist bekannt, dass c52 innerhalb der allosterischen Bindungsregion in engem Kontakt zum Tyrosin 667 (Y7.42) an der TMH7 steht (Neumann S, 2008). Laut Modell ist ein weiterer enger Kontaktpunkt von c52 das Methionin an Position 572 in der extrazellulären Schleife 2. Durch den Austausch von Methionin durch Alanin, sollte dieser Kontakt gestört werden. Wie bereits publiziert, führt ein Alanin an dieser Stelle zu einer Absenkung der Basalaktivität (Kleinau G, 2007a). Die Behandlung der Mutante M572A mit dem allosterischen Antagonisten c52 zeigte, dass er hier agonistisch wirkt und zu einer Steigerung der basalen cAMP-Akkumulation um das 12-Fache führt. Beim wildtypischen TSHR verändert c52 die basale cAMP-Produktion auf das 1,5-Fache (Abbildung 4.9).



Abbildung 4.9: Messung der cAMP-Produktion nach Stimulation durch den allosterischen Antagonisten c52; HEK293-Zellen wurden transient mit dem wildtypischen TSHR oder der TSHR-Mutante M572A transfiziert. Mittels Radioimmunoassay wurde die intrazelluläre cAMP-Konzentration nach Stimulation mit c52 bei einer Konzentration von 1×10^{-6} M gemessen. Die Werte wurden auf die jeweils mitgeführte DMSO-Kontrolle bezogen. Angegeben ist der arithmetische Mittelwert \pm Standardabweichung. Die Kennzeichnung mit * gibt ein Signifikanzniveau von p<0,05 an.

4.6. Struktur-Funktions-Beziehungen innerhalb der allosterischen Bindungsregion des TSH-Rezeptors

Im Folgenden wird die räumliche Umgebung derjenigen Positionen dargestellt, an denen in dieser Arbeit konstitutiv aktivierende oder inaktivierende Mutationen gefunden wurden. Dabei wird die Lage der wildtypischen Seitenketten im inaktiven und im aktiven Modell der Transmembrandomäne des TSH-Rezeptors beschrieben. Die Verknüpfung mit den funktionellen Daten der Kontaktpartner wird in den Kapiteln 5.2 und 5.3 diskutiert.

4.6.1. Die Lage konstitutiv aktivierender Mutationen und deren Einfluss auf die Rezeptorfunktion

An fünf Aminosäurepositionen wurden konstitutiv aktivierende Mutationen gefunden. Diese Mutanten sind durch eine erhöhte Liganden unabhängige basale cAMP-Akkumulation gekennzeichnet. Soweit bekannt, sind Werte ab einer Steigerung der basalen cAMP-Produktion auf das 1,5-fache von physiologischer Relevanz (Datenbank: www.ssfa-gphr.de). Diese Aussage beruht auf der experimentellen Charakterisierung pathogener Mutationen die im TSHR und FSHR gefunden wurden. Folgende Mutationen führten in dieser Studie zur konstitutiven Aktivierung des TSH-Rezeptors: V4211 (V1.39I), Y466A (Y2.56A), M637C (M6.48C), M637W (M6.48W), Y643F (Y6.54F) und L645V (L6.56V) (Tabelle 4.3).

Die meisten dieser Mutanten besitzen eine Oberflächenexpression, die mit dem Wildtyp vergleichbar ist. Lediglich die Mutation M637W (M6.48W) bewirkte eine signifikante Verringerung der Rezeptormenge an der Zelloberfläche auf das 0,7-Fache des Wildtyps. Sie führt auch zur höchsten konstitutiven Aktivierung innerhalb dieser Studie, mit dem 9,3-Fachen der Basalaktivität des Wildtyps. Berücksichtigt man den linearen Zusammenhang zwischen Basalaktivität (SBA) vom 12,7-Fachen des Wildtyps. Die verbleibenden konstitutiv aktiven TSHR-Mutanten zeigten eine Erhöhung der Basalaktivität auf das 2,6- bis 3,6-Fache.

Tabelle 4.3: Zusammenfassung der funktionellen Daten konstitutiv aktivierender Mutationen; HEK293-Zellen wurden transient mit dem wildtypischen TSHR oder einer TSHR-Mutante transfiziert. Die Messung der Rezeptormenge an der Zelloberfläche erfolgte durchflusszytometrisch. Mittels Radioimmunoassay wurde die intrazelluläre cAMP-Konzentration in Abhängigkeit von der Konzentration an bovinem TSH gemessen. Die spezifische basale Aktivität (SBA) beschreibt die basale cAMP-Akkumulation nach Normalisierung der Zelloberflächenexpression. Der Einbau von [³H]Inositol diente der Bestimmung der intrazellulären Inositolphosphatkonzentration nach Stimulation mit bovinem TSH. Die Werte für den mitgeführten Wildtyp wurden mit 1 gleichgesetzt und die Ergebnisse der Mutanten wurden dem entsprechend als das n-fache des Wildtyps angegeben. Gezeigt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die EC₅₀-Werte sind als geometrische Mittelwerte mit dem 95%igen Konfidenzintervall angegeben. Resultate mit einem Signifikanzniveau p<0,05 sind durch * gekennzeichnet

Transfi-	Ballesteros & Weinstein Numme- rierung	Ober- flächen-	cAMP-Akkumulation					Inositolphosphat- Akkumulation	
Kon-		expression	Basal	SBA	EC ₅₀	Maximal	Basal	Stimuliert	
strukt		(n-fach Wildtyp)							
Wildtyp		1	1	1	1	1	1	1	
V421I	1.39	1,1 ± 0,1	2,6 ± 0,5*	-	0,5 (0,4 –0,6)	$0,9 \pm 0,0$	0,9 ± 0,0	1,0 ± 0,1	
Y466A	2.56	1,0 ± 0,1	3,6 ± 0,7*	-	12,7 (11,7 –13,7)*	0,5 ± 0,1*	0,9 ±0,1	$0,2 \pm 0,0^{*}$	
M637C	6.48	1,0 ± 0,1	3,3 ± 0,3*	-	0,7 (0,5 - 0,9)	0,9 ± 0,1	1,0 ±0,2	1,3 ± 0,1	
M637W	6.48	0,7±0,1*	9,3 ± 2,2*	12,7 ± 3,1	0,9 (0,6 - 1,3)	0,8 ± 0,1*	0,9 ± 0,0	1,0 ± 0,1	
Y643F	6.54	1,2 ± 0,1	2,6 ± 0,4*	-	0,6 (0,5 - 0,7)	$0,9 \pm 0,1$	0,8 ± 0,0	1,3 ± 0,1	
L645V	6.56	0,8 ± 0,1	2,6 ± 0,4*	-	1,4 (0,9 – 2,1)	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,1	

Die Mutanten V421I (V1.39I), M637C (M6.48C), Y643F (Y6.54F) und L645V (L6.56V) sind mit bovinem TSH ähnlich maximal stimulierbar wie der Wildtyp. M637W (M6.48W) weist eine leicht verringerte maximale cAMP-Konzentration auf. Für Y466A (Y2.56A) ist diese stark herabgesetzt auf das 0,5-Fache des Maximalwertes des Wildtyps. Y466A (Y2.56A) ist ebenfalls durch eine erhebliche Verschlechterung der Signalisierungsempfindlichkeit gekennzeichnet. Für diese Mutante ist eine Steigerung des EC_{50} -Wertes auf das 12,7-Fache des Wildtyps messbar. Sie führt auch zu einer starken Senkung der maximalen Inositolphosphatproduktion auf das 0,2-Fache des Wildtyps.

In Abbildung 4.10 ist die Lokalisation der neu identifizierten konstitutiv aktivierenden Mutationen in einem Modell der allosterischen Bindungsregion des TSH-Rezeptors gezeigt.



Abbildung 4.10: Positionen von konstitutiv aktivierenden Mutationen in der allosterischen Bindungsregion kleiner Moleküle des TSH-Rezeptors (Kleinau & Haas, 2010); Dargestellt ist das homologe Molekülmodell der Transmembrandomäne des TSH-Rezeptors, auf der Grundlage der Kristallstruktur des bovinen Rhodopsins. Rot – publiziert in Kleinau & Haas, 2010; lila – publiziert in Kleinau G, 2007a

Die aus den homologen Molekülmodellen abgeleiteten Seitenkettenkontakte der wildtypischen Aminosäurereste, im inaktiven und im aktiven Zustand, sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst. Im Vergleich zeigen sich teilweise starke Positionsveränderungen während der Aktivierung, deren Bedeutung in Kapitel 5.2 diskutiert wird. Für die jeweiligen wildtypischen Aminosäuren ergeben sich aus dem Modell folgende Orientierungen.

Die Seitenkette des V421 (V1.39) an der TMH1 interagiert mit hydrophoben Aminosäureseitenketten an der TMH2 (L2.57) and TMH7 (L7.40). Mit der Aktivierung wird der Kontakt zur TMH7 gelöst.

Das Y466 (Y2.56) an der TMH2 ist zum T501 (T3.32) an der TMH3 orientiert. Nach Aktivierung steht es auch in Verbindung mit der TMH7.

Tabelle 4.4: Potentielle Interaktionspartner der wildtypischen Aminosäureseitenketten an deren Position konstitutiv aktivierende Mutationen gefunden wurden; Grundlage waren homologe Molekülmodelle der Transmembrandomäne des TSH-Rezeptors basierend auf den Strukturen von Rhodopsin (inaktiver Zustand) und Opsin (aktiver Zustand).

Aminosäure	Ballesteros & Weinstein Nummerierung	Interaktionspartner im inaktiven Zustand	Interaktionspartner im aktivierten Zustand		
V421	1.39	L467 (L2.57) L665 (L7.40)	L467 (L2.57) I470 (I2.60) A471 (A2.61)		
Y466	2.56	T496 (T3.27) T497 (T3.28) F500 (F3.31) T501 (T3.32)	T501 (T3.32) I568 (EZS2) P668 (P7.43)		
M637	6.48	Y667 (Y7.42) N670 (N7.45)	N590 (N5.47) F594 (F5.51)		
Y643	6.54	S659 (S7.34) K660 (K7.35) L663 (L7.38)	T655 (EZS3) K660 (K7.35) L663 (L7.38)		
L645	6.56	L587 (L5.44)	L587 (L5.44)		

Die verbleibenden vier hier gezeigten konstitutiv aktivierenden Mutationen befinden sich an der TMH6. Das M637 (M6.48) liegt im Inneren des transmembranären Helixbündels des TSH-Rezeptors im Raum zwischen TMH3 und TMH7. Es interagiert mit Aminosäuren der TMH7, wie dem Y667 (Y7.42) und dem N670 (N7.45). Im aktiven Modell wendet es sich der TMH5 zu.

Die Seitenkette des Y643 (Y6.54) befindet sich im Bereich zwischen der TMH7 und der extrazellulären Schleife 3. Seine Hydroxylgruppe ist in der Lage eine Wasserstoffbrückenbindung zum Rückgrat oder einer Aminosäureseitenkette der extrazellulären Schleife 3 auszubilden.

Das L645 (L6.56) interagiert direkt mit dem L587 (L5.44) an der TMH5. Diese Verbindung besteht sowohl im inaktiven als auch im aktiven Zustand.

4.6.2. Die Lage konstitutiv inaktivierender Mutationen und deren Einfluss auf die Rezeptorfunktion

Der TSHR besitzt, wie viele andere G-Protein gekoppelte Rezeptoren auch, eine erhöhte Basalaktivität (Cetani F, 2002). Diese kann durch konstitutiv inaktivierende Mutationen vermindert oder sogar aufgehoben werden (Kleinau G, 2008a). An neun in dieser Arbeit untersuchten Aminosäurepositionen wurden konstitutiv inaktivierende Mutationen gefunden.

Das betrifft die Mutationen: V424I (V1.42I), L467V (L2.57V), V502A (V3.33A), Y582A (Y5.39A), Y582F (Y5.39F), F594I (F5.51I), F634I (F6.45I), F642I (F6.53I), Y643A (Y6.54A) und L665V (L7.40V) (Tabelle 4.5). Ihre Basalaktivität bewegt sich im Bereich zwischen dem 0,4-Fachen des Wildtyps und der vollständigen Aufhebung der basalen Aktivität.

Tabelle 4.5: Zusammenfassung der funktionellen Daten konstitutiv inaktivierender Mutationen; HEK293-Zellen wurden transient mit dem TSHR-Wildtyp oder einer TSHR-Mutante transfiziert. Die Messung der Rezeptormenge an der Zelloberfläche erfolgte durchflusszytometrisch. Mittels Radioimmunoassay wurde die intrazelluläre cAMP-Konzentration in Abhängigkeit von der Konzentration an bovinem TSH gemessen. Die spezifische basale Aktivität (SBA) beschreibt die basale cAMP-Akkumulation nach Normalisierung der Zelloberflächenexpression. Der Einbau von [³H]Inositol diente der Bestimmung der intrazellulären Inositolphosphatkonzentration ohne oder nach maximaler Stimulation mit bovinem TSH. Die Werte für den mitgeführten Wildtyp wurden mit 1 gleichgesetzt und die Ergebnisse der Mutanten wurden dem entsprechend als das n-fache Wildtyps angegeben. Gezeiat die arithmetischen des sind Mittelwerte <u>+</u> Standardabweichung. Die EC₅₀-Werte sind als geometrische Mittelwerte mit dem 95% igen Konfidenzintervall angegeben. Resultate mit einem Signifikanzniveau p<0,05 sind durch * gekennzeichnet

Transfi-	Ballesteros & Weinstein Numme- rierung	Ober- flächen-	cAMP-Akkumulation					Inositolphosphat- Akkumulation	
Kon-		expression	Basal	SBA	EC ₅₀	Maximal	Basal	Stimuliert	
strukt		(n-fach Wildtyp)							
Wildtyp		1	1	1	1	1	1	1	
V424I	1.42	1,0 ± 0,1	0,3 ± 0,0*	-	2,6 (1,9 – 3,6)	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,0	$0,5 \pm 0,0^{*}$	
L467V	2.57	0,9 ± 0,1	0,1 ± 0,0*	-	9,6 (8,9 - 10,4)*	1,1 ± 0,1	0,8 ± 0,1	$0,2 \pm 0,0^{*}$	
V502A	3.33	$0,4 \pm 0,0^{*}$	Nd*	-	3,7 (3,4 - 4,0)*	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,0	$0,1 \pm 0,0^{*}$	
Y582A	5.39	0,7 ± 0,1*	0,2 ± 0,0*	0,3 ± 0,1	3,2 (2,2 - 4,5)*	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,1	$0,5 \pm 0,2^{*}$	
Y582F	5.39	0,9 ± 0,1	0,4 ± 0,1*	-	1,6 (1,1 – 2,4)	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,2	
F594I	5.51	0,9 ± 0,1	0,1 ± 0,0*	-	4,5 (4,5 - 4,5)*	$0,9 \pm 0,2$	0,9 ± 0,1	$0,4 \pm 0,0^{*}$	
F634I	6.45	0,8 ± 0,1*	0,1 ± 0,0*	0,2 ± 0,0	6,3 (5,4 – 7,4)*	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,0	$0,2 \pm 0,0^{*}$	
F642I	6.53	0,6 ± 0,1*	0,3 ± 0,1*	0,4 ± 0,1	8,2 (7,5 – 9,0)*	$0,6 \pm 0,0^{*}$	0,9 ± 0,1	$0,1 \pm 0,0^{*}$	
Y643A	6.54	1,0 ± 0,1	0,2 ± 0,0*	-	5,2 (3,9 - 6,9)*	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,2	$0,5 \pm 0,0^{*}$	
L665V	7.40	1,0 ± 0,1	0,4 ± 0,1*	-	1,7 (1,7 – 1,8)	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,1	

Die Mutationen F634I (F6.45I), Y582A (Y5.39A), F642I (F6.53I) und V502A (V3.33A) führen zu einer leichten bis starken Senkung der Oberflächenexpression auf das 0,8bis 0,4-Fache des Wildtyps. Den verbleibenden konstitutiv inaktivierenden Mutanten konnte eine Zelloberflächenexpression zugeordnet werden, die vergleichbar mit dem Wildtyp ist.

Mit Ausnahme der Mutante F642I (F6.53I) zeigen alle konstitutiv inaktiven Mutanten in dieser Arbeit ein maximales Stimulationsniveau entsprechend dem Wildtyp. Die Mutanten L467V (L2.57V) und F642I (F6.53I) zeichnen sich zudem durch eine stark gesenkte Signalisierungsempfindlichkeit aus. Ihr EC_{50} -Wert liegt bei dem 9,6-beziehungsweise 8,2-Fachen des Wildtyps.

Die meisten dieser konstitutiv inaktivierenden TSHR-Mutationen führen zu einer verringerten Inositolphosphatproduktion nach Stimulation mit bovinem TSH.

Tabelle 4.6 fasst die potentiellen intramolekularen Kontakte derjenigen wildtypischen Aminosäurereste zusammen, an deren Position in dieser Arbeit konstitutiv inaktivierenden Mutationen gefunden wurden. Diese ergeben sich aus den homologen Molekülmodellen der Transmembrandomäne des TSH-Rezeptors, im inaktiven und im aktiven Zustand. In Kapitel 5.3 werden die Wechselbeziehungen der Kontaktpartner detailliert erörtert, die sich wie folgt darstellen.

Die Seitenkette des V424 (V1.42) weist in den Innenraum des Helixbündels, zwischen die Transmembranhelizes 2 und 7. Das L467 (L2.57) der TMH2 interagiert mit dem V424 (V1.42) der TMH1. Das V502 (V3.33) verbindet die TMH3 mit der TMH4. Das Y582 (Y5.39) der TMH5 hat Kontakt zur TMH4 und zur extrazellulären Schleife 2. Im inaktiven Modell hat das F594 (F5.51) der TMH5 Kontakt zum F634 (F6.45) der TMH6 und zum V509 (V3.40) der TMH3. Im aktiven Modell kann es mit dem M637 (M6.48) der TMH6 interagieren. Das F634 (F6.45) der TMH6 ist, im inaktiven und im aktiven Modell, zur TMH5 hin orientiert und vermittelt über die aromatische Wechselwirkung mit dem F594 (F5.51) den Kontakt beider Helizes. Die Seitenkette des F642 (F6.53) zeigt nach außen und hat dem entsprechend keinen intramolekularen Bindungspartner. Zwischen der TMH7 und der extrazellulären Schleife 3 liegt das Y643 (Y6.54). Der Hydroxylgruppe dieses Tyrosins ist es Wasserstoffbrückenbindung möglich, eine zum Rückgrat oder einer Aminosäureseitenkette der extrazellulären Schleife 3 einzugehen. Im inaktiven Modell ist das L665 (L7.40) in intensivem Kontakt mit Aminosäureseitenketten der TMH1. Es interagiert mit L417 (L1.35), V420 (V1.38) und V421 (V1.39). Nach Aktivierung des Rezeptors zeigt seine Seitenkette nach außen in die Membranebene.

Tabelle 4.6: Potentielle Interaktionspartner der wildtypischen Aminosäureseitenketten an deren Position konstitutiv inaktivierende Mutationen gefunden wurden; Grundlage waren homologe Molekülmodelle der Transmembrandomäne des TSH-Rezeptors basierend auf den Strukturen von Rhodopsin (inaktiver Zustand) und Opsin (aktiver Zustand).

Aminosäure	Ballesteros & Weinstein Nummerierung	Interaktionspartner im inaktiven Zustand	Interaktionspartner im aktiven Zustand
V424	1.42	L467 (L2.57)	L467 (L2.57) L669 (L7.44)
L467	2.57	V421 (V1.39) L424 (L1.42) S425 (S1.43)	V421 (V1.39) V424 (V1.42) S425 (S1.53)
V502	3.33	L552 (L4.56) A553 (A4.57)	L552 (L4.56) A553 (A4.57)
Y582	5.39	L555 (L4.59) P556 (P4.60) I560 (EZS2) S561 (EZS2) M572 (EZS2)	L552 (L4.56) S561 (EZS2) P571 (EZS2)
F594	5.51	F634 (F6.45) V509 (V3.40)	F634 (F6.45) M637 (M6.48)
F634	6.45	F594 (F5.51)	F594 (F5.51)
F642	6.53	-	-
Y643	6.54	S659 (S7.43) K660 (K7.35) L663 (L7.38)	T655 (EZS3) K660 (K7.35) L663 (L7.38)
L665	7.40	L417 (L1.35) V420 (V1.38) V421 (V1.39)	-

5. Diskussion

Mit dieser Arbeit liegen erstmals Mutationsdaten für alle Aminosäurepositionen der allosterischen Bindungsregion des TSH-Rezeptors vor. Beschreibungen dieser Art sind nur für wenige andere Rezeptoren bekannt, beispielsweise für die Bindungsstelle am olfaktorischen Rezeptor, der sensitiv für Eugenol ist (Katada S, 2005). Um die allosterische Bindungsregion des TSH-Rezeptors zu charakterisieren, wurden für diese Arbeit diejenigen Aminosäuren ausgewählt, die die Bindungstasche auskleiden und für die bis dahin noch keine funktionellen Daten vorlagen. Damit sollte ein Beitrag zum molekularen Verständnis des Aktivierungsmechanismus G-Protein gekoppelter Rezeptoren geleistet werden. Im Fokus lag die Beurteilung der Signalisierungseigenschaften dieser transmembranären Region und die Einschätzung ihres pharmakologischen Potentials. Dieses Wissen ist grundlegend für Hypothesen über Modulationsmöglichkeiten im Bereich der allosterischen Bindungsregion des TSH-Rezeptors, und könnte eine Intervention bei pathogener Aktivierung oder Inaktivierung des Rezeptors ermöglichen.

Im Folgenden wird besonders auf zwei Mutationstypen eingegangen die in dieser Studie gefunden wurden, konstitutiv aktivierende und konstitutiv inaktivierende Mutationen, und welche strukturellen und mechanistischen Interpretationsmöglichkeiten diese eröffnen. Im Anschluss wird ihre Verteilung innerhalb der allosterischen Bindungstasche sowie ihr Zusammenspiel mit bereits bekannten allosterischen Liganden des TSH-Rezeptors diskutiert.

Da der Hauptsignalisierungsweg des TSH-Rezeptors die Aktivierung von G_s und die damit verbundene Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels ist, beziehen sich die in diesem Kapitel getroffenen Aussagen auf diesen Pfad. Betrifft die Diskussion andere Signalisierungswege, wird darauf explizit hingewiesen.

5.1. Die Bedeutung konstitutiv aktivierender und konstitutiv inaktivierender Mutationen

Die Aktivierung des TSH-Rezeptors ist unter anderem durch das Hormon TSH, durch allosterische Liganden oder durch Mutationen möglich (Rodien P, 2003; Kleinau G, 2004; Moore S, 2006).

Aminosäurenaustausche, die die Aktivität des Rezeptors verändern, geben dabei Hinweise auf bestehende Struktur-Funktions-Beziehungen, die den Signalisierungsmechanismus **G-Protein** betreffen gekoppelter Rezeptoren (Schöneberg Τ, 2004; Kleinau G, 2008a; Seifert R, 2002). Diese Strukturveränderungen sind hilfreich, um einen Einblick in die Funktionsanteile der jeweiligen wildtypischen Aminosäurereste zu bekommen. Damit ist es möglich ihren Beitrag am Aufbau und der Stabilisierung der Rezeptorstruktur, sowie ihre Beteiligung an der intramolekularen Signalübertragung aufzuklären.

Die Aktivierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren ist ein komplexer Prozess der sowohl die Lösung struktureller Einschränkungen des inaktiven Zustandes beinhaltet, als auch der Knüpfung neuer Interaktionen bedarf, die die aktive Konformation stabilisieren (Parnot C, 2002). Auf Grundlage zunehmender Informationen über die dreidimensionale Struktur G-Protein gekoppelter Rezeptoren, können die Aktivierungsintermediate als schrittweises Ineinandergreifen von Proteindomänen interpretiert werden (Hofmann KP, 2009). Der damit verbundene Prozess der Neuorientierung der Helizes zueinander beruht auf sequentiellen Mechanismen, wie Studien am Rhodopsin demonstrieren (Ye S, 2010).

Der TSHR weist, gleichso wie fast 20% aller G-Protein gekoppelten Rezeptoren, eine Liganden unabhängige permanente G-Protein Stimulation auf (Parnot C, 2002; Seifert R, 2002; Cotecchia S, 2003; Milligan G, 2003; Bond RA, 2006). Diese Basalaktivität des TSH-Rezeptors kann durch Mutationen herab oder herauf reguliert werden (Cotecchia S, 2003; Schöneberg T, 2004; Holst B, 2004; Kristiansen K, 2004). Konstitutiv aktivierende Mutationen erhöhen die basale Aktivität des Rezeptors und konstitutiv inaktivierende Mutationen senken diese (Abbildung 5.1).

Konstitutiv inaktivierende Mutationen sind durch eine gesenkte Basalaktivität gekennzeichnet. Das heisst, sie weisen eine verringerte Liganden unabhängige Rezeptoraktivität auf. Sie können ebenfalls die darüber hinaus gesteigerte Basalaktivität von konstitutiv aktivierenden Mutationen senken (Kleinau G, 2008a). Für den intramolekularen Signalfluss sind dabei folgende Szenarien denkbar.

 Der basale Zustand wird durch die wildtypische Seitenkette stabilisiert. Die eingeführte Mutation unterbricht diese Interaktion und der Rezeptor fällt in einen inaktiveren Zustand zurück.



2. Die mutierte Aminosäure knüpft Kontakte, die einen inaktiven Zustand stabilisieren.

Abbildung 5.1: Schema von möglichen Aktivierungszuständen des TSH-Rezeptors; Ohne Stimulation mit dem natürlichen Liganden TSH besitzt der Wildtyp bereits eine über den Grundzustand R_o hinausgehende basale Aktivität R^{*basal}. R* bezeichnet das maximale Aktivitätsniveau des TSH-Rezeptors, welches beispielsweise durch Bindung des Hormons TSH erreicht werden kann. Konstitutiv aktivierende oder konstitutiv inaktivierende Mutationen steigern bzw. senken die basale Aktivität des TSH-Rezeptors (R*^v bzw. R*^x).

Konstitutiv aktivierende Mutationen bewirken eine Veränderung der Rezeptorstruktur zu einer aktiveren Konformation hin. Zwei mögliche intramolekulare Wirkungsweisen werden dabei diskutiert.

- Sie stören Kontakte von Aminosäureseitenketten, die die basale Konformation des Rezeptors aufrecht erhalten. Die Destabilisierung dieses Netzwerkes löst eine Verschiebung des Gleichgewichts zu einer aktiveren Rezeptorkonformation aus.
- Wenn der entsprechende wildtypische Aminosäurerest nicht an der Aufrechterhaltung der Basalaktivität beteiligt ist, so knüpft der substituierte Rest neue Verbindungen, die an der Stabilisierung einer aktiveren Struktur des Rezeptors beteiligt sind.

Diese Möglichkeiten treffen auch auf die Rezeptoraktivierung zu, die durch die allosterische Bindung von kleinen Molekülen hervorgerufen wird (Parnot C, 2002,
Kobilka BK, 2007). Ein allosterischer Agonist kann demzufolge entweder intramolekulare Interaktionen zerstören, die den inaktiven Zustand festhalten, oder er ermöglicht die Ausbildung neuer Wechselwirkungen, welche den aktiven Zustand stabilisieren. Ein allosterischer Antagonist sorgt dafür, dass die inaktive bzw. basale Rezeptorkonformation stabilisiert wird.

Somit stellen die auskleidenden wildtypischen Aminosäurereste der Bindungsregion, an deren Position konstitutiv inaktivierende oder konstitutiv aktivierende Mutationen gefunden wurden, auch potentielle Angriffsorte für kleine aktivitätsmodulierende Moleküle, wie Antagonisten oder Agonisten, dar. Beide Mutationstypen haben wir in der hier untersuchten allosterische Bindungsregion des TSH-Rezeptors gefunden.

5.2. Konstitutiv aktivierende Mutationen in der Bindungsregion kleiner Molekülliganden des TSH-Rezeptors

Konstitutiv aktivierende Mutationen des TSH-Rezeptors sind die Hauptursache nicht autoimmun bedingter Hyperthyreose. Sie beruht auf der verstärkten permanenten Aktivierung der G_s-Signalisierung und in einigen Fällen der G_q-Signalisierung (Duprez L, 1998; Parma J, 1994). Die Liganden unabhängige Aktivität von G-Protein gekoppelten Rezeptoren ist nicht nur für den TSHR beschrieben, sondern auch für zahlreiche andere G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Liebermann C, 2004; Rosenbaum DM, 2009; Seifert R, 2002; Smit MJ, 2007). Verglichen mit den beiden anderen Glykoproteinhormonrezeptoren, FSHR und LHCGR, welche keine basale Aktivität zeigen, ist der TSHR deshalb weitaus empfänglicher und sensitiver für konstitutive Aktivierung durch Mutationen (Cetani F, 1996; Dufau ML, 1998; Parma J, 1993; Simoni M, 1997; Szkudlinski MW, 2002).

Die Bestimmung dieser konstitutiven Aktivität von TSHR-Mutanten *in vitro* ist nicht trivial, insbesondere in Grenzfällen mit geringfügiger Erhöhung der basalen Aktivität (Müller S, 2009). Voneinander abweichende Ergebnisse können die Folge unterschiedlicher experimenteller Bedingungen sein. Hauptsächlich ist dabei die lineare Korrelation der Zelloberflächenexpression des TSH-Rezeptors mit der Basalaktivität zu berücksichtigen (Vlaeminck-Guillem V, 2002). Deshalb ist der Vergleich der Basalaktivitäten zwischen Mutante und Wildtyp nur unter Berücksichtigung der Oberflächenexpression sinnvoll (Müller S, 2010). Für Mutanten mit signifikant veränderter Oberflächenexpression gegenüber dem Wildtyp wurde

dieser Parameter, in die Ermittlung der spezifischen basalen Aktivität, mit einbezogen.

Für den TSHR sind etliche konstitutiv aktivierende Mutationen beschrieben, die sowohl natürlich vorkommen, als auch durch zielgerichtete Mutagenese eingeführt wurden (Kleinau G, 2009; Rodien P, 2003). Obwohl konstitutiv aktivierende Mutationen in allen Bereichen des TSH-Rezeptors bekannt sind, befindet sich der überwiegende Teil natürlich vorkommender konstitutiv aktivierender Mutationen in den Transmembranhelizes 3 und 6 (Datenbank: www.ssfa-gphr.de). Im Bereich der allosterischen Bindungsregion waren bis dahin nur zwei konstitutiv aktivierende Mutationen an den Positionen I640 (I6.51) und I568 (EZS2) bekannt (Kleinau G, 2007a).

Als besonders signalisierungssensitiv gilt der Bereich zwischen den Transmembranhelizes 5 und 6, da hier die größten Helixbewegungen im Vergleich der Kristallstrukturen des inaktiven Rhodopsin und des aktiven Opsin sichtbar sind (Deflorian F, 2008; Park JH, 2008). Diese beiden Strukturen sind die Grundlage der zwei gegenübergestellten Homologiemodelle der Transmembrandomäne des TSH-Veraleich räumlichen Rezeptors. Der der Orientierung einzelner im aktiven Aminosäureseitenketten, Modell und im inaktiven Modell der Transmembrandomäne des TSH-Rezeptors, weist auf teilweise starke Positionsänderungen während des Aktivierungsprozesses hin (Tabelle 4.4).

Im Folgenden werden die räumlichen Orientierungen ausgewählter Aminosäureseitenketten im Modell näher betrachtet, an deren Position wir konstitutiv aktivierende Mutationen gefunden haben. Die funktionellen Ergebnisse der Mutationen werden im Kontext der beiden Strukturmodelle für einen inaktiven und aktiven Zustand des TSH-Rezeptors diskutiert.

Die Seitenkette des V421 (V1.39) der TMH1 liegt im inaktiven Modell im Raum zwischen TMH2 und TMH7 und hat Kontakt zu den hydrophoben Aminosäurenseitenketten L665 (L7.40) und L467 (L2.57) (Abbildung 5.2A). Nach Aktivierung wird der Kontakt zur TMH7 gelöst und sie wendet sich im aktiven Modell der TMH2 zu. Dort entsteht der Kontakt zu weiteren hydrophoben Seitenketten der TMH2, wie zum I470 (I2.60) und zum A471 (A2.61) (Abbildung 5.2B). Die Mutation V421I (V1.39V), mit ihrer verlängerten Seitenkette, führt zur konstitutiven Aktivierung des Rezeptors. Wahrscheinlich ändert das eingeführte größere Isoleucin, zum

Beispiel durch sterische Hinderung im Zusammenspiel mit der Seitenkette L665 (L7.40) der TMH7, das Helixarrangement in die gleiche Richtung, wie es auch während des Aktivierungsprozesses geschieht (Abbildung 5.2A). Das wird unterstützt durch komplementäre Mutationen an der TMH2 und TMH7. Die Mutationen L665V (L7.40V) und L467V (L2.57V), mit ihren verkürzten Seitenketten, bewirken eine Verringerung der basalen Aktivität. L467V (L2.57V) führt zusätzlich zu einem Rückgang der Signalisierungsempfindlichkeit. Hier ist also nicht nur ein Verlust der basal aktiven Konformation vorhanden, sondern auch die Ausbildung der aktiven Konformation beeinträchtigt. Bei L665V (L7.40V) war dieser Effekt nicht zu erwarten, da die Leucinseitenkette im aktiven Modell nach außen zeigt.



Abbildung 5.2: Schematische Darstellung der Orientierung der Seitenkette des V421 (V1.39) im inaktiven oder aktiven Modell der TMD des TSH-Rezeptors basierend auf den Strukturen von Rhodopsin oder Opsin; A) Das V421 (V1.39) befindet sich im inaktiven Modell zwischen den Transmembranhelizes 2 und 7 und hat Kontakt zu den Seitenketten des L665 (L7.40) und L467 (L2.57). Der graue Pfeil zeigt die vermutliche Bewegungsrichtung der TMH1, die durch die konstitutiv aktivierende Mutation V421I (V4.39I) ausgelöst wird. **B)** Im aktiven Modell ist das V421 (V1.39) zur TMH2 hin orientiert, mit Verbindung zum L467 (L2.57), I470 (I2.60) und A471 (A2.61).

Das Y466 (Y2.56) an der TMH2 ist hoch konserviert innerhalb der Glykoproteinhormonrezeptoren und den strukturell eng verwandten LG-Rezeptoren 2, 4, 7 und 8 (Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor). Die Einführung von Alanin an Position 466 führt zur Erhöhung der basalen Aktivität aber auch zur stärksten Verringerung der Signalisierungsempfindlichkeit und der maximalen Aktivität innerhalb dieser Studie. Die Seitenkette des Y466 (Y2.56) ist zur TMH3 hin gelegen und hat Kontakt zu den Seitenketten des T496 (T3.27), A497 (A3.28), F500 (F3.31) und T501 (T3.32) (Abbildung 5.3A). Während der Aktivierung lockert sich der enge Kontakt zur TMH3 und das Y466 kann auch mit dem P668

(P7.43) der TMH7 und dem I568 der extrazellulären Schleife 2 interagieren (Abbildung 5.3B). Durch die starke Verkürzung der Seitenkette in der Mutante Y466A (Y2.56A) geht der Kontakt zur TMH3 verloren und ermöglicht somit den Übergang in eine aktivere Konformation (Abbildung 5.3A).



Abbildung 5.3: Schematische Darstellung der Orientierung der Seitenkette des Y466 (Y2.56) im inaktiven oder aktiven Modell der Transmembrandomäne des TSH-Rezeptors basierend auf den Strukturen von Rhodopsin oder Opsin; A) Im inaktiven Zustand ist das Y466 (Y2.56) im engen Kontakt mit der TMH3 und interagiert mit den Seitenketten von T496 (T3.27), A497 (A3.28), F500 (F3.31) und T501 (T3.32). Der graue Pfeil weist auf die potentielle Bewegungsrichtung hin, die durch die konstitutiv aktivierende Mutation Y466A (Y2.56A) ausgelöst wird. B) Im aktiven Modell zeigt die Seitenkette des Y466 (Y2.56) in den Raum zwischen TMH3 und 7, wo Kontakt zu den Aminosäureresten T501 (T3.32) und P668 (P7.43) besteht.

Dieser Mechanismus wird durch die Tatsache untermauert, dass der Austausch des interagierenden Threonin 501 (T3.32) an der TMH3 durch Alanin ebenfalls die basale Aktivität steigert (Kleinau & Haas, 2010). Beide Mutanten weisen aber auch darauf hin, dass die Hydroxylgruppe, mit ihrem Potential Wasserstoffbrückenbindungen aufzubauen, wichtig für die Aufrechterhaltung der basal aktiven Konformation ist. Andererseits ist durch die Mutante Y466A (Y2.56A), mit seiner stark verkürzten Seitenkette, der Kontakt zur TMH7 in der aktiven Struktur nicht mehr adäquat möglich. Die Erhöhung ihres EC₅₀-Wertes um mehr als das 10-fache und die gesenkte Maximalaktivität spiegeln die wesentliche Rolle dieser Position bei der Stabilisierung der aktiven Konformation wider.

Für das Y643 (Y6.54) wurden sowohl konstitutiv aktivierende, als auch inaktivierende Mutationen gefunden. Die Seitenkette des Y643 (Y6.54) liegt im inaktiven Zustand zum Zwischenraum der TMH7 hin und hat Kontakt zu den Seitenketten S659 (S7.34), K660 (K7.35) und L663 (L7.38). Im aktiven Modell ist auch die Verbindung zur extrazellulären Schleife 3 möglich. Je nachdem, ob an Position 643 ein Alanin oder Phenylalanin eingeführt wurde, kommt es zur konstitutiven Inaktivierung oder konstitutiven Aktivierung des Rezeptors. Das Fehlen der Hydroxylgruppe bei der Mutante Y643F (Y6.54F) stabilisiert eine aktivere Konformation, wahrscheinlich über die Interaktion mit dem Rückgrat der extrazellulären Schleife 3. Verkürzt man die Seitenkette aber auf ein Alanin (Y643A, Y6.54A), nimmt die SO Signalisierungsempfindlichkeit ab und der Basalwert sinkt. Entsprechendes ist auch für den Bindungspartner K660 (K7.35) an der TMH7 bekannt. Verkürzt man hier die Seitenkette zu Alanin, Aspartat oder Glutamat, so führt das jeweils zu einer Reduktion der maximalen Signalisierung (Claus M, 2005a). Die Sensitivität der (Y6.54) gegenüber geringen Veränderungen Seitenkette des Y643 der Seitenkettengröße ist Ausdruck der dichten Packung der umgebenden Aminosäuren in dieser signalisierungssensitiven Region. Bereits das Fehlen der Hydroxylgruppe in der TSHR-Mutante Y643F (Y6.54F) führt zu einer Destabilisierung des basalen Zustandes. Die Bedeutung dieser Aminosäureposition für eine mögliche Modulierung des Aktivierungsmechanismus innerhalb der allosterischen Bindungstasche wird dadurch unterstrichen, dass an dieser Stelle die Rezeptoraktivität sowohl hoch, als auch herab regulierbar ist, wie die konstitutiv inaktivierende Mutation Y643A (Y6.54A) zeigt.

Die Verkürzung des L645 (L6.56) an der TMH6 zu Valin führt zur konstitutiven Aktivierung des TSH-Rezeptors. Seine Seitenkette liegt im inaktiven und auch im aktiven Modell zur TMH5 hin. Es interagiert direkt über hydrophobe Wechselwirkungen mit dem L587 (L5.44). Tauscht man einen dieser beiden Interaktionspartner gegen Valin aus, so führt bereits die moderate Verkürzung einer dieser beiden Seitenketten zur Störung des Zusammenspiels, was jeweils die konstitutive Aktivierung des Rezeptors zur Folge hat (Kleinau & Haas, 2010). Eine derartige Signalisierungssensibilität an dieser Position ist auch für den TRH-Rezeptor bekannt (Deflorian F, 2008).

5.2.1. Die konstitutiv aktiven TSHR-Mutanten M637C und M637W

5.2.1.1. Aktivierungsmodell für Position 6.48

Bei 303 von 372 G-Protein gekoppelten Rezeptoren der Klasse A befindet sich an Position 6.48 ein Tryptophan (Abbildung 5.4) (Sum C, 2009).

	Rezeptor	ТМН6		
	1 lshrhu	Ι DTKTAKKMATI TET <mark>D</mark> ET		
динк	1 1shrmou			
	1 1shrnia			
	1 1shrrat			
	1 fshrhum			
	1 fshrhor			
	1 fshrn1a			
	1 fshrrat		PTSEEATSASI KVP	
	l tshrhu l	DTKIAKRMAVLIFT	PISFYALSAILNKP	
	l tshrcan l	DTKIAKRMAVLIFT	PISFYALSALMNKP	
	l tshrmou l	IDTKIAKRMAVLIFT <mark>D</mark> FM	PISFYALSALMNKP	
	l tshrrat l	DTKIAKRMAVLIFT <mark>D</mark> FM	PISFYALSALMNKP	
	V2R HUMAN			
	vlar_human	KIRTVKMTFVIVTAVIV	W/PFFIIQMWSVWDPM	
	5H1D_HUMAN	ERKATKILGIILGA	WEPFFVVSLVLPICRD	
	OPSX_HUMAN	QIDVTKMSVIMICM	WS PYSIVCLWASFGDP	
	cblr_human	DIRLAKTLVLILVV	W PLLAIMVYDVFGKM	
	PER1_HUMAN	DVEMVGQLVGIMVV <mark>S</mark> CI	W PMLVLVALAVGGWS	
	PF2R_HUMAN	HLEMVIQLLAIMCV <mark>S</mark> CI	W PFLVTMANIGINGN	
	brbl_human	DRKTTALILTLVVA <mark>S</mark> LV	W/ PYHFFAFLEFLFQV	
	gcy6_human	KTKAIRLVLIVVIA <mark>S</mark> LL		
	TA2R_HUMAN	EVEMMAQLLGIMVV <mark>A</mark> SV		
	opsr_human	EKEVTRMVVVMIFA <mark>Y</mark> CV	W PYTFFACFAAANPG	
	ckr5_human	RHRAVRLIFTIMIV <mark>Y</mark> FL	W/ PYNIVLLLNTFQEF	
	ckry_mouse	RHRAVRLIFAIMIG <mark>Y</mark> FL	W PYNIVLFLTTFQES	
	gpr5_human	RHRTVKLIFAIVVA <mark>Y</mark> FL		
	v28_human_1	VAKTVKMTLVIVIV <mark>]</mark> VL	W/PFFLVQLWAAWDPE	
	gpr7_human	KKRVTFLVVAILAV <mark>C</mark> LL	W PYHLSTVVALTTDL	

Abbildung 5.4: Ausschnitt aus einem Alignment der TMH6 verschiedener G-Protein gekoppelter Rezeptoren der Klasse A; In circa 70% der Fälle befindet sich an Position 6.48 (rotes Rechteck) ein Tryptophan. Im TSHR, wie auch in den anderen Glykoproteinhormonrezeptoren (GPHR), ist hier ein Methionin.

Im Rhodopsin befindet sich hier das W265 (W6.48). Dieser Seitenkette wird im Prozess der Rezeptoraktivierung eine Schlüsselrolle zugeschrieben. Während des Aktivierungsverlaufs soll der aromatische Ring des Tryptophans, ähnlich einem Kippschalter, in Richtung TMH5 umschlagen. Diese aktive Konformation wird durch Interaktion mit einer Phenylalaninseitenkette an der TMH5 gehalten (Schwartz TW, 2006).

In allen Glykoproteinhormonrezeptoren befindet sich jedoch an dieser Position 6.48 ein Methionin (Abbildung 5.4). Um zu überprüfen, ob dieser Position im TSHR ebenfalls eine signalisierungssensitive Funktion zukommt, wurden zwei Mutanten erzeugt. Zum einen wurde anstelle des Methionins das hochkonservierte Tryptophan eingefügt. Zum anderen wurde es gegen Cystein ausgetauscht, dessen kürzere Seitenkette ebenfalls ein Schwefelatom, wie das Methionin, besitzt.

Beide Mutationen führen im TSHR zur konstitutiven Aktivierung. Die Erhöhung der Basalaktivität der Mutante M637W (M6.48W) ist sogar fast viermal so hoch wie die, die durch die Mutation M637C (M6.48C) hervorgerufen wird (Tabelle 4.3). Damit ist die Mutation M637W (M6.48W), mit einer 12-fachen Erhöhung der spezifischen basalen Aktivität bezogen auf den Wildtyp, die stärkste bekannte konstitutiv aktivierende Mutation in der allosterischen Bindungsregion des TSH-Rezeptors.

Im Modell ragt die Seitenkette des M637 (M6.48) ins Innere des Helixbündels des TSH-Rezeptors und interagiert im inaktiven Zustand mit dem Y667 (Y7.42), N670 (N7.45) und S505 (N3.36) und stabilisiert somit den basalen Zustand. Mit der Aktivierung des Rezeptors verlässt die Seitenkette des Methionins diese stabilisierenden Interaktionen an der TMH7 und wendet sich der TMH5 zu. Dort hat sie Kontakt zum F594 (F5.51), A593 (A5.50) und N590 (N5.47).

Der Vergleich der Aminosäureseitenketten in der räumlichen Umgebung der Position 6.48 in der Struktur des Rhodopsins und im Modell des TSH-Rezeptors zeigt, dass das Tryptophan des Rhodopsins von kleineren Aminosäureresten umgeben ist, während das Methionin im TSHR von größeren Seitenketten eingeschlossen wird.

Im Rhodopsin hat die Tryptophanseitenkette durch die kleineren Interaktionspartner A295 (A7.42) und S298 (S7.45) ausreichend Raum (Abbildung 5.5). Im TSHR-Modell sitzen an den korrespondierenden Positionen mit dem Y667 (Y7.42) und dem N670 (N7.45) jeweils größere Interaktionspartner. Durch den Austausch von Methionin zu Tryptophan tritt eine größere Seitenkette an den Platz des Methionins. In der TSHR-Mutante M637W (M6.48W) stößt das eingeführte Tryptophan mit seinen voluminöseren Gegenspielern zusammen und löst damit die Neuorientierung der Tryptophanseitenkette in Richtung TMH5 aus. Das eingeführte Tryptophan an Position 637 (6.48) kann nun mit dem F594 (F5.51) der TMH5 und mit dem V509 (V3.40) der TMH3 interagieren und damit eine aktivere Rezeptorkonformation stabilisieren (Abbildung 5.6).



Abbildung 5.5: Überlagerung des homologen Modells der Transmembrandomäne des TSH-Rezeptors im inaktiven Zustand (Aminosäureseitenketten in rot) mit ausgewählten Aminosäureresten der Strukturvorlage des bovinen Rhodopsins (Aminosäureseitenketten in orange) (Kleinau & Haas, 2010); An Position 6.48 der TMH6 befindet sich im TSHR ein Methionin und im Rhodopsin ein Tryptophan, welches eine größere Seitenkette besitzt. Die Aminosäurereste die im Rhodopsin mit dem W265 (W6.48) interagieren sind die relativ kleinen Seitenketten des A295 (A7.42) und S298 (S7.45) der TMH7. Im TSHR stehen dem M637 (M6.48) die größeren Aminosäurereste Y667 (Y7.42) und N670 (N7.45) gegenüber. Die Einführung des Tryptophans an Position 637 (M6.48W) des TSH-Rezeptormodells, lässt diese Seitenkette mit dem Tyrosinrest 667 (Y7.42) zusammenstoßen.

In der Struktur einer konstitutiv aktiven Mutante des Rhodopsins ist diese Helixbewegung ebenfalls zu erkennen. Mit der Isomerierung des Retinals wird simultan das W265 (W6.48) aus seiner Grundposition entlassen und bewegt sich in Richtung TMH5 (Standfuss J, 2011). Erst damit wird die Bewegung der TMH6 zur aktiven Konformation hin ermöglicht. Desweiteren weisen auch spektroskopische Untersuchungen auf Veränderungen in der Umgebung des W286 (W6.48) im β -Adrenorezeptor hin (Ahuja S, 2009). Diese Daten unterstreichen die auf Grundlage der TSHR-Mutante M637W (M6.48W) angenommene Beteiligung dieser Seitenkette an der Ausbildung der aktiven Struktur.



Abbildung 5.6: Homologes Molekülmodell der Transmembrandomäne des TSH-Rezeptors mit eingefügter Mutation M637W (M6.48W) (orange Helizes) in der TMH6 und mit wildtypischer Sequenz (graue Helix); Es kommt zur Rotation und Verschiebung der TMH6 aufgrund räumlicher Abstoßung zwischen dem Y667 (Y7.42) und dem Tryptophan der Mutante M637W (M6.48W) (rot).

Mit dem Austausch zu Cystein in der Mutante M637C (M6.48C) tritt eine kleinere Aminosäure an den Platz des Methionins. Die konstitutive Aktivität dieser Mutante zeigt, dass das M637 (M6.48) auch eine Funktion bei der Stabilisierung des inaktiven Zustandes hat. Die Störung dieser Wechselwirkung entlässt die TMH6 in eine aktivere Konformation. Die funktionellen Daten der Mutanten Y667A/F (Y7.42A/F) unterstützen diese Annahme. M637 (M6.48) interagiert mit dem Y667 (Y7.42) der TMH7 im inaktiven Zustand. Die Unterbrechung ihrer Wechselwirkung durch die Mutation Y667A (Y7.42A) führt gleichfalls zu einer gesteigerten Basalaktivität (Kleinau & Haas, 2010). Die Mutante Y667F (Y7.42F) verhält sich im Vergleich dazu wie der wildtypische Rezeptor. Das heißt, die Hydroxylgruppe allein trägt nicht entscheidend zu dieser Interaktion bei. Der aromatische Charakter, entsprechend der konstitutiv aktiven Mutante Y667A (Y7.42A), ist dem gegenüber eine Determinante dieses Kontaktes.

5.2.1.2. Die Wechselwirkung der TSHR-Mutanten M637C und M637W mit kleinen Molekülliganden

Die Seitenkette des M637 (M6.48) hat im Modell Kontakt zu den allosterischen Agonisten org41841 und c2 (Kleinau & Haas, 2010; Haas & Kleinau 2011). Die Testung von c2 an den TSHR-Mutanten M637C (M6.48C) und M637W (M6.48W) zeigte, dass die Aktivierung der Rezeptoren in beiden Fällen möglich ist. Das maximale Aktivitätsniveau der Stimulation mit c2 ist bei beiden Mutanten mit dem Wildtyp vergleichbar. Mit dem Austausch des Methionins durch Cystein tritt eine kleinere Seitenkette an diese Stelle, welche die Aktivierung des Rezeptors durch c2 nicht beeinflusst. Durch die Mutation M637W (M6.48W) ist jedoch ein starker Anstieg des EC_{50} -Wertes zu verzeichnen (Kleinau & Haas, 2010). Die Größe der eingeführten Tryptophanseitenkette ist dafür ursächlich. Diese ragt in die Bindungsstelle hinein und stört die Interaktion mit dem Agonisten (Abbildung 5.7). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der Kontakt von c2 zum M637

(M6.48) wesentlicher Bestandteil des Aktivierungsmechanismus ist.



Abbildung 5.7: Modell der Transmembrandomäne des TSH-Rezeptors im aktiven Zustand, basierend auf der Struktur von Opsin, mit dem gebundenen allosterischen Agonist c2 (Kleinau & Haas, 2010); Gezeigt ist die Überlagerung der Aminosäureseitenketten der Mutanten M637W (M6.48W) und M637C (M6.48C) sowie des Wildtyps. Der kleinere Cysteinrest beeinflusst die Bindung des Liganden nicht. Die voluminösere Tryptophanseitenkette ragt deutlich in die allosterische Bindungsregion (gelb) hinein und behindert damit die Interaktion des Liganden mit dem Rezeptor (roter Pfeil).

5.3. Konstitutiv inaktivierende Mutationen in der Bindungsregion kleiner Molekülliganden des TSH-Rezeptors

Ihrer Einteilung nach können Mutationen inaktivierend auf die Rezeptorfunktion wirken durch Defekte der Biosynthese, der Translokation zur Zelloberfläche, der Ligandenbindung oder der Rezeptoraktivierung (Tao Y, 2006).

Zur Untersuchung von Struktur-Funktions-Beziehungen der innerhalb Transmembrandomäne sind Mutationen die die Rezeptoraktivierung modifizieren favorisiert. Mit anderen Worten, Veränderungen der Transkription und Translation, sowie der Proteinfaltung oder der posttranslationalen Modifikationen des Rezeptors sind zu vermeiden. Modifikationen in diesen Bereichen sollten deutlichen Einfluss auf die Expression des mutierten Rezeptors haben. Durch die möglichst geringe Eigenschaftsvariation der ausgetauschten Aminosäureseitenketten wurde beabsichtigt, die Gesamtstruktur des Rezeptors so gering wie möglich zu beeinträchtigen. Trotzdem führten 4 der 10 gefundenen konstitutiv inaktivierenden Mutationen zu einer signifikant verringerten Zelloberflächenexpression. Das betrifft die Mutanten V502A (V3.33A) an der TMH3, Y582A (Y5.39A) an der TMH5, sowie F634I (F6.45I) und F642I (F6.53I) an der TMH6. Die Mutation V502A (V3.33A) hat dabei mit einer 0,4-fachen Expression im Vergleich zum Wildtyp den stärksten Einfluss auf die Oberflächenexpression. Nach rechnerischer Normalisierung des Basalwertes auf ein einheitliches Expressionsniveau (spezifische basale Aktivität) zeigen diese Mutanten immer noch eine starke Absenkung des basalen cAMP-Wertes.

Abbildung 5.8 stellt im Modell diejenigen Positionen dar, an denen konstitutiv inaktivierende Mutationen in der allosterischen Bindungsregion des TSH-Rezeptors bekannt sind. Es zeigen sich lokale Häufungen in den Bereichen zwischen den Transmembranhelizes 3, 4, 5 und der extrazellulären Schleife 2 (Cluster I) sowie den Transmembranhelizes 1, 2 und 7 (Cluster II). Die Ansammlung konstitutiv inaktivierender Mutationen in diesen Gebieten weist auf ihre Bedeutung bei der Aufrechterhaltung des basal aktiven Zustandes hin.



Abbildung 5.8: Konstitutiv inaktivierende Mutationen in der allosterischen Bindungsregion des TSH-Rezeptors (Haas & Kleinau, 2011); Homologiemodell der Transmembrandomäne des TSH-Rezeptors auf Grundlage der Struktur von Rhodopsin; Darstellung der Aminosäureseitenketten, die die allosterische Bindungsregion kleiner Moleküle auskleiden; In türkis sind Aminosäurereste markiert, an denen konstitutiv inaktivierende Mutationen bekannt sind. Konstitutiv inaktivierende Mutationen aus dieser Arbeit sind mit * gekennzeichnet. A) Seitenansicht aus der Membranebene auf das Modell der TSHR-Transmembrandomäne B) Blick von der extrazellulären Seite in das Helixbündel hinein. Die blauen Bereiche verdeutlichen die Ausmaße der allosterischen Bindungstasche. Mit Cluster I und Cluster II (Kreisbereiche) werden Gebiete beschrieben, in denen es zur Anhäufung von konstitutiv inaktivierenden Mutationen kommt.

Betrachtet man die räumliche Orientierung der einzelnen Aminosäureseitenketten an diesen Positionen im Homologiemodell, so wird deutlich, dass der basal aktive Zustand des TSH-Rezeptors von Interaktionen innerhalb der Cluster aufrecht erhalten wird (Tabelle 4.6). Die Störung dieser Wechselwirkungen durch eine eingeführte Mutation lässt den Rezeptor in eine inaktivere Konformation übergehen, die sich in der Reduktion der Basalaktivität ausdrückt.

Das ist beispielsweise für die interagierenden Aminosäurereste V424 (V1.42) und L467 (L2.57) der Fall. Wird der Kontakt zwischen beiden Seitenketten, wie etwa durch die Mutationen V424I (V1.42I) oder L467V (L2.57V) verändert, sinkt in beiden Fällen die Basalaktivität. Im inaktiven und im aktiven Modell ist ein enger Kontakt zwischen V421 (V1.42) und L467 (L2.57) erkennbar. Die Reduzierung der Seitenkettelänge in der Mutante L467V (L2.57V) verschlechtert den Kontakt zur TMH1, so dass nach der Aktivierung das eingeführte Valin die aktive Konformation nicht ausreichend stabilisieren kann. Daraus resultiert die Zunahme des EC₅₀-Wertes.

Fügt man Alanin anstelle des V502 (V3.33) ein, so ist keine Basalaktivität mehr messbar und die Oberflächenexpression sinkt signifikant. Im inaktiven, wie auch im aktiven Zustand, hat das V502 (V3.33) der TMH3 Kontakt zum L552 (L4.56) und A553 (A4.57) der TMH4. Mutationen an diesen Interaktionspartnern zeigen die gleichen funktionellen Charakteristika, wie die Mutante V502A (V3.33A). Sowohl die Verkürzung der Seitenkette in den Mutanten V502A (V3.33A) und L552V (L4.56), als auch die Verlängerung der Seitenkette durch die Mutation A553T (A4.57T), senken die basale Aktivität und teilweise die Oberflächenexpression des TSH-Rezeptors (Haas & Kleinau, 2011; Abramowicz MJ, 1997).

Wird das Y582 (Y5.39) der TMH5 durch Alanin oder Phenylalanin ausgetauscht, so sinkt in beiden Fällen die Basalaktivität und führt bei der Alanin-Mutante auch zu einem Rückgang der Zelloberflächenexpression. Die Seitenkette des Y582 (Y5.39) ist zum Innenraum des Helixbündels hin orientiert und hat Kontakt zur TMH4 und zur extrazellulären Schleife 2. Potentielle Kontaktpartner im inaktiven und zum Teil im aktiven Zustand sind unter anderem das S561 und das M572 der extrazellulären Schleife 2. Der Austausch dieser Kontaktpartner durch Alanin führt in beiden Fällen zur Reduktion der Basalaktivität und in der Mutante S561A zur Senkung der Zelloberflächenexpression (Kleinau G, 2007a).

Die aromatische Interaktion der Phenylalaninseitenketten F594 (F5.51) und F634 (F6.45) im Zwischenraum der Transmembranhelizes 5 und 6 unterstützt wesentlich die basal aktive Konformation (Abbildung 5.9A). Tauscht man eines dieser Phenylalanine gegen Isoleucin aus, so führen beide Mutationen zur Herabsetzung der Basalaktivität. Gleichzeitig zeigt sich der Bestand der Interaktion zwischen F594 (F5.51) und F634 (F6.45) im inaktiven und auch im aktiven Zustand durch eine Erhöhung der EC₅₀-Werte ihrer Alanin-Mutanten (Abbildung 5.9B).



Abbildung 5.9: Schematische Orientierung der Seitenkette des F594 (F5.51) im inaktiven oder aktiven Modell der Transmembrandomäne des TSH-Rezeptors basierend auf den Strukturen von Rhodopsin oder Opsin; A) Im inaktiven Zustand befindet sich das F594 (F5.51) im Bereich zwischen den Transmembranhelizes 3 und 6 mit Kontakt zum V509 (V3.40) und F634 (F6.45). Die verkürzte Seitenkette in der TSHR-Mutante gestattet F5941 die Bewegung in Richtung TMH4. woraus eine inaktivere Rezeptorkonformation resultiert (grauer Pfeil). B) Im aktiven Modell ist das F594 (F5.51) der TMH6 zugewandt und interagiert unter anderem mit dem F634 (F6.45).

Ein weiterer Kontaktpunkt des F594 (F5.51) der TMH5 im inaktiven Zustand ist das V509 (V3.40) der TMH3 (Abbildung 5.9A). Dass eine Interaktionsstörung zwischen TMH3 und TMH5 stimulierenden Einfluss auf den TSHR hat, konnte für die natürlich vorkommende konstitutiv aktivierende Mutante V509A (V3.40A) gezeigt werden (Duprez L, 1994). Mit Einführung der komplementären Seitenlettenverlängerung an der TMH5 in der Doppelmutante V509A/A593V (V3.40A/A5.50V) wurde die wildtypische Signalisierung wieder hergestellt (Karges B, 2005) (Abbildung 5.10). Dem gegenüber könnte die Verkürzung der Seitenkette des F594 (F5.51) zu

Isoleucin die gegenläufige Bewegung der TMH5 ermöglichen und führt so zu einer inaktiveren Rezeptorkonformation (Abbildung 5.9A).



Abbildung 5.10: Schema der Interaktion zwischen den Transmembranhelizes 3 und 5 im TSHR Wildtyp (A) und in der TSHR-Mutante V509A (V3.40A) (B); Die Alaninseitenkette an Position 509 ermöglicht die Bewegung der TMH5 in Richtung TMH6, was zur konstitutiven Aktivierung des Rezeptors führt (Karges B, 2005).

Dass die basale wie auch die TSH induzierte Signalisierung der Mutante F642I (F6.53I) verringert ist, lässt sich nicht mit einem monomeren Rezeptormodell erklären, da die Seitenkette des F642 (F6.53) keinen direkten Interaktionspartner hat. Sie zeigt im inaktiven und auch im aktiven Modell in die Membranebene hinein. Nur eine potentielle Dimeranordnung des TSH-Rezeptors, deren Kontaktfläche an oder in der Nähe der TMH6 liegt, bietet eine Erklärung für dieses Ergebnis. Dies wird umso wahrscheinlicher, da auch pathogene konstitutiv aktivierende Mutationen an Aminosäureresten der TMH6 beschrieben wurden, deren Seitenketten ebenfalls zur Membranseite weisen (F631V (F6.42V) (Gozu H, 2005) und I635V (I6.46V) (Castro I, 2009)). Mutationen wie diese verändern den möglichen Monomer-Monomer-Kontakt in Abhängigkeit vom Aktivierungsstatus des TSH-Rezeptors (Biebermann H, 2010). Es ist bereits bekannt, dass der TSHR Dimere bildet (Persani L, 2007). Die intermolekularen Kontakte in der Transmembranregion sind dabei die Hauptdeterminanten solcher TSHR- oder GPHR-Dimere (Urizar E, 2005a; Guan R, 2009; Guan R, 2010).

In Kapitel 5.2 wurde bereits beschrieben, dass es an Position 643 (6.54) möglich ist, die Aktivität des TSH-Rezeptors herauf und auch herab zu regulieren. Je nachdem, ob das Tyrosin an dieser Position durch ein Phenylalanin oder Alanin ausgetauscht wird, kommt es zur konstitutiven Aktivierung oder konstitutiven Inaktivierung des Rezeptors. Verkürzt man seine Seitenkette zu Alanin, so verschlechtert sich die Signalisierungsempfindlichkeit und der Basalwert sinkt. Das Y643 (Y6.54) hat im inaktiven Modell Kontakt zum S659 (S7.34), K660 (K7.35) und L663 (L7.38) der TMH7. Mutanten des Bindungspartners K660 (7.35) weisen auch auf die Signalisierungssensitivität dieser Interaktion hin, denn die Austausche zu Alanin, Aspartat oder Glutamat führen jeweils zu einer Reduktion der maximalen Signalisierung (Claus M, 2005a). Die Empfindlichkeit der Seitenkette des Y643 (6.54) gegenüber geringen Veränderungen der Seitenkettengröße ist dabei Ausdruck für die gedrängte Anordnung der umgebenden Aminosäuren in diesem Bereich.

5.4. Die Signalisierung des TSH-Rezeptors über G_q

Der TSHR ist in der Lage verschiedene G-Proteintypen zu aktivieren (Laugwitz KL, 1996). Der Hauptsignalisierungsweg des TSH-Rezeptors verläuft aber über die Aktivierung von G_s mit der daraus folgenden Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels. Bei höheren TSH-Konzentrationen wird auch G_q aktiviert, was zur Bildung von Inositoltriphosphat führt (Kopp P, 2001). Auffallend bei den Daten dieser Arbeit ist, dass die verschlechterte G_q -Signalisierung oft mit einer Abnahme der Signalisierungsempfindlichkeit über G_s einher geht. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Kompetition von G_s und G_q um die gemeinsame G-Proteinbindungsstelle. Der TSHR/ G_q -Heterotrimerkomplex ist durch eine größere Anzahl selektiver Interaktionen gekennzeichnet als der TSHR/ G_s -Komplex (Kleinau G, 2010a). Die G_s -Bindungspunkte sind dem entsprechend nur eine Teilmenge der Interaktionen zwischen G_q und dem TSHR. Wahrscheinlich ist es deshalb G_s leichter möglich an den TSHR zu binden.

In der Tat sind viele Mutationen des TSH-Rezeptors bekannt, die beide Signalwege beeinflussen. Dem gegenüber ist auch die natürliche inaktivierende Mutation L653V der extrazellulären Schleife 3 beschrieben, welche vorzugsweise die InsP-Signalisierung herabsetzt (Grasberger H, 2007).

80

5.5. Die Verteilung konstitutiv aktivierender und inaktivierender Mutationen in der allosterischen Bindungsregion des TSH-Rezeptors

Im Bereich der allosterischen Bindungsregion befindet sich eine hohe Dichte an signalisierungssensitiven Aminosäureresten, deren Modifikation die Signalübertragung im transmembranären Bereich beeinflusst. Besonders das M637 (M6.48) nimmt hier wahrscheinlich eine Schlüsselstellung ein, bei der Aufrechterhaltung der basal aktiven Struktur und bei der Ausbildung der aktiven Konformation (Kapitel 5.2.1).

Tabelle 5.1 gibt einen Überblick über Mutanten in der allosterischen Bindungsregion des TSH-Rezeptors und ihre funktionelle Ausprägung. Es wird deutlich, dass es keine strenge räumliche Trennung der Bereiche gibt, die zur Aufrechterhaltung der basalen Konformation oder zur Ausbildung der aktiven Konformation beitragen. Konstitutiv aktivierende und konstitutiv inaktivierende Mutationen sind in nahezu allen strukturellen Anteilen der allosterischen Bindungstasche vertreten, teilweise sogar an denselben Positionen. In Abhängigkeit von der jeweils eingeführten Mutation kommt es damit zur Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung der inaktiveren oder aktiveren Struktur.

Die Kenntnis dieser Sequenz-Struktur-Funktionsbeziehungen im Bereich der allosterischen Bindungsregion ist von Interesse für die homologen Glykoproteinhormonrezeptoren, aber auch für andere G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit erhöhter basaler Aktivität. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse wird insbesondere durch die Konservierung dieser allosterischen Bindungsregion innerhalb der Rhodopsin-ähnlichen G-Protein gekoppelten Rezeptoren ermöglicht (Heitman LH, 2008; Kleinau G, 2008a).

Tabelle 5.1: Zusammenfassung funktioneller Daten von TSHR-Mutanten innerhalb der allosterischen Bindungsregion (Datenbank: www.ssfa-gphr.de); Die Farbe der Seitenkettenvariation entspricht den veränderten Signalisierungsparametern der Mutanten. Rot – konstitutiv aktivierende Mutation, blau – konstitutiv inaktivierende Mutation und/oder Verschlechterung der TSH induzierten Signalisierung, schwarz – wie der Wildtyp, * - Mutanten die in dieser Arbeit untersucht wurden

Lage	Ballesteros & Weinstein Nummerierung	Aminosäure hTSHR	Mutation	Referenzen
TMH1	1.35	L417	V	Kleinau G, 2007a
	1.39	V421	 *	Kleinau & Haas, 2010
	1.42	V424	*	Haas & Kleinau, 2011
TMH 2	2.53	M463	V	Fuhrer D, 2000
	2.56	Y466	A*	Kleinau & Haas, 2010
	2.57	L467	V*	Haas & Kleinau, 2011
	2.60	I470	V	Kleinau G, 2007a
	2.64	D474	Е	Neumann S, 2005
ТМН3	3.32	T501	I, A	Montanelli L, 2004; Kleinau & Haas, 2010
	3.33	V502	A *	Haas & Kleinau, 2011
	3.36	S505	D, R	Holzapfel HP, 1997; Wonerow P, 2000; Claeysen S, 2002; Tonacchera M, 1996; Kosugi S, 2000
	3.37	E506	А	Kosugi S, 2000
	3.40	V509	А	Kosugi S, 2000; Duprez L, 1994; Karges B, 2005
TMH 4	4.56	L552	V	Haas & Kleinau, 2011
EZS 2		1568	A, F, L, T, V	Kleinau G, 2007a; Parma J, 1995; Neumann S, 2005; Kleinau G, 2008b; Claus M. 2005b
		L570	A, F	Kleinau G, 2007a; Jäschke H, 2006
		P571	-	-
		M572	A, F	Kleinau G, 2007a
TMH5	5.39	Y582	A*, F*	Haas & Kleinau, 2011
	5.40	1583	V	Kleinau G, 2011
	5.43	V586	*	Haas & Kleinau, 2011
	5.44	L587	V	Kleinau & Haas, 2010
	5.46	L589	V*	Haas & Kleinau, 2011
	5.47	N590	А	Neumann S, 2009
TMH 6	6.48	M637	C *, W *	Kleinau & Haas, 2010
	6.50	P639	S	Tanacchera M, 1998
	6.51	l640	F, K, L, M, V	Kleinau G, 2007a; Gozu HI, 2006
	6.52	S641	А	Kleinau & Haas, 2010
	6.54	Y643	A*, F*	Kleinau & Haas, 2010
	6.56	L645	V*	Kleinau & Haas, 2010
	6.55	A644	V	Kleinau G, 2011
	6.59	1648	V*	Kleinau G, 2011
	7.39	V664	A	Kleinau G, 2007a
TMH7	7.40	L665	V*	Haas & Kleinau, 2011
	7.42	Y667	A, F*	Kleinau & Haas, 2010

5.6. Die Lage kleiner Molekülliganden innerhalb der Bindungsregion

Für den TSHR sind verschiedene allosterische Liganden bekannt, die sich stark in ihrer Affinität und Spezifität unterscheiden. Der partielle Antagonist c52 und der partielle Agonist org41841 wurden als allosterische Liganden des TSH-Rezeptors und LHCG-Rezeptors beschrieben (Neumann S, 2008; van Straten NCR, 2002). Beide Moleküle teilen die gleiche Grundstruktur, unterscheiden sich aber durch einen verlängerten Substituenten am Phenylrest (Abbildung 5.11). Basierend auf Dockingstudien wurde für beide Liganden die Lage zwischen den Transmembranhelizes 3, 4, 5, 6 und der extrazellulären Schleife 2 des TSH-Rezeptors vorhergesagt (Jäschke H, 2006; Neumann S, 2008). Dabei sitzt der Antagonist c52 höher in der Bindungsstelle als der Agonist org41841 (Abbildung 5.11). Er reicht mit seiner verlängerten Seitenkette in den Bereich von Cluster I, wo vermehrt konstitutiv inaktivierende Mutationen gefunden wurden. Diese sind teilweise auch durch eine verminderte TSH-Aktivierbarkeit gekennzeichnet. Vermutlich stabilisiert die Bindung von c52 eine Rezeptorkonformation mit erniedrigter Signalisierungsfähigkeit. Im Gegensatz zu c52 kann org41841 tiefer in die Bindungsregion eindringen. Eine Wasserstoffbrückenbindung zum E506 (E3.37) trägt hier wesentlich zu seiner Bindung an den TSHR bei (Jäschke H, 2006). Diese Lokalisation ermöglicht den Kontakt zum M637 (M6.48), welchem eine zentrale Funktion in der intramolekularen Signalweiterleitung in diesem Bereich zugeordnet wird (Kapitel 5.2.1). Der partielle Antagonist c52 kann dieses M637 (M6.48) nicht erreichen, was den agonistischen Effekt von org41841 gegenüber dem Antagonisten c52 erklären kann.



Abbildung 5.11: Lage des allosterischen Agonisten org41841 (blau) und Antagonisten c52 (violett) in der transmembranären Bindungsregion des TSH-Rezeptors (Haas & Beide Moleküle binden vermutlich im Raum zwischen Kleinau. 2011). den Transmembranhelizes 3, 4, 5, 6 und der extrazellulären Schleife 2. Sie teilen die gleiche chemische Grundstruktur. Der Antagonist c52 zeichnet sich aber zusätzlich durch einen verlängerten Substituenten an der Phenylgruppe aus. Dieser bewirkt, dass c52 höher in der Bindungstasche sitzt als org41841. Er zeigt in den Bereich von Cluster I zwischen die Helizes 4 und 5 und der extrazelluläre Schleife 2, genau dort wo konstitutiv inaktivierende Mutationen (türkis) bekannt sind. Der Agonist org41841 sitzt tiefer in der Bindungstasche und kann den Kontakt zur Seitenkette des M637 (M6.48) (rot) an der TMH6 herstellen. Das M637 (M6.48) ist ein aktivierungssensitiver Punkt an dem konstitutiv aktivierende Mutationen bekannt sind. Damit bietet sich eine Erklärung für den agonistischen Effekt von org41841 (Kleinau & Haas, 2010).

Ein weiterer allosterischer Agonist des TSH-Rezeptors, c2, interagiert ebenfalls mit der Seitenkette des M637 (M6.48) (Neumann S, 2010) (Abbildung 5.12). Für ihn wurde experimentell gezeigt, dass die durch ihn ausgelösten strukturellen Veränderungen über den Kontakt zum M637 (M6.48) weitergeleitet werden (Kleinau & Haas, 2010).

Die Lage und Orientierung dieser Liganden bestätigt die vorhergesagten Wechselwirkungsmodelle. Konstitutiv aktivierende Mutationen und auch konstitutiv



inaktivierende Mutationen sind potentielle Interaktionspunkte für allosterische Agonisten bzw. Antagonisten.

Abbildung 5.12: Lage des allosterischen Agonisten c2 (blau) in der transmembranären Bindungsregion des TSH-Rezeptors (Kleinau & Haas, 2010). Dieses Modell basiert auf der Kristallstruktur von Opsin. In rot sind einige wildtypische Aminosäuren dargestellt, an deren Positionen konstitutiv aktivierende Mutationen bekannt sind.

5.6.1. Der Wechsel zwischen agonistischem und antagonistischem Effekt kleiner Molekülliganden

Das zunehmende Verständnis der molekularen Mechanismen im Bereich der allosterischen Bindungsregion ist die Grundlage für die Erklärung und für die Vorhersage der Wirkungsweise kleiner Molekülliganden. So konnte durch die Verlängerung eines Substituenten des partiellen Agonisten org41841, dessen agonistische Wirkungsweise in einen antagonistische Effekt des resultierenden Liganden c52 umgewandelt werden (Abbildung 5.13 I, II). Dockingstudien des partiellen Antagonisten c52 wiesen auf zwei prominente Kontaktpunke dieses Liganden innerhalb der allosterischen Bindungsregion des TSH-Rezeptors hin (Neumann S, 2008). Der sterisch größere partielle Antagonist c52 klemmt zwischen zwei Aminosäureseitenketten fest und kann deshalb die Aktivierungsstelle am M637

(M6.48) nicht erreichen (Abbildung 5.13 II). Die Umkehrung des antagonistischen Effektes von c52 zurück zu einem agonistischen Effekt des gleichen Moleküls, wurde durch gezielte Mutationen der beiden Kontaktpunkte im Bereich der allosterischen Bindungsregion erreicht. Die Verkürzung der Interaktionsstellen am M572 der extrazellulären Schleife 2 oder am Y667 (Y7.42) der TMH7, jeweils durch Mutation zu Alanin, sollte c52 tiefer in die Bindungsstelle eindringen lassen. Der Antagonist c52 kann somit eine Position innerhalb der Bindungsregion einnehmen, die vergleichbar mit der des Agonisten org41841 ist (Abbildung 5.13 III, IV). Beide Vorhersagen wurden experimentell bestätigt. An den TSHR-Mutanten M527A (EZS2) und Y667A (Y7.42A) (Neumann S, 2008) entfaltet der Antagonist c52 eine agonistische Wirkung. Durch die veränderte Lage des Liganden c52 kann er nun vermutlich auch mit dem tiefer in der Bindungsregion gelegenen signalisierungssensitiven M637 (M6.48) in Kontakt treten und so den Rezeptor aktivieren.



Abbildung 5.13: Funktionswechsel kleiner Molekülliganden des TSH-Rezeptors zwischen Agonismus und Antagonismus durch Modifikation des Liganden oder der Bindungsstelle; (I) Der Agonist org41841 sitzt tief in der Bindungsstelle und kann den Rezeptor durch die Interaktion mit dem M637 (M6.48) aktivieren. (II) Der Antagonist c52 unterscheidet sich vom Agonisten org41841 nur durch eine längere Seitenkette (Neumann S, 2008). Dadurch sitzt c52 höher in der Bindungsregion, hat keinen Kontakt mehr zum M637 (M6.48) aber zu Aminosäureseitenketten des Cluster I (hellblau). (III, IV) C52 liegt eingekeilt zwischen den Seitenketten M572 (EZS2) und Y667 (Y7.42) in der Bindungsstelle. Die Verkürzung dieser Haltepunkte ermöglicht das tiefere Eindringen von c52 in die Bindungsregion (Neumann S, 2008). Demzufolge ist nun der Kontakt zum M637 (M6.48) möglich, was den agonistischen Effekt erklären kann.

Durch diese hier gewonnenen Detailkenntnisse zum Aktivierungsmechanismus innerhalb der allosterischen Bindungsregion des TSH-Rezeptors sind wir nun in der Lage, durch Modulationen sowohl auf der Ligandenseite als auch auf der Rezeptorseite, einen Wechsel zwischen agonistischem und antagonistischem Effekt herbeizuführen.

Diese Einsichten, bezüglich der auskleidenden Aminosäuren der allosterischen Bindungsregion und damit die pharmakophoren Muster welche eine intramolekulare Stabilisierung oder Aktivierung des Rezeptors betreffen, stellen die Grundlage für zukünftige Studien dar. Als komplementäres Abbild in der Bindungsregion bilden sie, gemeinsam mit Interaktionsmustern bisher bekannter allosterischer Liganden, einen wesentlich verbesserten Ausgangspunkt für die Entwicklung und Verfeinerung kleiner Antagonisten und Agonisten. Speziell sind dabei Fortschritte ihrer Affinität und TSHR-Selektivität von Interesse. Zu diesem Zweck stützt man sich auf die Annahme, dass allosterische Liganden in der Bindungsstelle die gleichen Mechanismen auslösen, wie sie für konstitutiv aktivierende und konstitutiv inaktivierende Mutationen angenommen werden (Parnot C, 2002). Das heißt, es kommt durch die Bindung des Liganden zur Ausbildung und Stabilisierung einer aktiveren oder inaktiveren Konformation des Rezeptors.

Prinzipiell sind die für den TSHR vorgeschlagenen Mechanismen in diesem Bereich auch interessant für andere G-Protein gekoppelte Rezeptoren, da diese konservierte transmembranäre Bindungsregion in verschiedenen Rezeptoren von endogenen Liganden besetzt ist (Gloriam DE, 2009). Ferner sind beispielsweise konstitutiv aktivierende Mutationen in diesem Bereich beim Ghrelin-Rezeptor und dem α-Faktor bekannt (Holst B, 2004; Konopka JB, 1996). Zudem wurde im Rhodopsin die Bindung von Pharmaka in der Transmembranregion nachgewiesen (Ishizawa Y, 2002).

6. Literatur

- Abe E, Marians RC, Yu W, Wu XB, Ando T, Li Y, Iqbal J, Eldeiry L, Rajendren G, Blair HC, Davies TF, Zaidi M (2003) TSH is a negative regulator of skeletal remodelling. *Cell* 115, 151–162
- Abramowicz MJ, Duprez L, Parma J, Vassart G, Heinrichs C (1997) Familial congenital hypothyroidism due to inactivating mutation of the thyrotropin receptor causing profound hypoplasia of the thyroid gland. *J Clin Invest* 99(12), 3018-24
- Ahuja S, Smith SO (2009) Multiple switches in G protein-coupled receptor activation. Trends Pharmacol Sci 30(9), 494-502
- Allgeier A, Offermanns S, Van Sande J, Spicher K, Schultz G, Dumont JE (1994) The human thyrotropin receptor activates G-proteins Gs and Gq/11. *J Biol Chem* 269, 13733-13735
- Allgeier A, Laugwitz KL, Van Sande J, Schultz G, Dumont JE (1997) Multiple Gprotein coupling of the dog thyrotropin receptor. *Mol Cell Endocrinol* 127, 81-90
- Ascoli M, Fanelli F, Segaloff DL (2002) The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr Rev* 23,141-174
- Ballesteros JA, Weinstein H (1995) Integrated Methods for the Construction of Three-Dimensional Models and Computational Probing of Structure-Function Relationships in G-Protein Coupled Receptors. *Methods Neurosci* 25, 366-428
- Ballesteros JA, Jensen AD, Liapakis G, Rasmussen SG, Shi L, Gether U, Javitch JA (2001) Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6. *J Biol Chem* 276, 29171–29177
- Biebermann H, Winkler F, Kleinau G (2010) Genetic defects, thyroid growth and malfunctions of the TSHR in pediatric patients. *Front Biosci* 15, 913-33
- Bockaert J, Pin JP (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* 18, 1723-1729
- Bond RA, Ijzerman AP (2006) Recent developments in constitutive receptor activity and inverse agonism, and their potential for GPCR drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 27, 92-96
- Braun T, Schofield PR, Sprengel R (1991) Amino-terminal leucine-rich repeats in gonadotropin receptors determine hormone selectivity. *EMBO J* 10, 1885-1890
- Büch TR, Biebermann H, Kalwa H, Pinkenburg O, Hager D, Barth H, Aktories K, Breit A, Gudermann T (2008) G13-dependent activation of MAPK by thyrotropin. J Biol Chem 283(29), 20330-41

- Case DA (2002) Molecular dynamics and NMR spin relaxation in proteins. Acc Chem Res 35(6), 325-31
- Castro I, Lima L, Seoane R, Lado-Abeal J (2009) Identification and functional characterization of two novel activating thyrotropin receptor mutants in toxic thyroid follicular adenomas. *Thyroid* 19(6), 645-9
- Cetani F, Tonacchera M, Vassart G (1996) Differential effects of NaCl concentration on the constitutive activity of the thyrotropin and the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors. *FEBS Lett* 378, 27-31
- Chen CR, Chazenbalk GD, Wawrowsky KA, McLachlan SM, Rapoport B (2006) Evidence that human thyroid cells express uncleaved, single-chain thyrotropin receptors on their surface. Endocrinology 147(6), 3107-13
- Chen CR, McLachlan SM, Rapoport B (2011) Evidence that the TSH receptor transmembrane domain influences TSH binding kinetics to the receptor ectodomain. *J Biol Chem* 286(8), 6219-24
- Choe HW, Kim YJ, Park JH, Morizumi T, Pai EF, Krauß N, Hofmann KP, Scheerer P, Ernst OP (2011) Crystal structure of metarhodopsin II. *Nature* 471 (7340), 651-655
- Claeysen S, Govaerts C, Lefort A, Van Sande J, Costagliola S, Pardo L, Vassart G (2002) A conserved Asn in TM7 of the thyrotropin receptor is a common requirement for activation by both mutations and its natural agonist. *FEBS Lett* 517(1-3), 195-200
- Claus M, Jaeschke H, Kleinau G, Neumann S, Krause G, Paschke R (2005a) A hydrophobic cluster in the center of the third extracellular loop is important for thyrotropin receptor signalling. *Endocrinology* 146(12), 5197-203
- Claus M, Maier J, Paschke R, Kujat C, Stumvoll M, Führer D (2005b) Novel thyrotropin receptor germline mutation (Ile568Val) in a Saxonian family with hereditary nonautoimmune hyperthyroidism. *Thyroid* 15(9), 1089-94
- Cornelis S, Uttenweiler-Joseph S, Panneels V, Vassart G, Costagliola S (2001) Purification and characterization of a soluble bioactive amino-terminal extracellular domain of the human thyrotropin receptor. *Biochemistry* 40, 9860-9869
- Costagliola S, Panneels V, Bonomi M, Koch J, Many MC, Smits G, 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, Vassart G (2005) Specificity and promiscuity of gonadotropin receptors. *Reproduction* 130, 275-281

- Cotecchia S, Fanelli F, Costa T (2003) Constitutively active G protein-coupled receptor mutants: implications on receptor function and drug action. Assay Drug Dev Technol 1, 311-316
- Davies TF, Ando T, Lin RY, Tomer Y, Latif R (2005) Thyrotropin receptor-associated diseases: from adenomata to Graves disease. J Clin Invest 115(8), 1972-83
- Deflorian F, Engel S, Colson AO, Raaka BM, Gershengorn MC, Costanzi S (2008) Understanding the structural and functional differences between mouse thyrotropin-releasing hormone receptors 1 and 2. *Proteins* 71, 783-794
- Dias JA, Van Roey P (2001) Structural biology of human follitropin and its receptor. Arch Med Res 32, 510-519
- Dufau ML (1998) The luteinizing hormone receptor. Annu Rev Physiol 60, 461-496
- Dumont JE, Lamy F, Roger P, Maenhaut C (1992) Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. *Physiol Rev* 72, 667–697
- Duprez L, Parma J, Van Sande J, Allgeier A, Leclère J, Schvartz C, Delisle MJ, Decoulx M, Orgiazzi J, Dumont J (1994) Germline mutations in the thyrotropin receptor gene cause non-autoimmune autosomal dominant hyperthyroidism. *Nat Genet* 7(3), 396-401
- Duprez L, Parma J, Van Sande J, Rodien P, Dumont JE, Vassart G, Abramowicz M (1998) TSH receptor mutations and thyroid disease. *Trends Endocrinol Metab* 9, 133-140
- Fredrikson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schiöt HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome for five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63, 1256-1272
- Fuhrer D, Warner J, Sequeira M, Paschke R, Gregory J, Ludgate M (2000) Novel TSHR germline mutation (Met463Val) masquerading as Graves' disease in a large Welsh kindred with hyperthyroidism. *Thyroid* 10(12), 1035-41
- Gershengorn MC, Osman R (2001) Minireview: Insights into G protein-coupled receptor function using molecular models. Endocrinology 142(1), 2-10
- Gloriam DE, Foord SM, Blaney FE, Garland SL (2009) Definition of the G proteincoupled receptor transmembrane bundle binding pocket and calculation of receptor similarities for drug design. *J Med Chem* 52, 4429-4442
- Gozu H, Avsar M, Bircan R, Claus M, Sahin S, Sezgin O, Deyneli O, Paschke R, Cirakoglu B, Akalin S (2005) Two novel mutations in the sixth transmembrane segment of the thyrotropin receptor gene causing hyperfunctioning thyroid nodules. *Thyroid* 15(4), 389-97

- Gozu HI, Bircan R, Krohn K, Müller S, Vural S, Gezen C, Sargin H, Yavuzer D, Sargin M, Cirakoglu B, Paschke R (2006) Similar prevalence of somatic TSH receptor and Gsalpha mutations in toxic thyroid nodules in geographical regions with different iodine supply in Turkey. *Eur J Endocrinol* 155(4), 535-45
- Grasberger H, Van Sande J, Hag-Dahood MA, Tenenbaum-Rakover Y, Refetoff S (2007) A familial thyrotropin (TSH) receptor mutation provides in vivo evidence that the inositol phosphates/Ca2+ cascade mediates TSH action on thyroid hormone synthesis. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 2816–2820
- Gudermann T, Nurnberg B, Schultz G (1995) Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function. *Journal of Molecular Medicine* 73, 51-63
- Guan R, Feng X, Wu X, Zhang M, Zhang X, Hébert TE, Segaloff DL (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(12), 7483-94
- Guan R, Wu X, Feng X, Zhang M, Hébert TE, Segaloff DL (2010) Structural determinants underlying constitutive dimerization of unoccupied human follitropin receptors. *Cell Signal* 22(2), 247-56
- Haas AK, Kleinau G, Hoyer I, Neumann S, Furkert J, Rutz C, Schülein R, Gershengorn MC, Krause G (2011) Mutations that silence constitutive signaling activity in the allosteric ligand-binding site of the thyrotropin receptor. *Cell Mol Life Sci* 68(1), 159-67
- Heitman LH, Ijzerman AP (2008) G protein-coupled receptors of the hypothalamicpituitary-gonadal axis: a casa for Gnrh, LH, FSH, and GPR54 receptor ligands. *Med Res Rev* 28, 975-1011
- Hofmann KP, Scheerer P, Hildebrand PW, Choe HW, Park JH, Heck M, Ernst OP (2009) A G protein-coupled receptor at work: the rhodopsin model. *Trends Biochem Sci* 34(11), 540-52
- Holst B, Holliday ND, Bach A, Elling CE, Cox HM, Schwartz TW (2004) Common structural basis for constitutive activity of the ghrelin receptor family. *J Biol Chem* 279, 53806-53817
- Holzapfel HP, Wonerow P, von Petrykowski W, Henschen M, Scherbaum WA, Paschke R (1997) Sporadic congenital hyperthyroidism due to a spontaneous germline mutation in the thyrotropin receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 82(11), 3879-84
- Ishizawa Y, Pidikiti R, Liebman PA, Eckenhoff RG (2002) G protein-coupled receptors as direct targets of inhaled anaesthetics. *Mol Pharmacol* 61(5), 945-52

- Jaakola VP, Griffith MT, Hanson MA, Cherezov V, Chien EY, Lane JR, Ijzerman AP, Stevens RC (2008) The 2.6 Angstrom Crystal Structure of a Human A2A Adenosine Receptor Bound to an Antagonist . Science 322, 1211-1217
- Jäschke H, Neumann S, Moore S, Thomas CJ, Colson AO, Costanzi S, Kleinau G, Jiang JK, Paschke R, Raaka BM, Krause G, Gershengorn MC (2006) A low molecular weight agonist signals by binding to the transmembrane domain of thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR) and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor (LHCGR) *J Biol Chem* 281(15), 9841-4
- Karges B, Krause G, Homoki J, Debatin KM, de Roux N, Karges W (2005) TSH receptor mutation V509A causes familial hyperthyroidism by release of interhelical constraints between transmembrane helices TMH3 and TMH5. *J Endocrinol* 186(2), 377-85
- Katada S, Hirokawa T, Oka Y, Suwa M, Touhara K. (2005) Structural basis for a broad but selective ligand spectrum of a mouse olfactory receptor: mapping the odorant-binding site. *J Neurosci* 25(7), 1806-15
- Kero J, Ahmed K, Wettschureck N, Tunaru S, Wintermantel T, Greiner E, Schütz G, Offermanns S (2007) Thyrocyte-specific Gq/G11 deficiency impairs thyroid function and prevents goiter development. J Clin Invest 117, 2399–2407
- Kimura T, Van Keymeulen A, Golstein J, Fusco A, Dumont JE, Roger PP (2001) Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. *Endocr Rev* 22, 631-656
- Kleinau G, Jäschke H, Neumann S, Lättig J, Paschke R, Krause G (2004) Identification of a novel epitope in the thyroid-stimulating hormone receptor ectodomain acting as intramolecular signaling interface. *J Biol Chem* 279(49), 51590-51600
- Kleinau G, Claus M, Jaeschke H, Mueller S, Neumann S, Paschke R, Krause G (2007a) 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, Brehm M, Wiedemann U, Labudde D, Leser U, Krause G (2007b) Implications for Molecular Mechanisms of Glycoprotein Hormone Receptors Using a New Sequence-Structure-Function Analysis Recource. *Mol Endo* 21, 574-580
- Kleinau G, Jaeschke H, Mueller S, Worth CL, Paschke R, Krause G (2008a) Molecular and structural effects of inverse agonistic mutations on signaling of the thyrotropin receptor-a basally active GPCR. *Cell Mol Life Sci* 65, 3664-3676
- Kleinau G, Jaeschke H, Mueller S, Raaka BM, Neumann S, Paschke R, Krause G (2008b) Evidence for cooperative signal triggering at the extracellular loops of the TSH receptor. *FASEB* 22(8), 2798-808

- Kleinau G, Krause G (2009) Thyrotropin and homologous glycoprotein hormone receptors: structural and functional aspects of extracellular signaling mechanisms. *Endocr Rev* 30, 133-151
- Kleinau G, Jaeschke H, Worth CL, Mueller S, Gonzalez J, Paschke R, Krause G (2010a) Principles and determinants of G-protein coupling by the rhodopsin-like thyrotropin receptor. *PLoS One* 5(3), e9745
- Kleinau G, Haas AK, Neumann S, Worth CL, Hoyer I, Furkert J, Rutz C, Gershengorn MC, Schülein R, Krause G (2010) Signaling-sensitive amino acids surround the allosteric ligand binding site of the thyrotropin receptor. *FASEB J* 24(7), 2347-54
- Kleinau G, Kreuchwig A, Worth CL, Krause G (2010b) An interactive web-tool for molecular analyses links naturally occurring mutation data with threedimensional structures of the rhodopsin-like glycoprotein hormone receptors Hum Mutat 31(6), E1519-25
- Kleinau G, Hoyer I, Kreuchwig A, Haas AK, Rutz C, Furkert J, Worth CL, Krause G, Schülein R (2011) From molecular details of the interplay between transmembrane helices of the thyrotropin receptor to general aspects of signal transduction in family A GPCRs. *J Biol Chem* May 17. [Epub ahead of print]
- Kobilka BK, Deupi X (2007) Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28, 397-406
- Konopka JB, Margarit SM, Dube P (1996) Mutation of Pro-258 in transmembrane domain 6 constitutively activates the G protein-coupled α-factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 6764-6769
- Kopp P (2001) The TSH receptor and its role in thyroid disease. *Cell Mol Life Sci* 58, 1301-1322
- Kopp P (2002) Perspective: genetic defects in the etiology of congenital hypothyroidism. *Endocrinology* 143, 2019-2024
- Kosugi S, Hai N, Okamoto H, Sugawa H, Mori T (2000) A novel activating mutation in the thyrotropin receptor gene in an autonomously functioning thyroid nodule developed by a Japanese patient. *Eur J Endocrinol* 143(4), 471-7
- 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
- Laskowski RA, Mos, DS, Thornton J (1993) Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J Mol Bio.* 231, 1049–1067
- Laurent E, Mockel J, Van Sande J, Graff I, Dumont JE (1987) Dual activation by thyrotropin of the phospholipase C and cyclic AMP cascades in human thyroid. *Mol Cell Endocrinol* 52, 273–278

- Laugwitz KL, Allgeier A, Offermans S, Spicher K, Van Sande J, Dumont JE, Schultz G (1996) The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 116-120
- Lezoualc'h F, Hassan AH, Giraud P, Loeffler JP, Lee SL, Demeneix BA (1992) Assignment of the beta-thyroid hormone receptor to 3,5,3'-triiodothyroninedependent inhibition of transcription from the thyrotropin-releasing hormone promoter in chick hypothalamic neurons. *Mol Endocrinol* 6, 1797-1804
- Libert F, Lefort A, Ge´rard C, Parmentier M, Perret J, Ludgate M, Dumont JE, Vassart G (1989) Cloning, sequencing and expression of the human thyrotropin (TSH) receptor: evidence for binding of autoantibodies. *Biochem Biophys Res Commun* 165, 1250–1255
- Liebermann C.(2004) G protein-coupled receptors and their signalin pathways: Classical therapeutical targets susceptible to novel therapeutic concepts. *Curr Phar Des* 10, 1937-1958
- Loosfelt H, Pichon C, Jolivet A, Misrahi M, Caillou B, Jamous M, Vannier B, Milgrom E (1992) Two-subunit structure of the human thyrotropin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3765-3769
- Marians RC, Ng L, Blair HC, Unger P, Graves PN, Davies TF (2002) Defining thyrotropin-dependent and -independent steps of thyroid hormone synthesis by using thyrotropin receptor-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15776–15781
- Milligan G (2003) Constitutive activity and inverse agonists of G protein-coupled receptors: a current perspective. *Mol Pharmacol* 64, 1271-1276
- Misrahi M, Milgrom E (1997) Cleavage and shedding of the TSH receptor. *Eur J* Endocrinol 137, 599-602
- Mizutori Y, Chen CR, McLachlan SM, 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(5), 1171-82
- Montanelli L, Van Durme JJ, Smits G, Bonomi M, Rodien P, Devor EJ, Moffat-Wilson K, Pardo L, Vassart G, Costagliola S (2004) Modulation of ligand selectivity associated with activation of the transmembrane region of the human follitropin receptor. *Mol Endocrinol* 18(8), 2061-73
- Moore S, Jaeschke H, Kleinau G, Neumann S, Costanzi S, Jiang JK, Childress J, Raaka BM, Colson A, Paschke R, Krause G, Thomas CJ, Gershengorn MC (2006) Evaluation of small-molecule modulators of the luteinizing hormone/choriogonadotropin and thyroid stimulating hormone receptors: structure-activity relationships and selective binding patterns. *J Med Chem* 49, 3888-3896

- Mülhardt C (2003) Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin
- Mueller S, Gozu HI, Bircan R, Jaeschke H, Eszlinger M, Lueblinghoff J, Krohn K, Paschke R (2009) Cases of borderline in vitro constitutive thyrotropin receptor activity; How to decide whether a thyrotropin receptor mutation is constitutive active or not? *Thyroid* 19, 765-773
- Müller S, Jaeschke H, Paschke R (2010) Current standards, variations, and pitfalls for the determination of constitutive TSHR activity in vitro. *Methods in Enzymology* 485, 421-436
- Nagayama Y, Rapoport B (1992) The thyrotropin receptor 25 years after its discovery: new insight after its molecular cloning. *Mol Endocrinol* 6, 145-156
- Nagayama Y, Namba H, Yokoyama N, Yamashita S, Niwa M (1998) Role of asparagine-linked oligosaccharides in protein folding, membrane targeting, and thyrotropin and autoantibody binding of the human thyrotropin receptor. *J Biol Chem* 273, 33423-33428
- Nagayama Y, Nishihara E, Yamashita S, Niwa M (2000) Identification of the Sites of Asparagine-Linked Glycosilation on the Human Thyrotropin Receptor and Studies on Their Role in Receptor Function and Expression. *JPET* 295, 404-409
- Neumann S, Krause G, Chey S, Paschke R (2001) A free carboxylate oxygen in the side chain of position 674 in transmembrane domain 7 is necessary for TSH receptor activation. *Mol Endocrinol* 15, 1294-1305
- Neumann S, Claus M, Paschke R (2005) Interactions between the extracellular domain and the extracellular loops as well as the 6th transmembrane domain are necessary for TSH receptor activation. *Eur J Endocrinol* 152(4), 625-34
- Neumann S, Kleinau G, Costanzi S, Moore S, Jiang JK, Raaka BM, Thomas CJ, Krause G, Gershengorn MC (2008) A low-molecular-weight antagonist for the human thyrotropin receptor with therapeutic potential for hyperthyroidism. *Endocrinology* 149, 5945-5950
- Neumann S, Huang W, Titus S, Krause G, Kleinau G, Alberobello AT, Zheng W, Southall NT, Inglese J, Austin CP, Celi FS, Gavrilova O, Thomas CJ, Raaka BM, Gershengorn MC (2009) Small-molecule agonists for the thyrotropin receptor stimulate thyroid function in human thyrocytes and mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(30), 12471-6
- Neumann S, Huang W, Eliseeva E, TitusS, Thomas CJ, Gershengorn MC (2010) A small Molecule inverse agonist for the human thyroid-stimulating hormone receptor. *Endocrinology* 151(7), 3454-9

- Noh JY, Hamada N, Inoue Y, Abe Y, Ito K, Ito K (2000) Thyroid-stimulating antibody is related to Graves' ophthalmopathy, but thyrotropin-binding inhibitor immunoglobulin is related to hyperthyroidism in patients with Graves' disease. Thyroid 10(9), 809-13
- Oda Y, Sanders J, Roberts S, Maruyama M, Kiddie A, Furmaniak J, Rees Smith B (1999) Analysis of carbohydrate Residues on Recombinant Human Thyrotropin Receptor. *JCEM* 84, 2119-2125
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le TI, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: AG protein-coupled receptor. *Science* 289, 739–745
- Park JH, Scheerer P, Hofmann KP, Choe H W, Ernst OP (2008) Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature* 454, 183-187
- Parma J, Duprez L, Van Sande J, Cochaux P, Gervy C, Mockel J, Dumont J, Vassart G (1993) Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature* 365, 649-651
- Parma J, Duprez L, Van Sande J, Paschke R, Tonacchera M, Dumont J, Vassart G (1994) Constitutively active receptors as a disease-causing mechanism. *Mol Cell Endocrinol* 100, 159-162
- Parma J, Van Sande J, Swillens S, Tonacchera M, Dumont J, Vassart G (1995) Somatic mutations causing constitutive activity of the thyrotropin receptor are the major cause of hyperfunctioning thyroid adenomas: identification of additional mutations activating both the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and inositol phosphate-Ca2+ cascades. *Mol Endocrinol* 9(6), 725-33
- Parnot C, Miserey-Lenkei S, Bardin S, Corvol P, Clauser E (2002a) Lessons from constitutively active mutants of G protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol Metab* 13, 336-343
- Persani L, Calebiro D, Bonomi M (2007) Technology Insight: modern methods to monitor protein-protein interactions reveal functional TSH receptor oligomerization. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3(2), 180-90
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 639-650
- Postiglione MP, Parlato R, Rodriguez-Mallon A, Rosica A, Mithbaokar P, Maresca M, Marians RC, Davies TF, Zannini MS, De Felice M, Di Lauro R (2002) Role of the thyroid-stimulating hormone receptor signaling in development and differentiation of the thyroid gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15462-15467
- Rapoport B, McLachlan SM, Kakinuma A, Chazenbalk GD (1996) Critical relationship between autoantibody recognition and thyrotropin receptor maturation as reflected in the acquisition of complex carbohydrate. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 2525-2533

- Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VR, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GF, Weis WI, Kobilka BK (2007) Crystal structure of the human beta(2) adrenergic G-proteincoupled receptor *Nature* 450(7168), 383-7
- Rasmussen SG, Choi HJ, Fung JJ, Pardon E, Casarosa P, Chae PS, Devree BT, Rosenbaum DM, Thian FS, Kobilka TS, Schnapp A, Konetzki I, Sunahara RK, Gellman SH, Pautsch A, Steyaert J, Weis WI, Kobilka BK (2011) Structure of a nanobody-stabilized active state of the $\beta(2)$ adrenoceptor *Nature* 469(7329),175-80
- Rodien P, Ho SC, Vlaeminck V, Vassart G, Costagliola S (2003) Activating mutations of TSH receptor. *Ann Endocrinol (Paris)* 64, 12-16
- Rosenbaum DM, Rasmuissen SG, Kobilka BK (2009) The structure and function of G.protein-coupled receptors. *Nature* 459, 356-363
- Rovati GE, Capra V, Neubig RR (2007) The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. Mol Pharmacol 71(4), 959-64
- Sanders J, Chirgadze DY, Sanders P, Baker S, Sullivan A, Bhardwaja A, Bolton J, Reeve M, Nakatake N, Evans M, Richards T, Powell M, Miguel RN, Blundell TL, Furmaniak J, Smith B. (2007) Crystal structure of the TSH receptor in complex with a thyroid-stimulating autoantibody. *Thyroid* 17(5), 395-410
- Saunier B, Tournier C, Jacquemin C, Pierre M (1995) Stimulation of mitogenactivated protein kinase by thyrotropin in primary cultured human thyroid follicles. *J Biol Chem* 270, 3693-3697
- Schöneberg T, Schulz A, Biebermann H, Hermsdorf T, Rompler H, Sangkuhl K (2004) Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases. *Pharmacol Ther* 104, 173-206
- Schwartz TW, Frimurer TM, Holst B, Rosenkilde MM, Elling CE (2006) Molecular mechanism of 7TM receptor activation-a global toggle switch model. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46, 481-519
- Shacham S, Topf M, Avisar N, Glaser F, Marantz Y, Bar-Haim S, Noiman S, Naor Z, Becker OM (2001) Modeling the 3D structure of GPCRs from sequence. *Med Res Rev* 21, 472-483
- Seifert R, Wenzel-Seifert K (2002) Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: Cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 366, 381-416
- Simon MI, Strathmann MP, Gautam N (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252, 802–808

- Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E (1997) The follicle-stimulating hormone receptor: Biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev* 18, 739-773
- Smit MJ, Vischer HF, Bakker RA, Jongejan A, Timmerman H, Pardo L, Leurs R (2007) Pharmacogenomic and structural analysis of constitutive G proteincoupled receptor activity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47, 53-87
- Smith BJ, Wales MR, Perry MJ (1993) Assays of cyclic nucleotides. A review of current techniques. *Appl Biochem Biotechnol* 41(3), 189-218
- Standfuss J, Edwards PC, D'Antona A, Fransen M, Xie G, Oprian DD, Schertler GF (2011) The structural basis of agonist-induced activation in constitutively active rhodopsin. *Nature* 471(7340), 656-60
- Stenkamp RE, Teller DC, Palczewski K (2005) Rhodopsin: a structural primer for Gprotein coupled receptors. Arch Pharm (Weinheim) 338(5-6), 209-16
- Stockell HA, Renwick AG (1992) Molecular structures of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components. *Biochem J* 287(3), 665-679
- Sum CS, Tikhonova IG, Costanzi S, Gershengorn MC (2009) Two arginine-glutamate ionic locks near the extracellular surface of FFAR1 gate receptor activation. *J Biol Chem* 284, 3529-3536
- Surgand JS, Rodrigo J, Kellenberger E, Rognan D (2006) A chemogenomic analysis of the transmembrane binding cavity of human G-protein-coupled receptors. *Proteins* 62, 509-538
- Szkudlinski MW, Fremont V, Ronin C, Weintraub BD (2002) Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationship. *Physiol Rev* 82, 473-502
- Tanaka K, Nagayama Y, Nishihara E, Namba H, Yamashita S, Niwa M (1998) Palmitoylation of human thyrotropin receptor: slower intracellular trafficking of the palmitoylation-defective mutant. *Endocrinology* 139, 803-806
- Tanaka K, Chazenbalk GD, McLachlan SM, Rapoport B (1999) Subunit structure of thyrotropin receptors expressed on the cell surface. *J Biol Chem* 274, 33979-33984
- Tonacchera M, Van Sande J, Cetani F, Swillens S, Schvartz C, Winiszewski P, Portmann L, Dumont JE, Vassart G, Parma J (1996) Functional characteristics of three new germline mutations of the thyrotropin receptor gene causing autosomal dominant toxic thyroid hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 81(2), 547-54

- Tonacchera M, Chiovato L, Pinchera A, Agretti P, Fiore E, Cetani F, Rocchi R, Viacava P, Miccoli P, Vitti P (1998) Hyperfunctioning thyroid nodules in toxic multinodular goiter share activating thyrotropin receptor mutations with solitary toxic adenoma. J Clin Endocrinol Metab 83(2), 492-8
- Tournier C, Gavaret JM, Jacquemin C, Pierre M, Saunier B (1995) Stimulation of mitogen-activated protein kinase by thyrotropin in astrocytes. *Eur J Biochem* 228, 16-22
- Tunaru S, Lättig J, Kero J, Krause G, Offermanns S (2005) Characterization of determinants of ligand binding to the nicotinic acid receptor GPR109A (HM74A/PUMA-G). Mol Pharmacol 68(5), 1271-80
- Urizar E, Montanelli L, Loy T, Bonomi M, Swillens S, Gales C, Bouvier M, Smits G, Vassart G, Costagliola S (2005a) Glycoprotein hormone receptors: link between receptor homodimerization and negative cooperativity. *EMBO J* 24(11), 1954-64
- Urizar E, Claeysen S, Deupi X, Govaerts C, Costagliola S, Vassart G, Pardo L (2005b) An Activatio Switch in the Rhodopsin Family of G Protein-coupled Receptors. *J Biol Chem* 280(17), 17135-17141
- Van Sande J, Raspe E, Perret J, Lejeune C, Maenhaut C, Vassart G, Dumont JE (1990) Thyrotropin activates both the cyclic AMP and the PIP2 cascades in CHO cells expressing the human cDNA of TSH receptor. *Mol Cell Endocrinol* 74, R1-R6
- Van Sande J, Swillens S, Gerard C, Allgeier A, Massart C, Vassart G, Dumont JE (1995) In Chinese hamster ovary K1 cells dog and human thyrotropin receptors activate both the cyclic AMP and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate cascades in the presence of thyrotropin and the cyclic AMP cascade in its absence. *Eur J Biochem* 229, 338-343
- van Straten NC, Schoonus-Gerritsma GG, van Someren RG, Draaijer J, Adang AE, Timmers CM, Hanssen RG, van Boeckel CA (2002) The first orally active low molecular weight agonists for the LH receptor: thienopyr(im)idines with therapeutic potential for ovulation induction. *Chembiochem* 3(10), 1023-6
- van Straten NC, van Berkel TH, Demont DR, Karstens WJ, Merkx R, Oosterom J, Schulz J, van Someren RG, Timmers CM, van Zandvoort PM (2005) Identification of substituted 6-amino-4-phenyltetrahydroquinoline derivatives: potent antagonists for the follicle-stimulating hormone receptor. *J Med Chem* 48, 1697-1700
- Vassart G, Dumont JE (1992) The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocr Rev* 13, 596-611
- Vassart G, Pardo L, Costagliola S (2004) A molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors. *Trends Biochem Sci* 29, 119-126

- Vizek K, Razova M, Melichar V (1979) Lipolytic effect of TSH, glucagon and hydrocortisone on the adipose tissue of newborns and adults in vitro. *Physiol Bohemoslov* 28, 325–331
- Vlaeminck-Guillem V, Ho SC, Rodien P, Vassart G, 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
- Voigt C, Prodinger C, Paschke R (2007) The TSH receptor is linked with AP1 and NFkappaB signaling in COS7 cells. Exp Clin Endocrinol Diabetes 115(9), 590-3
- Wall JR, Lahooti H (2010) Pathogenesis of thyroid eye disease--does autoimmunity against the TSH receptor explain all cases? Endokrynol Pol 61(2), 222-7
- Warne A, Serrano-Vega MJ, Baker JG, Moukhametzianov R, Edwards PC, Henderson R, Leslie AGW, Tate CG, Schertler GFX (2008) Structure of the Beta1-Adrenergic G Protein-Coupled Receptor. *Nature* 454(7203), 486-91
- Wonerow P, Chey S, Führer D, Holzapfel HP, Paschke R (2000) Functional characterization of five constitutively activating thyrotrophin receptor mutations. *Clin Endocrinol (Oxf)* 53(4), 461-8
- Ye S, Zaitseva E, Caltabiano G, Schertler GF, Sakmar TP, Deupi X, Vogel R (2010) Tracking G-protein-coupled receptor activation using genetically encoded infrared probes. *Nature* 464(7293), 1386-9
7. Anhang

7.1. Konzentrations-Wirkungs-Kurven der TSHR-Mutanten

Für jede TSHR-Mutante ist exemplarisch je eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve im Vergleich zum mitgeführten TSHR-Wildtyp abgebildet. Dazu wurden HEK293-Zellen transient mit dem wildtypischen TSHR oder einer TSHR-Mutante transfiziert. Die intrazelluläre cAMP-Konzentration wurde in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration an bovinem TSH mittels Radioimmunoassay gemessen.







7.2. Die Aminosäuresequenz des humanen TSH-Rezeptors



Abbildung 7.1: Darstellung der verwendeten wildtypischen humanen TSHR-Sequenz (UniProt-Nummer: P16473); Die Bezugspunkte der Ballesteros-Weinstein-Nomenklatur sind rot umrandet. In gelb sind die Positionen dargestellt, an denen Mutationen eingeführt wurden.

7.3. Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
AP1	activator protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bTSH	bovines TSH
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
c1	compound 1
c2	compound 2
c52	compound 52
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cb2/3	Cysteinbox 2/3
CG	Choriogonadotropin
СН	Schweiz
cm	Zentimeter
cpm	counts per minute
D	Deutschland
d.h.	das heißt
DK	Dänemark
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EZS	extrazelluläre Schleife
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EGTA	Ethylendioxy-bis(ethylennitrilo)-tetraessigsäure
Endo H	Endoglykosidase H
et al.	et alii
etc.	et cetera
FACS	fluorescence activated cell sorting
FKS	Fetales Kälberserum
FSH	Follitropin
FSHR	Follitropinrezeptor
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	green fluorescent protein
GPHR	Glykoproteinhormonrezeptor
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Glykoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HEK	humane embryonale Nierenzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
H ₂ O	Reinstwasser
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
lgG	Immunglobulin G
InsP	Inositolphosphat
IP	Immunpräzipitation
IU	Internationale Unit
IZS	intrazelluläre Schleife
Kana	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
I	Liter

LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LH	Lutropin
LHCGR	Rezeptor für das luteinisierende Hormon und
	Choriogonadotropin
LRR	Leucine-rich repeat
LRRD	Leucine-rich repeat-Domäne
Μ	Molar
mA	Milliampere
MAPK	mitogen-activated-protein-Kinase
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NBT	p-Nitro-Tetrazolium-Blau-Chlorid
Nd	nicht detektierbar
ΝϜκΒ	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng	Nanogramm
NL	Niederlande
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PBS-CM	PBS mit Calcium und Magnesium
PCR	Polymerasekettenreaktion
рН	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pmol	Pikomol
PNGase F	N-Glykosidase F
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	Boten-RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SBA	spezifische basale Aktivität
SD	Standardabweichung

SDS	Natriumdodecylsulfat
S	Sekunde
ТЗ	Triiodthyronin
T4	Thyroxin
TBS-T	Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
ТМН	Transmembranhelix
TRH	Thyreoliberin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon
TSHR	Thyrotropinrezeptor
UK	United Kingdom
USA	United States of America
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht / Volumen
WT	Wildtyp
x	mal
z.B.	zum Beispiel
μg	Mikrogramm
μΙ	Mikroliter

7.4. Abkürzungen der Aminosäuren

Einbuchstabencode	Dreibuchstabencode	Aminosäure
A	Ala	Alanin
С	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
н	His	Histidin
I	lle	Isoleucin
К	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
Μ	Met	Methionin
Ν	Asn	Asparagin
Р	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
т	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

7.5. Publikationen, Vorträge, Poster und Abstracts

7.5.1. Publikationen

Kleinau G*, <u>Haas AK*</u>, Neumann S, Worth C, Hoyer I, Furkert J, Rutz C, Gershengorn MC, Schülein R, Krause G (2010) Signaling-sensitive amino acids surround the allosteric ligand binding site of the thyrotropin receptor *FASEB J* 24(7), 2347-54

* gleichwertiger Beitrag der Autoren

<u>Haas AK</u>^{*}, Kleinau G^{*}, Hoyer I, Neumann S, Furkert J, Rutz C, Schülein R, Gershengorn MC, Krause G (2011) Mutations that silence constitutive signaling activity in the allosteric ligand-binding site

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

Cell Mol Life Sci 68(1), 159-67Jul 22

* gleichwertiger Beitrag der Autoren

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

From molecular details of the interplay between transmembrane helices of the thyrotropin receptor to general aspects of signal transduction in family A GPCRs *J Biol Chem,* May 17. [Epub ahead of print]

7.5.2. Vorträge

<u>Haas AK (</u>2010)

Distinguishing features for small allosteric agonist and antagonist binding modes at the thyrotropin receptor

26. Arbeitstagung Experimentelle Schilddrüsenforschung (AESF), 2.-4. Dezember 2010, Halle

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

Identification of inverse agonistic mutations surrounding the low molecular weight ligand binding pocket of the thyrotropin receptor

53. Symposion der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE), 3.-6. März 2010, Leipzig

<u>Haas AK</u>, Kleinau G, Neumann S, Worth CL, Schülein R, Krause G (2009) Identification of a new cluster of transmembrane residues that are essential for switching the thyrotropin receptor to the active state 34th Annual Meeting of the *European Thyroid Association (ETA)*, 5.-9. September

34th Annual Meeting of the European Thyroid Association (ETA), 5.-9. September 2009, Lissabon

7.5.3. Poster und Abstracts

Haas AK, Kleinau G, Hoyer I, Furkert J, Schülein R, Neumann S,. Gershengorn MC, Krause G (2010)

Molecular and structural insights into switching small molecule/TSHR complexes between active and inactive states

14th International Thyroid Congress, 11.-16. September 2010, Paris

Hoyer I, Kleinau G, <u>Haas AK</u>, Kreuchwig A, Worth C, Schuelein R, Krause G (2010) Transmembrane helix 5 of the thyrotropin receptor likely exhibits different conformations than in other GPCR structures and function as a stabilizing component for the active state

14th International Thyroid Congress, 11.-16. September 2010, Paris

Haas AK, Kleinau G, Hoyer I, Neumann S, Kreuchwig A, Schuelein R, Gershengorn MC, Krause G (2010)

Mutation data driven differentiation between activating and inactivating pharmacophoric patterns surrounding the allosteric small ligand binding pocket of the thyrotropin receptor

14th International Thyroid Congress, 11.-16. September 2010, Paris

Hoyer I, Kleinau G, <u>Haas AK</u>, Schuelein R, Krause G (2010)

Mapping of the complete interface of signaling sensitive amino acids between helices 5 and 6 of the thyrotropin receptor

53. Symposion der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE), 3.-6. März 2010, Leipzig

7.6. Erklärung

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

Ann-Karin Haas