

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

DISSERTATION

**Klinische und molekularbiologische Effekte der
Mutation C105Vfs114X im TSHB Gen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Laura Charlotte Ida Kalveram

aus München

Datum der Promotion: 18.12.2020

Vorwort

Die in dieser Arbeit durchgeführte Literaturrecherche, aufgestellten Hypothesen sowie Ergebnisse der Experimente und die Diskussion dieser wurden inklusive einiger Abbildungen bereits in Teilen im Rahmen der folgenden Publikationen veröffentlicht:

Publikation 1:

Kleinau G.*, **Kalveram L.***, Köhrle J., Szkudlinski M., Schomburg L., Biebermann H., Grüters-Kieslich A.; Insights Into the Structural and Molecular Consequences of the TSH- β Mutation C105Vfs114X; Mol Endocrinol.; 2016.

* geteilte Erstautorenschaft

Publikation 2:

Kalveram L., Kleinau G, Szymańska K, Scheerer P, Rivero-Müller A, Grüters-Kieslich A, Biebermann H. The Pathogenic TSH β -subunit Variant C105Vfs114X Causes a Modified Signaling Profile at TSHR. Int J Mol Sci. 2019.

Für Mami & Papi

Inhaltsverzeichnis

Vorwort.....
Inhaltsverzeichnis
Abkürzungsverzeichnis
Abbildungsverzeichnis
Tabellenverzeichnis
Kurzfassung
Abstract.....
1 Einleitung und Zielsetzung	1
1.1 Formen der angeborenen Hypothyreose.....	1
1.2 Der thyreotrope Regelkreislauf	4
1.3 Wirkung der Schilddrüsenhormone	5
1.4 Aufbau des TSH	5
1.5 Mutationen im <i>TSHB</i> Gen.....	6
1.5.1 Klinisches Bild der C105Vfs114X Mutation	7
1.6 Molekulare Grundlagen	8
1.6.1 Molekularbiologische Beschreibung der C105V114X Mutation.....	8
1.7 Grenzen des Neugeborenen Screenings.....	10
1.7.1 Struktur motive der Glycoprotein hormone	11
1.7.2 Molekularbiologische Auswirkungen der C105Vfs114X Mutation	11
1.7.3 Vergleich mit Mutationen in anderen Glycoprotein hormones.....	15
1.7.4 Erkenntnisse zu den Auswirkungen der TSH/TSHR-Interaktion	16
1.8 Zielsetzung dieser Arbeit	18
2 Materialien und Geräte	21
2.1 Materialien	21
2.1.1 Zellreihen	21
2.1.2 Antibiotika und Antimykotika.....	22
2.1.3 Medien und Zusätze in der Zellkultur.....	22
2.1.4 Weitere Reagenzien und Chemikalien	23
2.1.5 Verwendete Reagenziensysteme	24
2.1.6 Antikörper und Größenmarker	25
2.1.7 Hormone und Enzyme	25
2.1.8 Medien, Puffer und Lösungen.....	26
2.2 Plasmide, Sequenzen und Vektoren	28
2.3 Technische Geräte	28

2.4	Software.....	29
2.5	Fragebogen	29
3	Methoden	31
3.1	Generierung der Konstrukte.....	32
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	34
3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	35
3.2.2	Ortsgerichtete Mutagenese.....	36
3.2.3	Verdau mit <i>DpnI</i>	38
3.2.4	Agarose Gelelektrophorese	38
3.2.5	DNA-Aufarbeitung	39
3.2.6	Restriktionsverdau	40
3.2.7	Ligation.....	41
3.2.8	Herstellung chemisch kompetenter DH5- α E.coli Zellen	42
3.2.9	Transformation in chemisch kompetente DH5- α E.coli Zellen.....	42
3.2.10	Sequenzierung.....	43
3.2.11	Herstellung eines rekombinanten Bacmids.....	45
3.3	Methoden der Zellkultur	48
3.3.1	Allgemeines.....	48
3.3.2	Kultivierung und Ernte.....	49
3.3.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	49
3.3.4	Zellzahlbestimmung	50
3.3.5	Zellkultivierung von Insektenzellen	50
3.3.6	Transiente Transfektion	51
3.3.7	Probenfixierung für konfokales Mikroskop	57
3.4	Mikroskopie	57
3.4.1	Quantifizierung der Proteinmenge anhand des Lichtmikroskops.....	57
3.4.2	Quantifizierung der Proteinmenge anhand des konfokalen Lasermikroskop.....	59
3.5	Proteinbiochemische Methoden.....	60
3.5.1	Probenaufarbeitung.....	60
3.5.2	Proteinanalytik.....	60
3.5.3	Funktionelle Charakterisierung der rekombinanten Proteine	65
3.5.4	Viability Assay	72
3.6	Statistik.....	73
4	Ergebnisse	75
4.1	Klinische Daten	75
4.1.1	Analyse der bisherigen phänotypischen Befunde bei Patienten mit der TSHB C105Vfs114X Mutation	75
4.1.2	Beschreibung der Berliner Patienten	78

4.2	Überblick über experimentelle Daten	81
4.3	Optimierung der Transfektionseffizienz.....	82
4.3.1	Bestimmung der eingesetzten DNA-Menge.....	82
4.4	Bestimmung der TSH-Konzentration	83
4.4.1	Bestimmung mittels ELISA.....	83
4.4.2	Bestimmung mittels Western Blot	84
4.4.3	Semiquantitative Bestimmung mittels konfokalen Mikroskops.....	86
4.5	Mikroskopischer Vergleich der Intensitäten	89
4.6	Viability Assay	90
4.7	Überprüfung der Signalisierung des WT und der Mutanten.....	94
4.7.1	cAMP-Assay mit HEK293-TSHR Zellen.....	94
4.7.2	cAMP-Assay mit FTC133-TSHR Zellen	95
4.7.3	Reporterassays NFAT/SRE	97
4.7.4	IP1-Assay.....	99
5	Diskussion	101
5.1	Besonderheiten der Mutation C105Vfs114X.....	101
5.1.1	Unterschiedliche phänotypische Ausprägungen der C105Vfs114X Mutation	101
5.2	Limitationen der eingesetzten Methoden bei den zellbiologischen Experimenten.....	103
5.2.1	Limitationen der Zellsysteme	103
5.2.2	Limitationen der antikörperbasierten Nachweisverfahren	105
5.2.3	Limitationen der Massenspektrometrie	108
5.2.4	Limitationen der Messungen anhand des konfokalen Mikroskops.....	109
5.2.5	Limitationen der semiquantitativen Abschätzung der TSH-Menge	111
5.2.6	Unterschiedliche Ergebnisse der cAMP-Akkumulation	112
5.2.7	Limitationen der Reporterassays	112
5.3	Einfluss der unterschiedlichen Glykosylierungsmuster	113
5.4	Diskussion der Hypothesen im Hinblick auf die Funktionalität der Variante C105Vfs114X	117
5.5	Übertragbarkeit der in vitro Ergebnisse auf die in vivo Situation.....	120
5.6	Auswirkungen der freien α -Untereinheit.....	120
5.7	Vergleich mit der Arbeit von Medeiros-Neto et al. 1996.....	122
6	Fazit und Ausblick	124
7	Anhang	127
7.1	Primersequenzen	127
7.2	Plasmide und Vektorkarten	128
7.3	Sequenzen der verwendeten Gene	130

7.4	Fragebogen.....	131
8	Literaturverzeichnis.....	132
9	Eidesstattliche Versicherung	143
10	Anteilerklärung an erfolgten Publikationen	144
11	Lebenslauf.....	145
12	Publikationsliste.....	147
13	Danksagung	148

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintripphosphat
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovines Serumalbumin
bTSH	bovines Thyroidea-stimulierendes Hormon
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CHO	Chinese Hamster Ovary (Cells)
CG	Choriongonadotropin
CGA	Chorionic Glycoprotein alpha
Ctt	C-Terminus
Cys	Cystein
DAG	Diacylglycerin
ddH₂O	Doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	2'Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escheria coli (Bakterienstamm)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatische Retikulum
ERK	Extracellular-signal regulated kinases (Signalweg)
FKS	Fetales Kälberserum
FTC	Follicular Thyroid Cancer (Cells)
GH	Growth Hormone
GPA2	Glycoprotein Hormone α 2-Untereinheit
GDP	Guanosindiphosphat
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GPHB5	Glycoprotein β 5-Untereinheit
GTP	Guanosintripphosphat
HEK	Human Embryonic Kidney (Cells)
HESX1	Homeobox Expressed In ES Cells 1
HR	Hinge region
HRP	Horseradish Peroxidase
hTSH	humanes TSH
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IP1	Inositolmonophosphat
IP2	Inositolbiphosphat
IP3	Inositoltriphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
FSHB	Beta Untereinheit des Follikel-stimulierenden Hormons
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LB	Lysogeny broth (Nährmedium)
LH	Luteinisierendes Hormon
LHB	Beta Untereinheit des luteinisierenden Hormons

LHCGR	Luteinisierungshormon/Choriogonadotropinrezeptor
LHX3	LIM Homeobox 3
LHX4	LIM Homeobox 4
LLRD	Leucine rich repeat domain
L-Thyroxin	Levothyroxin, T4
MAPK	Mitogen-activated protein kinase (Signalweg)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromolar
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NEA	Nicht essentielle Aminosäuren
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
Ntt	N-Terminus
NSB	Nichtspezifische Bindung
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PES	Phenanzin Ethosulfat
PFA	Paraformaldehyd
PIP₂	Phosphatidylinositol-4,5-Biphosphat
PIT1	Pituitary specific transcription factor
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLS	Passive Lysis Buffer
PROP1	Homeobox protein prophet of PIT-1
PPi	Pyrophosphat
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
Sf-9	Ovar-Zellen aus Insekten <i>Spodoptera frugiperda</i>
SILAC	Stable Isotope Labeling with Amino Acids in Cell Culture
SOB	Super Optimal Broth (Nährmedium)
SOC	SOB with Catabolite repression (Nährmedium)
SOX3	SRY-box transcription factor 3
SRE	Serum Reponse Element
T	Base Thymin
T3	Triiodthyronin
T4	Thyroxin
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
Tn-5	Ovar-Zellen aus Insekten <i>Trichopulsia-ni</i>
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon
TSHB	Beta Untereinheit des Thyroidea-stimulierenden Hormons
TSHR	Thyroidea-stimulierendes Hormon Rezeptor
TRH	Thyreotropin Releasing Hormone

TRHR	Thyreotropin Releasing Hormone Rezeptor
Tris-HCl	Tris-Hydrochlorid
rT3	Reverses Triiodthyronin
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Einteilung der kongenitalen Hypothyreosen hinsichtlich ihrer Ursachen.....	1
Abbildung 1.2: Übersicht des thyreotropen Regelkreislaufs.	4
Abbildung 1.3: Übersicht der T-Deletion in Exon 3 des TSH.....	9
Abbildung 1.4: Vergleich der Aminosäuresequenz von TSHB-WT und der C105Vfs114X Mutante.....	9
Abbildung 1.5: Die Abbildung zeigt das TSH-Protein, gebunden an den TSHR/G-Protein Komplex.....	14
Abbildung 3.1: Übersicht der verwendeten Methoden.....	32
Abbildung 3.2: Abbildung der generierten Konstrukte.....	33
Abbildung 3.3: Abbildung der zusätzlich generierten Konstrukte.....	34
Abbildung 3.4: Ablauf der ortsgerichteten Mutagenese mit Substitution einer DNA-Sequenz.....	36
Abbildung 3.5: Schematischer Ablauf der Proteinexpression im Bac-to-Bac-Baculovirus Expressionsystem..	45
Abbildung 3.6: Schematischer Ablauf der transienten Transfektion in HEK293 und CHO-Zellen.....	52
Abbildung 3.7: Schematische Darstellung des Semi-Dry-Blottings.....	63
Abbildung 3.8: Schematische Darstellung des AlphaSreen cAMP Assays.	66
Abbildung 3.9: Schematischer Ablauf des Reportergenassays.....	70
Abbildung 4.1: Säugling mit lebensbedrohlicher kongenitaler Hypothyreose..	79
Abbildung 4.2: Säugling mit schwerer konnataler Hypothyreose.....	80
Abbildung 4.3: Abbildung über die experimentelle Vorgehensweise, Ergebnisse und Auswirkungen.....	82
Abbildung 4.4: Nachweis des produzierten hTSH und Thyrostimulin mittels Western Blot.	85
Abbildung 4.5: Vergleich der Transfektionseffizienz in CHO- und HEK293-Zellen.....	86
Abbildung 4.6: Vergleich der WT-TSH Konzentration in CHO- und HEK293-Zellen.....	87
Abbildung 4.7: Nachweis der TSH Expression.....	88
Abbildung 4.8: Nachweis der TSH-Expression.....	89
Abbildung 4.9: Vergleich der Lichtintensitäten zur Quantitätsbestimmung.....	90
Abbildung 4.10: Viability Assay in HEK293-Zellen.....	91
Abbildung 4.11: Viability Assay in FTC133-TSHR-Zellen.....	93
Abbildung 4.12: Funktionelle Charakterisierung des Gs/Adenylatzyklase Signalweges in HEK293 Zellen.....	95
Abbildung 4.13: Funktionelle Charakterisierung des Gs/Adenylatzyklase Signalweges in FTC133+TSHR Zellen.....	96
Abbildung 4.14: Funktionelle Charakterisierung des MAPK-Signalweges.....	98
Abbildung 4.15: Funktionelle Charakterisierung des Gq/11-Signalweges.....	99

Abbildung 5.1: Ausschnitt der Sequenz des AmCyan-P2A-mCherry Vektors und des <i>TSHB</i>	110
Abbildung 7.1: Übersicht über die verwendeten Vektoren.....	129
Abbildung 7.2: Verwendete Fragebogen	131

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Übersicht der Mutationen im TSHB Gen.....	6
Tabelle 2.1: Verwendete Zellreihen	21
Tabelle 2.2: Verwendete Antibiotika und Antimykotika	22
Tabelle 2.3: Verwendete Medien und Zusätze in der Zellkultur.....	22
Tabelle 2.4: Verwendete Reagenzien und Chemikalien.....	23
Tabelle 2.5: Verwendete Reagenziensysteme	24
Tabelle 2.6: Verwendete Antikörper.....	25
Tabelle 2.7: Verwendete Größenmarker.....	25
Tabelle 2.8: Verwendete Hormone und Enzyme	25
Tabelle 2.9: Verwendete Medien zur Bakterienanzucht	26
Tabelle 2.10: Verwendete Puffer und Lösungen.....	26
Tabelle 2.11: Technische Geräte.....	28
Tabelle 3.1: Ansatz der Polymerase-Kettenreaktion.....	35
Tabelle 3.2: Cyclor Programm der Polymerase-Kettenreaktion.....	36
Tabelle 3.3: Ansatz der ortsgerichteten Mutagenese	37
Tabelle 3.4: Thermo-Cycler Programm für ortsgerichtete Mutagenese.....	37
Tabelle 3.5: Übersicht der verwendeten Kits zur DNA-Aufarbeitung	39
Tabelle 3.6: Ansatz Restriktionsverdau	41
Tabelle 3.7: Ansatz Ligation.....	41
Tabelle 3.8: Ansatz Sequenzierung	44
Tabelle 3.9: Cyclor Programm für Sequenzierung.....	44
Tabelle 3.10: Zusätze der LB-Agarplatten für Transformation in DH10Bac™ Zellen	46
Tabelle 3.11: Übersicht der verwendeten Zellen, Medien und Zusätze.....	48
Tabelle 3.12: Übersicht der durchgeführten Transfektionen.....	56
Tabelle 3.13: Übersicht der verwendeten Wellenlängen	58
Tabelle 3.14: Protokoll zur Messung der Lichtintensitäten	58
Tabelle 3.15: Ansatz eines 15% Trenngels	62
Tabelle 3.16: Ansatz eines Sammelsgels	62
Tabelle 3.17: Ansatz Akzeptorbeads cAMP-Assay.....	68
Tabelle 3.18: Ansatz Donorbeads cAMP-Assay	68
Tabelle 4.1: Übersicht über die publizierten Patienten mit der Mutation C105Vfs114X.....	76
Tabelle 4.2: Serum Laborparamter von Patient 1 mit C105Vfs114X Mutation am 14. Lebenstag	79
Tabelle 4.3: Serum Laborparamter von Patientin 2 mit C105Vfs114X Mutation mit 4 Monaten	80
Tabelle 4.4: Vergleich der eingesetzten DNA-Mengen.....	83
Tabelle 7.1: Übersicht über verwendete Primersequenzen	127
Tabelle 7.2: Übersicht über verwendete Plasmide	128

Kurzfassung

Kongenitale Hypothyreosen sind mit einer Inzidenz von etwa 1:3.500 die häufigste angeborene endokrine Erkrankung. Die meisten Patienten weisen eine primäre Hypothyreose auf, die in der Regel durch eine abnorme Entwicklung der Schilddrüse bedingt ist. Sekundäre beziehungsweise zentrale Hypothyreosen sind mit einer Inzidenz von ca. 1:50.000 wesentlich seltener. Eine der Ursachen dafür sind Mutationen im *TSHB* Gen, welche zu einem isolierten TSH-Mangel führen. Man ging lange davon aus, dass sekundäre Hypothyreosen zu einem wesentlich milderen Phänotyp als primäre Hypothyreosen führen. Dies trifft jedoch nicht für Patienten mit einer Mutation in der β -Untereinheit des TSH und insbesondere nicht für Patienten mit der Mutation **C105Vfs114X** zu. Hinzu kommt, dass diese Patienten nicht im Neugeborenscreening detektiert werden, da dieses auf der alleinigen Messung von TSH beruht, welches in diesen Fällen in der Regel unterhalb der Nachweisgrenze oder im unteren Normbereich liegt. Patienten mit dieser Mutation fallen mit ausgeprägten Symptomen einer schweren konnatalen Hypothyreose auf und haben langfristige psychomotorische sowie neurokognitive Defizite, da die Mutation meist nicht so früh erkannt wird, dass die Substitutionstherapie mit L-Thyroxin Langzeitschäden verhindert. Weshalb diese Mutation zu einem so schweren Phänotyp führt, sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Ein besonderer Pathomechanismus, z.B. im Sinne eines invers-agonistischen Effekts des mutierten TSH am TSH-Rezeptor, wurde seit Ende der 90er Jahren vermutet. Besonderes Augenmerk wurde in dieser Arbeit auf den Verlust einer Disulfidbrückenbindung und den verkürzten C-Terminus gelegt. Dadurch potentiell bedingte Veränderungen der Formation des Proteins könnten diesen spezifischen Pathomechanismus bedingen. Um dies zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit verschiedene *TSHB*-Mutanten generiert und rekombinantes hTSH durch transiente Transfektion in HEK293 Zellen hergestellt. Die Menge des hergestellten hTSH wurde gemessen und das hTSH funktionell charakterisiert. In dieser Arbeit konnte ein invers-agonistischer Effekt der Mutation ausgeschlossen werden. Darüberhinaus zeigten die Experimente, dass der verkürzte C-Terminus nicht ursächlich für die Effekte der Mutation ist. Es ist nicht gelungen eine andere molekulare Ursache für diesen schwerwiegenden Phänotyp zu ermitteln. Dafür bedarf es weiterführender Experimente mit zusätzlichen Mutanten, um weitere Erkenntnisse zu den Auswirkungen dieser Mutation zu erlangen. Ein tieferes Verständnis dieser Mutation könnte nicht nur dazu beitragen, auch Patienten und ihren Eltern das

Krankheitsbild schlüssig zu erklären, sondern ggf. auch dazu beitragen, neue zielgerichtete Therapien z.B. für Patienten mit Hyperthyreose zu entwickeln. Nicht zuletzt kann eine auf molekularer Ebene gesicherte Erkenntnis einer schweren Beeinträchtigung der Schilddrüsenhormonbiosynthese dazu beitragen, dass die Strategie des Neugeborenen Screenings auf angeborene Hypothyreose revidiert wird.

Abstract

Congenital hypothyroidism is – with an incidence of approximately 1:3,500 – the most common congenital endocrine disorder. Most patients are diagnosed with primary congenital hypothyroidism, which is in most cases caused by a developmental defect of the thyroid gland. Comparably, secondary (central hypothyroidism) is very rare with an incidence of 1:50,000. One of the reasons for central hypothyroidism are mutations in the *TSHB* gene, which lead to an isolated TSH-deficiency. It has long been assumed that central hypothyroidism leads to a milder phenotype than primary hypothyroidism does. However, this does not apply to mutations in the β -subunit, especially not to the mutation **C105Vfs114X**. Furthermore, these patients are not detected through newborn screening as this screening is based on TSH, in which β -subunit mutations result in TSH concentrations below or at the lower end of the reference range. Affected patients therefore present with severe signs of congenital hypothyroidism and with long-term psychomotor and neurocognitive deficiencies if the diagnosis is not made in the neonatal period and the start of l-thyroxine replacement is delayed. The aim of this study was to investigate the mechanism by which this specific mutation leads to a more severe phenotype than other forms of central hypothyroidism. Since the 1990s it was presumed that an inverse-agonistic effect of the mutated TSH at the receptor could cause this phenotype. This again, could be caused by the shortened c-terminus, an altered amino acid sequence or the loss of one of the disulfide bridges, which could lead to a modified formation of the protein. Different mutants were generated for the experiments; recombinant hTSH was produced using transient transfection in HEK293 cells. The produced hTSH was measured and a functional characterization of the wildtype as well as of the mutants was conducted. With these experiments an inverse-agonistic effect of the mutation was ruled out and it was proved that the shortened c-terminus is not responsible for the effects of the mutation. However, it was not possible to identify the exact molecular mechanism. In order to do so, further experiments with additional variants will be required. Besides an explanation for patients and their families, a deeper understanding of this mutation could help to develop novel targeted therapies especially for patients with hyperthyroidism. Not least, molecular evidence for a severely altered production of thyroid hormones would underline the necessity to revise the strategy of newborn screening programs for congenital hypothyroidism.

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Formen der angeborenen Hypothyreose

Die kongenitale Hypothyreose (Schilddrüsenunterfunktion) ist mit einer Inzidenz von ca. 1:3.500 die häufigste angeborene endokrine Erkrankung (1). Die Ursachen dafür sind vielfältig und in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt (2).

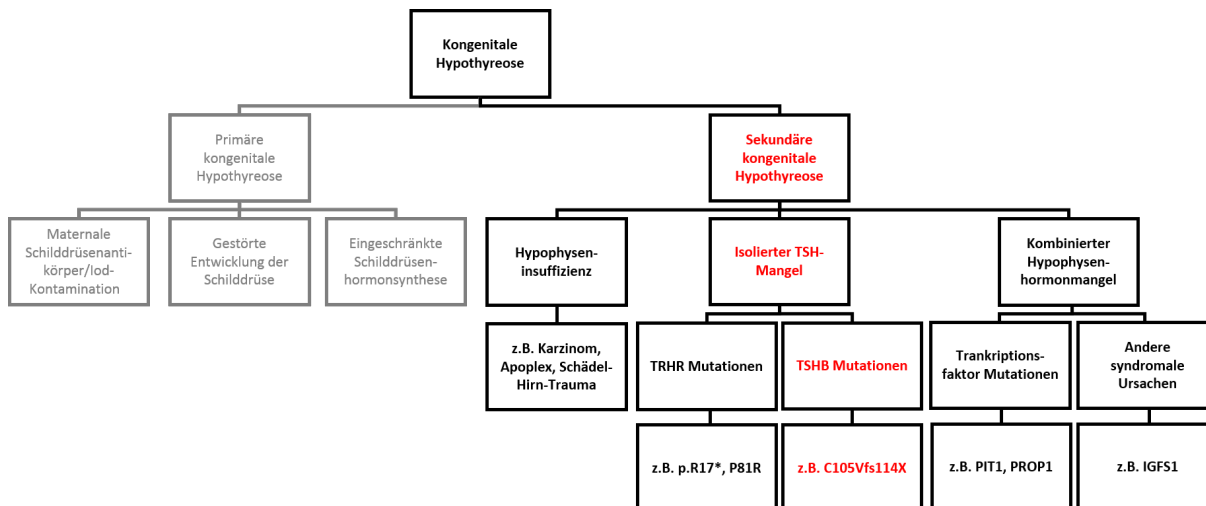


Abbildung 1.1: Einteilung der kongenitalen Hypothyreosen hinsichtlich ihrer Ursachen. Primäre Ursachen sind grau hinterlegt, sekundäre schwarz. Gegenstand dieser Arbeit ist die Mutation C105Vfs114X die in rot hervorgehoben ist. **TSH**: Thyroidea-stimulierendes Hormon; **TSHB**: β -Untereinheit des TSH; **TRHR**: Thyreotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor. **PIT1**: Pituitary specific transcription factor Gen; **PROP1**: Homeobox protein prophet of PIT-1 Gen; **IGSF1**: Immunoglobulin superfamily member 1 Gen.

Einer Hypothyreose können primäre oder zentrale Ursachen zugrunde liegen. Der Großteil der Patienten leidet an einer primären Hypothyreose, bei der eine Störung auf Ebene der Schilddrüse vorliegt. Im Erwachsenenalter beruhen primäre Hypothyreosen in der Mehrzahl der Fälle auf einer Autoimmunthyreoiditis (3). Eine bereits bei der Geburt bestehende Unterfunktion beruht in den meisten Fällen auf einer Entwicklungsstörung der Schilddrüse (1). Die Entwicklungsstörungen der Schilddrüse umfassen ein Spektrum, das Dysplasien, Hypoplasien, Ektopien und Aplasien einschließt (1). Ungefähr 15-20% der primären kongenitalen Hypothyreosen sind auf angeborene Defekte der Schilddrüsenhormonsynthese zurückzuführen. Diese haben Auswirkungen auf den Iodtransport in der Zelle, die Funktion des Thyreoglobulins oder

die Schilddrüsenperoxidasen (4). Es gibt jedoch auch Fälle, bei denen maternale Schilddrüsenantikörper die Funktion der kindlichen Schilddrüse prä- und postnatal beeinträchtigen (5). Diese Störungen sind meist vorübergehend und auf das erste Lebensjahr beschränkt. Unbehandelt können sie in einzelnen Fällen trotzdem zu kognitiven Einschränkungen führen.

Eine Kontamination mit Iod vor oder während der Geburt kann ebenfalls eine transiente Hypothyreose verursachen. Dabei wird die Schilddrüse durch die erhebliche Iod-Zufuhr kurzzeitig supprimiert. In der Folge ist die Schilddrüsenhormonproduktion oft nicht ausreichend. Dieser Zustand normalisiert sich meist kurze Zeit nach Beendigung der Kontamination wieder (6). Bereits 1972 zeigten Klein et al., dass eine frühzeitige Substitution mit Levothyroxin (L-Thyroxin, T₄) bei Kindern mit einer primären kongenitalen Hypothyreose innerhalb der ersten drei Lebensmonate essentiell für eine spätere normale Entwicklung sei (7). In der Folge wurden weltweit Screeningprogramme zur Früherkennung der angeborenen Hypothyreose eingeführt und es konnte gezeigt werden, dass durch eine Behandlung in den ersten beiden Lebenswochen mit einer ausreichenden Schilddrüsenhormondosis eine normale Entwicklung erzielt werden kann. Mittlerweile wird eine Behandlung innerhalb der ersten zwei Lebenswochen mit einer oralen L-Thyroxin Dosis von 10-15 µg/kg KG empfohlen (8, 9).

Wesentlich seltener als die primären Hypothyreosen sind die zentral bedingten Schilddrüsenunterfunktionen (1). Den zentralen Hypothyreosen liegt eine Störung auf Hypothalamus-Hypophysen-Ebene zugrunde. Ursache hierfür können im späteren Lebensalter strukturelle Defekte des Hypothalamus und der Hypophyse beispielsweise aufgrund von Tumoren, Durchblutungsstörungen oder Schädel-Hirn-Traumata sein. Die angeborenen zentralen Hypothyreosen treten mit einer geschätzten Inzidenz von 1: 30.000 – 50.000 auf (10). Allerdings gehen neuere Studien aus den Niederlanden, die auf einem kombinierten Neugeborenen-Screening mit Thyroidea-stimulierendem Hormon (TSH) und T₄ beruhen, von einer Inzidenz von ungefähr 1: 10.000 – 20.000 aus (11, 12). Hierbei handelt es sich um Entwicklungsstörungen des Hypothalamus und/oder der Hypophyse, die durch Mutationen in Transkriptionsfaktoren häufig zu kombinierten hypophysären Hormonmangelzuständen führen. Transkriptionsfaktoren, die bei der Entwicklung der Hypophyse eine Rolle spielen sind z.B. *Pituitary specific transcription factor (PIT1)*, *Homeobox protein prophet of PIT-1 (PROP1)*, *SRY-box*

transcription factor 3 (SOX3), Homeobox Expressed In ES Cells 1 (HESX1), LIM Homeobox 3 (LHX3) oder LIM Homeobox 4 (LHX4) (13-16). Ein ähnliches klinisches Bild liegt auch bei komplexen Syndromen vor. Ein Beispiel dafür sind Mutationen im *Immunoglobulin superfamily member 1 (IGSF1)* Gen (17, 18). Diese können zu einer zentralen Hypothyreose kombiniert mit einem Prolaktin- und/oder Wachstumshormonmangel führen.

Sehr selten ist das Vorliegen einer angeborenen isolierten zentralen Hypothyreose, bei der es nur zu einem TSH Mangel, nicht aber zu Ausfällen anderer hypophysärer Hormone kommt (1). Verantwortlich dafür sind entweder Mutationen im Thyreotropin Releasing Hormone – Rezeptor (TRHR) wie etwa p.R17* und P.81R oder Mutationen, die in der β -Untereinheit des TSH lokalisiert sind (19, 20). Die häufigste Mutation der β -Untereinheit des TSH, die Mutation **C105Vfs114X** wurde erstmals 1996 beschrieben. Die Auswirkungen dieser Mutation wurden im Rahmen dieser Arbeit auf molekularer Ebene im Detail untersucht und im Hinblick auf die vorhandenen klinischen Daten dieser seltenen Erkrankung interpretiert (21).

Im Gegensatz zu den Patienten mit primärer angeborener Hypothyreose ist bei Patienten mit angeborener zentraler Hypothyreose über lange Zeit die Prognose hinsichtlich der mentalen Entwicklung als günstiger angesehen worden. Man ging davon aus, dass die konstitutive Aktivität des TSH Rezeptors in einer sonst normal angelegten und entwickelten Schilddrüse ausreichend ist auch ohne Stimulation durch die Bindung von TSH, eine Schilddrüsenhormonsynthese für den Minimalbedarf sicherzustellen. Beziehungsweise, dass die TSH Sekretion der Hypophyse bei einer Entwicklungsstörung oder auch den *TSHB* (β -Untereinheit des TSH) Mutationen nicht komplett fehlt, da in den Screeningtesten ein TSH Spiegel messbar war. Eine mentale Entwicklungsstörung von Kindern mit einem kombinierten Hypophysenausfall wurde daher der Hypoglykämieeigung durch den Wachstumshormon- und Cortisolmangel zugeschrieben. Die Annahme, dass eine isolierte angeborene zentrale Hypothyreose im Gegensatz zur primären angeborenen Hypothyreose nicht zu bleibenden Schäden führt, ist neben der Seltenheit der Erkrankung der entscheidende Grund, warum das Neugeborenen screening bislang nicht auch auf die Früherkennung der zentralen Hypothyreose durch die gleichzeitige Bestimmung des TSH und freies Triiodthyronin (fT3) und freies Thyroxin (fT4) abzielt.

1.2 Der thyreotrope Regelkreislauf

Physiologisch unterliegt die Synthese, Freisetzung und Stimulation von Schilddrüsenhormonen dem thyreotropen Regelkreis (Abbildung 1.2).

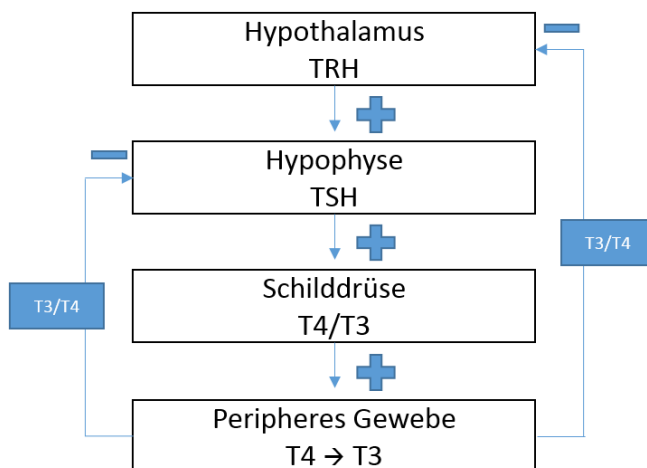


Abbildung 1.2: Übersicht des thyreotropen Regelkreislaufs. Hier stimuliert TRH das TSH, was wiederum Synthese und Freisetzung von T4 und in geringem Maße T3 anregt. Im peripheren Gewebe wird dann T4 in das biologisch aktivere T3 umgewandelt, welches dann wieder im Sinne eines negativen Feedbacks auf den Hypothalamus und auf die Hypophyse wirkt. **TRH**: Thyrotropin-Releasing-Hormon; **TSH**: Thyroidea-stimulierendes Hormon; **T3**: Triiodthyronin; **T4**: Thyroxin.

Dabei wird zunächst das TRH (Thyrotropin Releasing Hormone) in Neuronen des Hypothalamus gebildet und freigesetzt. Diese Freisetzung unterliegt in geringem Maße den Konzentrationen der Schilddrüsenhormone (T3 und T4) im Sinne eines negativen Feedbackmechanismus. Wird TRH im Hypothalamus ausgeschüttet, stimuliert es die Freisetzung von TSH aus den thyreotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens. Außerdem hat es auch einen direkten Einfluss auf die Transkription der beiden Untereinheiten des TSH und regt somit dessen Synthese an. Die α -Untereinheit wird in der Regel im Überschuss produziert. Zum Teil wird sie dann direkt ins Blut sekretiert, teils assoziiert sie mit der β -Untereinheit zum aktiven TSH (22). Die genaue Funktion der freien α -Untereinheiten im Blut ist nicht ganz klar. Sie scheinen jedoch eine protektive Rolle beim Abbau des Heterodimers TSH zu spielen (23).

In der Schilddrüse stimuliert TSH die Biosynthese und die Sekretion der Schilddrüsenhormone T4 und T3 sowie die Aufnahme von Iodid. Ein geringer Teil T3 wird direkt in der Schilddrüse hergestellt und in den Blutkreislauf sezerniert. Der weitaus größere Anteil des T3 entstammt der Dejodierung des T4 im peripheren

Gewebe. T3 ist biologisch ca. 100-fach aktiver als T4 (24). Thyroxin kann aber auch zu reversem T3 (rT3) umgewandelt werden, das biologisch inaktiv ist. Somit ist das Vorhandensein des stoffwechselaktiven T3 im Zielgewebe auch signifikant durch die periphere Aktivität der Dejodasen reguliert (24).

Hohe periphere Schilddrüsenhormonwerte im Serum beeinflussen die TSH-Synthese. Vor allem eine hohe T3 Konzentration in der Hypophyse wirkt hemmend auf die Herstellung und Freisetzung des TSH (22).

1.3 Wirkung der Schilddrüsenhormone

Die Wirkungen der Schilddrüsenhormone im peripheren Gewebe sind vielfältig. Sie erhöhen den Grundumsatz und in der Folge steigt der Sauerstoffverbrauch und die Körpertemperatur. Außerdem regen sie sowohl den Kohlenhydratstoffwechsel als auch den Proteinstoffwechsel an (25). Je nach Stoffwechsellaage können sie außerdem die Lipolyse oder die Liponeogenese fördern (26). Bei Säuglingen und Kindern sind die Effekte noch vielfältiger und spielen eine große Rolle in der Entwicklung der Organsysteme und sind essentiell für die Entwicklung und Reifung von Nervensystem und Skelett (27, 28).

1.4 Aufbau des TSH

Das TSH gehört zu den heterodimerischen Glycoprotein-hormonen. Ebenfalls Mitglieder dieser Hormonfamilie sind das luteinsierende Hormon (Lutropin, LH), das Follikel-stimulierende Hormon (Follitropin, FSH) und das plazentare Choriongonadotropin (CG) (29). Diese Hormone bestehen aus zwei Untereinheiten. Allen gemeinsam ist eine einheitliche α -Untereinheit, die an eine jeweils hormonspezifische β -Untereinheit non-kovalent gebunden ist. Das *Chorionic Glycoprotein alpha (CGA)* Gen ist auf Chromosom 6 (6q14.3) lokalisiert. Es codiert die 92 Aminosäuren der α -Untereinheit, welche 5 Exone aufweist (30). 1988 wurde die β -Untereinheit erstmals kloniert, die aus 118 Aminosäuren besteht, die durch das *TSHB* Gen auf Chromosom 1 (1p13.2) codiert werden und 3 Exone aufweist (31, 32). Assoziieren beide Untereinheiten, entsteht das aktive TSH mit einem molekularen Gewicht von 28-30 kDa.

1.5 Mutationen im *TSHB* Gen

Ebenfalls im Jahr 1988 wurde die erste Mutation in der β -Untereinheit des TSH publiziert (33-35). Seitdem wurden nur zehn weitere Mutationen identifiziert. Sie befinden sich ebenfalls in der β -Untereinheit (Tabelle 1.1) und werden alle autosomal-rezessiv vererbt (21, 36-43).

Tabelle 1.1: Übersicht der Mutationen im *TSHB* Gen

Mutation	Autor/Jahr der Publikation	Journal	Anzahl der Fälle	Anzahl der Publikationen
G29R	Miyai et al. 1988	International Congress Series No. 379	7	3
E12X	Dacou-Voutetakis et al. 1990	Am J Hum Genet	3	1
C105Vfs114X	Medeiros-Neto et al. 1996	J Clin Invest	36	15 *
Q49X	Bonomi et al. 2001	J Clin Endocrinol Metab	5	3
IVS 2+5	Pohlentz et al. 2002	J Clin Endocrinol Metab	6	3
C85R	Sertedakit et al. 2002	Pediatr Res	1	1
F57S, 62X	Morales et al. 2004	J Pediatr Endocrinol Metab	1	1
C88Y	Baquedano et al. 2010	J Clin Endocrinol Metab	1	1
C162G3A	Baquedano et al. 2010	J Clin Endocrinol Metab	1	1
6-kb-Deletion	Hermanns et al. 2014	Horm Res Paediatr	1	1
C.40A>G, c.94G>A	Özhan et al. 2017	J Clin Res Paediatr Endocrinol	2	1

Die Mutation **C105Vfs114X** ist die mit Abstand weltweit häufigste Mutation im *TSHB* Gen und in Tabelle 1.1 blau hervorgehoben (21, 40, 41, 44-55). Sie ist zudem die einzige Mutation in diesem Gen, die auch bei nicht-konsanguinen Familien beschrieben wurde. Immer wieder wurde diskutiert, ob dies auf einen sogenannten *founder effect*, also einen gemeinsamen Vorfahren oder auf einen sogenannten *hot spot*, also einen Bereich, in dem vermehrt Rekombinationen stattfinden, zurückzuführen sei. 2002 konnten Wissenschaftler der Pädiatrischen Endokrinologie der Charité einen *founder effect* für diese Mutation nachweisen und aufgrund von Haplotypanalysen abschätzen, dass die Mutation vor ungefähr 150 Generationen beziehungsweise 3700 Jahren entstanden sein muss (46).

1.5.1 Klinisches Bild der C105Vfs114X Mutation

Alle bekannten Mutationen im *TSHB* Gen führen zu einer kongenitalen zentralen Hypothyreose. Neugeborene und junge Säuglinge fallen oft bereits in den ersten Lebenswochen bis Lebensmonaten durch Hypotonie, Adynamie, eine Trinkschwäche, kurze Wachphasen und/oder eine Hypothermie auf. Nicht selten zeigen sie auch andere klassische klinische Symptome einer Hypothyreose wie einen prolongierten Ikterus, große Fontanellen (v.a. posterior), eine Makroglossie oder eine Umbilikalhernie. Im Verlauf können sie dann auch Anzeichen einer mentalen Retardierung aufweisen (45, 51, 53).

Soweit bekannt zeigen die Patienten nach Geburt typischerweise ein niedriges, aber nachweisbares TSH im Neugeborenenenscreening, welches in den meisten Ländern zwischen der 36. – 72. Lebensstunde erfolgt. Eine simultane Bestimmung des T4 findet bislang nur in vereinzelten Screeningprogrammen statt. Eine frühzeitige Diagnose, die für die weitere Entwicklung der Patienten wichtig ist, da sie ansonsten irreversible motorische und/oder körperliche Entwicklungsstörungen sowie eine deutliche Retardierung entwickeln können, erfolgt daher in der Regel nicht durch das Neugeborenenenscreening (8, 12, 20). Somit entwickeln sich die beschriebenen Symptome über einen Zeitraum von Wochen bis Monaten, bis aufgrund der Symptomatik eine gezielte Diagnostik erfolgt. Das TSH im Serum liegt bei der ersten Bestimmung dann unterhalb des Referenzbereichs oder gar unterhalb der Nachweisgrenze. Dies ist in hohem Maße von dem verwendeten Nachweisverfahren für TSH abhängig (56, 57). Manchmal wurden zu diesem Zeitpunkt die Schilddrüsenhormone und das TSH nach einer Stimulation mit TRH bestimmt. Bei Gesunden wäre nach TRH-Gabe ein Anstieg des TSH zu erwarten. Dieser Anstieg ist bei Patienten mit *TSHB* Mutationen jedoch in der Regel sehr gering ausgeprägt beziehungsweise bleibt ganz aus.

Während alle Mutationen im *TSHB* Gen prinzipiell zu den Symptomen einer schweren Hypothyreose führen können, fiel in der klinischen Beobachtung auf, dass besonders diejenigen Kinder, die die Mutation **C105Vfs114X** aufweisen, sehr früh Symptome einer Hypothyreose aufweisen und auch eine eingeschränkte mentale Entwicklung haben können. Die Neugeborenen und jungen Säuglinge zeigen oft eine so ausgeprägte Hypothyreose, wie sie bei Kindern mit einer Schilddrüsenaplasie zu beobachten ist (58, 59) und haben ebenso stark erniedrigte T4 und T3 Serumspiegel.

Ein ähnlich ausgeprägter Phänotyp und schwerwiegende neurokognitive Defizite wurden ansonsten nur für die Mutation Q49X im *TSHB* berichtet (37). Eine sehr frühe Substitution mit T4 führt in der Regel zur Besserung der Symptome und konnte - wenn frühzeitig eingesetzt – auch bei den Patienten mit **C105Vfs114X** Mutation ebenso wie bei Patienten mit Schilddrüsenaplasie gravierende Langzeitschäden verhindern.

1.6 Molekulare Grundlagen

Für die Mutation **C105Vfs114X** gibt es zwei unterschiedliche Bezeichnungen: C105Vfs114X und C125Vfs*10 – je nachdem ob das Signalpeptid mit einbezogen wird oder nicht (60). Das Signalpeptid umfasst 20 Aminosäuren, deren Abfolge den Bestimmungsort und den Transportweg des Proteins bestimmt (61). Um Einheitlichkeit mit unseren Publikationen zu wahren, wurde in dieser Arbeit durchgehend die Bezeichnung ohne Signalpeptid verwendet. Es gibt jedoch einige Publikationen, die das Signalpeptid miteinbeziehen und bei denen sich daher die Bezeichnung für die Mutation, die Bindungsstellen für Glykosylierungen und die Disulfidbrückenbindungen entsprechend um 20 Aminosäuren unterscheiden.

1.6.1 Molekularbiologische Beschreibung der C105V114X Mutation

Molekularbiologisch liegt der Mutation **C105Vfs114X** eine *Single-Nucleotide Deletion* im *TSHB* zugrunde. Betroffen ist das Nukleotid 313 der kodierenden Sequenz in Exon 3, welches die Base Thymin (T) enthält. Diese T-Deletion führt zu einem Frameshift und somit auch zu einem verfrühten Stopp (Stoppcodon TAG) an Position 114 (Abbildung 1.3) (2, 21). Die Wildtyp-Sequenz (WT) weist hingegen 5 Aminosäuren mehr auf und endet somit an Position 119 mit dem Stoppcodon TAA (60).

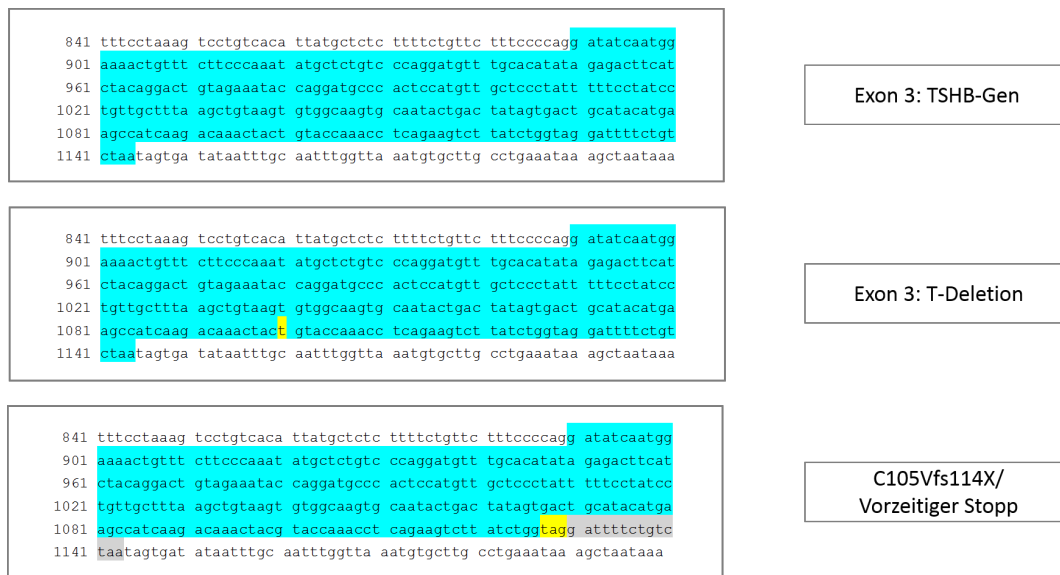


Abbildung 1.3: Übersicht der T-Deletion in Exon 3 des TSH. Oben: Exon 3 des *TSHB* Gens (türkis). Mitte: Der Mutation liegt eine T-Deletion (gelb) an Codon 105 zugrunde. Unten: Die Deletion führt zu einem Frameshift und einem verfrühten Stopp (gelb). Grau hinterlegt sind die fehlenden Nukleotide im Vergleich zum WT. **TSH**: Thyroidea-Stimulierendes Hormon; **TSHB**: β -Untereinheit des TSH; **T**: Thymin. **WT**: Wildtyp.

Auf Aminosäureebene wird die Aminosäure Cystein (Cys) an Position 105 bei der Mutante durch Valin ersetzt. Die acht darauffolgenden Aminosäuren unterscheiden sich ebenfalls alle von denen des WT (Abbildung 1.4) (60).

WT-hTSHB	
MTALFLMSML FGLACGQAMS FCIPT EYTMH IERRECA YCL	40
TINTTICAGY CMTRDINGKL FLPKYALSQD VCTYRDFIYR	80
TVEIPGCPLH VAPYFSYPVA LSCKCGKCNT DYSDCIHEAI	90
KTNYCTKPQK SYLVGFSV •	138
Patienten Mutation C105Vfs114X	
MTALFLMSML FGLACGQAMS FCIPT EYTMH IERRECA YCL	40
TINTTICAGY CMTRDINGKL FLPKYALSQD VCTYRDFIYR	80
TVEIPGCPLH VAPYFSYPVA LSCKCGKCNT DYSDCIHEAI	90
KTNYV PNLRS LIW •	138

Abbildung 1.4: Vergleich der Aminosäuresequenz von TSHB-WT und der **C105Vfs114X** Mutante. Hervorgehoben ist der Austausch von Cystein zu Valin (rot). Die dadurch veränderte Aminosäuresequenz ist in grün dargestellt. Sichtbar sind außerdem der vorzeitige Stopp (schwarzer Punkt) und der dadurch bedingte Verlust von 5 Aminosäuren im Gegensatz zum WT. **TSH**: Thyroidea-stimulierendes Hormon; **WT**: Wildtyp.

1.7 Grenzen des Neugeborenen Screenings

Die TSH Bestimmung - auch im Neugeborenen Screening - beruht auf immunologischen Bestimmungsmethoden. Hierbei ist die Höhe der nachweisbaren Konzentrationen abhängig von den verwendeten Antikörpern. So bedeutet eine geringe Immunoreaktivität noch keinen TSH-Mangel und ebenso eine nachweisbare Immunoreaktivität, auch im Normbereich, keine normale Bioaktivität (56, 57). Das Neugeborenen Screening basiert wie oben beschrieben in den meisten Ländern auf einer TSH Bestimmung, so dass Neugeborene mit einer zentralen Hypothyreose, die durch einen Mangel an biologisch aktivem TSH, aber normaler Immunoreaktivität bedingt ist, nicht auffallen. Auch ist das Profil der Spezifität der benutzten Immunoassays auf die erhöhten Spiegel der primären Hypothyreose ausgerichtet, so dass die Präzision der Assays im unteren Messbereich schlecht ist (62, 63). Somit wird ein betroffenes Kind in der Regel erst erkannt und substituiert, wenn es eine ausgeprägte klinische Hypothyreose zeigt. Hinzu kommt, dass eine frühe Diagnose aufgrund der Seltenheit der Erkrankung erschwert ist, da die klinische Symptomatik der angeborenen Hypothyreose durch das bereits seit den 70er Jahren eingeführte Screening nicht mehr zur Ausprägung kommt und daher den meisten Kinderärzten nicht mehr geläufig ist.

Um diesen Problemen entgegenzuwirken, wäre eine zusätzliche Messung von T4 sinnvoll. In den Niederlanden und der kanadischen Provinz Québec wird dies bereits seit vielen Jahren durchgeführt (11, 12, 64). In vielen anderen Ländern inklusive Deutschland, wurde das Screening mit einer Kombination aus TSH und T4 bisher aufgrund der weiter oben genannten Gründe als nicht sinnvoll befunden. Die Einführung der zusätzlichen Bestimmung der Schilddrüsenhormone ist aber immer wieder Gegenstand von Diskussionen, unter anderem der *European Society for Pediatric Endocrinology* (ESPE). Diese veröffentlichte 2014 neue übereinstimmende Richtlinien für das Screening, die Diagnose und die Handhabung der kongenitalen Hypothyreose (65). Das Konsortium listet auch Argumente für eine flächendeckende Einführung des Screenings zur Früherkennung der zentralen Hypothyreose durch die simultane Bestimmung von TSH und T4 im Neugeborenen Screening in Europa auf: Die zentrale Hypothyreose komme häufiger als bisher angenommen vor, die Inzidenz sei vergleichbar mit der der Phenylketonurie. Des Weiteren gäbe es etablierte Tests, die zugänglich und wirtschaftlich sind, ebenso wie eine verfügbare und effektive

Therapie. Wesentlicher Benefit eines kombinierten TSH/T4 Screenings wäre die Vermeidung folgeschwerer Schäden in einzelnen Fällen bei einer verspäteten Diagnose, die durch ein solches Screening vollständig verhindert werden könnten (65, 66).

1.7.1 Struktur motive der Glycoprotein hormone

Alle Glycoprotein hormone gehören zu der *cystine knot growth factor superfamily*. Dieser sogenannte *cystine knot* ist ein Strukturmotiv in Proteinen, das sich insbesondere durch drei Disulfidbrückenbindungen auszeichnet (67, 68). Disulfidbrücken bilden sich prinzipiell zwischen zwei Cysteinresten aus und tragen wesentlich zur Proteinfaltung, Stabilität und Funktion der Glycoprotein hormone bei (67). Beim TSH sind zwei der drei Disulfidbrückenbindungen (Cys19-Cys105 und Cys88-Cys95) des *cystine knots* beispielsweise an der Ausbildung des sogenannten „seat-belts“ beteiligt (2). Vergleichbar mit einem Gurt wickelt sich dabei ein Segment der β -Untereinheit des TSH um die α -Untereinheit und führt dann über die Disulfidbrückenbindung (Cys19-Cys105) wieder zurück an die β -Untereinheit (69). Dadurch wird die α -Untereinheit in Position gehalten und die Stabilität der Heterodimere maßgeblich gewährleistet (29).

1.7.2 Molekularbiologische Auswirkungen der C105Vfs114X Mutation

Ziel der experimentellen Arbeit im Rahmen dieser Dissertation war es, eine Erklärung auf molekularer Ebene für die Schwere der Hypothyreose, die bei dieser Mutation resultiert, zu finden. Hierbei wurden zwei Hypothesen formuliert (2): Ursache der fehlenden TSH Wirkung ist:

1. der verkürzte C-Terminus

2. die veränderte Aminosäuresequenz

Beide Hypothesen könnten letztlich zu einem spezifischen Pathomechanismus führen, der eine Instabilität der Heterodimere und/oder eine gestörte Interaktion des TSH- und des Thyreotropin Rezeptors (TSHR) verursacht. In Bezug auf die Signalisierung am TSHR wäre dabei ein invers-agonistischer Effekt des veränderten TSH auf den TSHR denkbar. Unter einem invers-agonistischen Effekt versteht man, dass ein Ligand spontan an einen Rezeptor bindet, der eine Basalaktivität aufweist und diese durch seine Bindung heruntersetzt.

1.7.2.1 Auswirkungen eines verkürzten C-Terminus

Mehrere Studien spekulierten zur Funktion des C-Terminus, dass der Verlust der 5 Aminosäuren bei der Mutante einen Einfluss auf die Stabilität des Heterodimers haben könnte (40, 50, 51). Da die Aminosäure Cystein an Position 105 bei der Mutation durch die Aminosäure Valin ersetzt wurde, kann sich die Disulfidbrückenbindung Cys19-Cys105 nicht mehr ausbilden. Somit wird der „seat-belt“ verändert, wodurch die Stabilität des Heterodimers deutlich eingeschränkt ist. Dies könnte dann wiederum zu einem funktionellen isolierten TSH-Mangel führen (2, 40, 50, 51). Die ersten Experimente zu Mutationen in der β -Untereinheit des TSH wurden 1996 von Medeiros-Neto et al. durchgeführt (21). Die Arbeitsgruppe generierte zwei unterschiedliche *TSHB* Mutationen mit jeweils einem verkürzten C-Terminus. Sie bestimmten die biologische und immunologische Aktivität dieser Mutanten und vergleichen diese mit der Patientemutante sowie dem WT. Aus den Ergebnissen schlossen sie, dass der verkürzte C-Terminus nicht für den funktionellen TSH-Mangel verantwortlich sein könnte (21). Diese Experimente wurden allerdings vor über 20 Jahren durchgeführt und weisen qualitativ einige Mängel auf (vgl 5.7). Zudem haben weder Medeiros-Neto et al. noch andere Gruppen Untersuchungen zur Struktur, zur Heterodimerisierung oder zur Stabilität der Heterodimere durchgeführt. Ebenso wurden N-Glykosylierungen nicht beachtet, welche eine wichtige posttranslationale Modifikation darstellen und für die Struktur, Stabilität und Funktion ebenfalls eine große Rolle spielen können (70, 71). Ebenso wenig wurden bisher Bindungsstudien der **C105Vfs114X** Mutante beziehungsweise anderer Varianten am TSHR durchgeführt, um Aussagen zur Affinität zum Rezeptor machen zu können. Denn auch eine veränderte Signalisierung oder eine veränderte Spezifität/Affinität zum Rezeptor wären nicht zuletzt wegen Nähe zum „seat-belt“ denkbar (2). Besonders interessant ist, in Bezug auf den verkürzten C-Terminus der Mutante, auch der Vergleich mit Thyrostimulin (2, 60). Thyrostimulin ist ein ancestrales Glycoproteinormon, das ebenfalls als endogener TSHR Agonist fungiert. Es jedoch ein spezifischer Agonist und stimuliert ausschließlich den TSHR (72). Es besteht aus der *Glycoprotein Hormone α 2-Untereinheit (GPA2)*, die nicht der α -Untereinheit der anderen Glycoproteinormone entspricht und der *Glycoprotein β 5-Untereinheit (GPB5)* die am C-Terminus 20 Aminosäuren weniger aufweist als die β -Untereinheit des TSH (73, 74). Dennoch konnten Okajima et al. 2008 zeigen, dass Thyrostimulin ungefähr viermal aktiver am TSHR wirkt als bovines TSH, welches

wiederum aktiver ist, als humanes TSH (75). Die Fähigkeit Heterodimere zu bilden, ist jedoch beim Thyrostimulin im Vergleich zum TSH eingeschränkt. Grund dafür ist wahrscheinlich der fehlende „seat-belt“. Für die Ausbildung ist die Disulfidbrückenbindung Cys19-Cys105 essentiell, welche beim Thyrostimulin nicht vorhanden ist. Nichtsdestotrotz lassen sich Heterodimerisierungen beobachten, sodass davon ausgegangen werden kann, dass nicht allein der „seat-belt“ dafür verantwortlich ist (2).

Sowohl die Untersuchungen von Medeiros-Neto mit den verkürzten Mutanten, als auch die Tatsache, dass Thyrostimulin wesentlich aktiver am TSHR agiert als TSH, lassen vermuten, dass die fehlenden 5 Aminosäuren in der **C105Vfs114X** Mutante nicht maßgeblich verantwortlich für den Phänotyp sind. Dennoch haben wir eine erneute Untersuchung mit den heute verfügbaren Methoden für sinnvoll erachtet, um dies als Ursache ausschließen zu können.

1.7.2.2 Auswirkungen einer veränderten Aminosäuresequenz

Die zweite Möglichkeit, die es zu untersuchen galt, ist die veränderte Aminosäuresequenz des C-Terminus. Auch hier wäre es denkbar, dass sie einen negativen Effekt auf die Ausbildung des Heterodimers oder die TSH/TSHR Interaktion hat (Abbildung 1.5) (2). Bisher gibt es keine Untersuchungen zu den 8 vom WT abweichenden Aminosäuren, die dem durch Valin ersetzten Cystein an Position 105 folgen. Medeiros-Neto et al. haben 1996 die Mutante C105V und die Frameshift Deletion untersucht. Ihre Daten deuten darauf hin, dass das mutierte Protein eine wesentlich geringere Bioaktivität als der WT aufweist (21).

In den folgenden Jahren wurden dann die Disulfidbrückenbindungen beziehungsweise Auswirkungen fehlerhafter Disulfidbrückenbindungen anhand des CG intensiver untersucht (2, 76, 77). Das CG besitzt 6 Disulfidbrücken, die wiederum die Konformation der β -Untereinheit des CG beeinflussen. Die einzelnen Disulfidbrücken sind charakteristisch an verschiedenen Zwischenschritten des Faltungsprozesses des Proteins beteiligt. Die Disulfidbrücke Cys26-Cys110 im CG entspricht im TSH der Disulfidbrücke Cys19-Cys105. Es konnte gezeigt werden, dass eine gezielte Veränderung dieser beiden Cysteinreste beim CG (in diesem Fall durch deren Austausch durch Alanin) die Faltung des Glycoprotein hormons vom intermediären in den finalen Zustand beeinträchtigt (2, 77).

Obwohl diese Disulfidbrückenbindungen im CG untersucht wurden und Unterschiede zwischen den einzelnen Glycoprotein-hormonen denkbar sind, könnten gestörte Disulfidbrückenbindungen durchaus auch eine wichtige Rolle beim Pathomechanismus der vorliegenden Mutante spielen.

Vergleicht man das TSH mit dem Thyrostimulin nun in Bezug auf die Disulfidbrückenbindungen, könnte diese Annahme gestützt werden. Bei der Mutation wird das Cystein an Position 105 durch Valin ersetzt, das Cystein an Position 19 bleibt jedoch erhalten und hat folglich keinen Interaktionspartner mehr, mit dem es eine Disulfidbrückenbindung ausbilden könnte. Auch Thyrostimulin bildet keine Disulfidbrücke aus, da es an Position 19 einen Glycinrest aufweist und vor Position 105 endet. Thyrostimulin hat allerdings eine hohe Bindungsaffinität an den Rezeptor, ebenso wie eine hohe Fähigkeit zur Signalisierung (2, 72). Somit könnte man daraus schließen, dass die Disulfidbrücke nicht notwendig für die Rezeptorbindung oder –aktivierung ist. Vielmehr könnte das einzelne Cystein an Position 19 bei der Mutante das Problem darstellen (2).

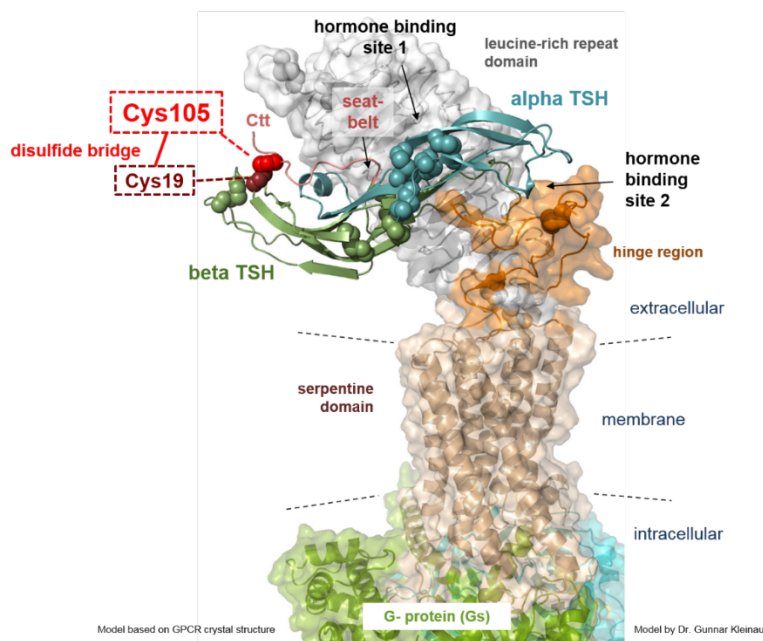


Abbildung 1.5: Die Abbildung zeigt das TSH-Protein, gebunden an den TSHR/G-Protein Komplex. Bei der Mutation **C105Vfs114X** wird durch den Austausch von Cystein durch Valin an Position 105 die Disulfidbrückenbindung unterbrochen. Dadurch wäre es möglich, dass das Cystein 19 eine neue falsch-positive Disulfidbrückenbindung ausbildet oder der freie Cysteinrest die Proteinfaltung inhibiert. Auch der Verlust der Disulfidbrückenbindung an sich könnte zu einer Konformationsänderung des Proteins führen und somit ursächlich für den schweren Phänotyp sein (2). **TSH**: Thyroidea-stimulierendes Hormon; **TSHR**: Thyreotropin-Rezeptor **Cys**: Cystein. Das Modell wurde freundlicherweise von Dr. Gunnar Kleinau bereitgestellt.

Es wäre möglich, dass es mit einem anderen Cystein eine Interaktion eingeht und somit eine falsch-positive Brückenbindung ausbildet (Abbildung 1.5) (2). Das wiederum könnte dann, vergleichbar mit dem CG die Proteinfaltung und letztlich die Konformation des Proteins so verändern, dass die Interaktion mit dem TSHR negativ beeinflusst wird (77) . Ebenso denkbar wäre, dass dieser freie Cysteinrest, der nicht „gebunden“ ist, Störungen bei der Proteinfaltung verursacht (2).

1.7.3 Vergleich mit Mutationen in anderen Glycoprotein-hormonen

Da bis auf die Arbeit von Medeiros-Neto et al. 1996 keine funktionellen Charakterisierungen der Mutante **C105Vfs114X** oder anderer Mutanten im *TSHB* durchgeführt wurden, könnte ein Vergleich mit Mutationen in anderen Glycoprotein-hormonen für die Erklärung der Pathogenese sinnvoll sein. Damit könnten Erkenntnisse über zugrundeliegende, überlappende Mechanismen gewonnen werden. Natürlich vorkommende Mutationen in der β -Untereinheit der Gonadotropine sind sehr selten, auch dadurch bedingt, dass Betroffene häufig infertil sind. Während Mutationen sowohl bei Männern, als auch bei Frauen beschrieben wurden, unterscheiden diese sich stark in ihrem Phänotyp (78, 79). Bei männlichen Patienten ist die sexuelle Differenzierung normal, der Beginn der Pubertät jedoch verzögert und die Spermatogenese eingeschränkt. Weibliche Patientinnen sind hingegen infertil, während der Beginn der Pubertät sich jedoch in der Regel nicht von gesunden Patientinnen unterscheidet (2).

1.7.3.1 Mutationen im luteinisierenden Hormon

Das LH gehört zu den Gonadotropinen, also den Sexualhormonen, die die Keimdrüsen stimulieren. Es wird ebenso wie TSH in der Adenohypophyse gebildet und stimuliert beim Mann die Leydig-Zellen, parakrine Zellen des Hodens, die dann wiederum die Androgensynthese anregen. Bei der Frau wirkt LH auf die Theca-Zellen des Ovars, die ebenfalls die Androgensynthese stimulieren. Zusätzlich stimulieren sie die Ovulation und sind an der Bildung des Corpus luteum beteiligt.

Weiss et al. untersuchten 1992 eine Mutation mit einem Austausch der Aminosäure Glutamin durch Arginin an Position 54 in der β -Untereinheit des LH (*LHB*), die zum Hypogonadismus führt (80). Sie konnten zeigen, dass die mutierte β -Untereinheit zwar mit der α -Untereinheit dimerisiert, dieses veränderte Heterodimer dann aber nicht mehr an den LH-Rezeptor binden kann (2, 80).

Die Gruppe um Basciani beschrieb 2012 eine compound heterozygote Mutation in der β -Untereinheit des LH, die zum hypogonadotropen Hypogonadismus führt (81). Der zugrundeliegende Mechanismus scheint sich bei dieser Mutation jedoch von der vorherigen zu unterscheiden. Hier wurde angenommen, dass die Mutation entweder die Heterodimerisierung einschränkt oder es aufgrund einer Fehlfaltung des Proteins zu einer völlig veränderten Struktur kommt (2, 81).

1.7.3.2 Mutationen im Follikel-stimulierenden-Hormon

Das FSH gehört ebenfalls zu den Gonadotropinen und wird im Hypophysenvorderlappen gebildet. Beim Mann wirkt es an den Sertoli-Zellen im Hoden, unterstützt die Spermatogenese und reguliert Inhibin. Das Gleiche gilt für das Anti-Müller-Hormon sowie das Androgen-bindende Protein. Bei der Frau hingegen wirkt es an den Granulosazellen des Ovars, stimuliert dort die Follikelreifung und die Östrogensynthese. Ein Mangel an FSH führt in der Regel zu einem verspäteten Einsatz der Pubertät und Infertilität. 1993 wurde eine Frameshift Mutation in der β -Untereinheit des FSH (*FSHB*) beschrieben. Die betroffene Patientin litt unter einer Amenorrhoe und Infertilität (2, 82). Wie die Mutation **C105Vfs114X** führt auch diese zu einem verkürzten C-Terminus und einer veränderten Aminosäuresequenz nach der Mutation. Aufgrund früherer Untersuchungen zu Gonadotropinen schlossen die Autoren, dass wahrscheinlich eine gestörte Dimerisierung der beiden Untereinheiten ursächlich sei. Experimente dazu wurden jedoch nicht durchgeführt. Layman et al. beschrieben 1997 eine weitere Mutation (Cys54Gly) im *FSHB* Gen, für deren Entstehung ebenfalls eine gestörte Dimerisierung verantwortlich gemacht wurde (83). Auch bei einem männlichen Patienten konnte eine Mutation im *FSHB* nachgewiesen werden. Phänotypisch zeigte er eine normale Pubertät und Virilisierung bei gleichzeitiger Unterentwicklung der Hoden und einer Azoospermie (84). Auch bei dieser Mutation lag ein Austausch eines Cysteins vor. In dem Fall wurde es durch Arginin ersetzt. Erneut befürworteten die Autoren die Hypothese, dass diese Mutation Probleme bei der Heterodimerisierung bereitet beziehungsweise die Konformation des Proteins beeinflusst (2, 84).

1.7.4 Erkenntnisse zu den Auswirkungen der TSH/TSHR-Interaktion

Der TSH Rezeptor gehört zu der Gruppe A der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und besteht aus 7 Transmembran-Domänen sowie aus extrazellulären

Abschnitten, die sich je nach G-Protein und dazugehörigem Liganden unterscheiden können (85, 86). Die *leucine-rich repeat domain* (LLRD) und die *hinge region* (HR) befinden sich extrazellulär und sind essentiell für die spezifische Ligandenbindung (Abbildung 1.5). Verbunden sind die beiden C-Termini dieser Regionen durch zwei Disulfidbrücken, welche wiederum obligat für die Rezeptor-Funktion sind. Der TSHR ist konstitutiv aktiv, das heißt eine Basalaktivität ist auch ohne Ligandenbindung zu beobachten (87). Bindet nun das TSH an einer der beiden Bindungsstellen, führt das zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und die HR und LLRD konvergieren (2, 85, 86). Zudem wird eine sogenannte intramolekulare agonistische Einheit beziehungsweise ein sogenannte internaler Agonist in der Nähe der Transmembran Domäne 1 aktiviert (2, 88). Dieses Signal wird dann über die Transmembrandomänen bis an die Intrazellulärdomäne weitergeleitet. Der Rezeptor nimmt somit seine „aktive“ Konformation ein (2, 89).

Das G-Protein, das an den Rezeptor gekoppelt ist, ist wiederum ein heterotrimeres Protein mit den drei Untereinheiten: α , β , γ . Die α -Untereinheit bindet im inaktiven Zustand Guanosindiphosphat (GDP), im aktiven Zustand Guanosintri-phosphat GTP und besitzt gleichzeitig eine GTPase Aktivität, kann also GTP zu GDP und Phosphat hydrolysieren und damit ihre eigene Aktivität beenden. Die β - und γ - Untereinheiten liegen hingegen als Komplex vor: die γ -Untereinheit ist mit der β -Untereinheit über einen Lipidanker an der Zellmembran befestigt (90). Durch die Konformationsänderung des Rezeptors kommt es zum Austausch von GDP gegen GTP in der α -Untereinheit. Das schränkt dann die Affinität der α -Untereinheit zum β/γ -Komplex ein und diese dissoziieren (91). Je nachdem welches G-Protein an den Rezeptor gekoppelt ist, werden weitere Signalwege initiiert. Für den TSH Rezeptor ist bekannt, dass er sowohl die Unterformen Gs, als auch Gq/G11 aktivieren kann, die dann wiederum über cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) beziehungsweise die Phospholipase C (PLC) und folgende Signalkaskaden wirken (92-94). Dass der Gq/G11 Signalweg vor allem auch eine wichtige Rolle beim Schilddrüsenwachstum und der Schilddrüsenhormonsynthese spielt, konnte 2007 gezeigt werden (93). Dies ist ein hochkomplexes Zusammenspiel, sodass kleine Veränderungen des Liganden, des Rezeptors oder auch weiterer Effektoren große Auswirkungen haben könnten. Beispiele dafür sind Mutationen im TSHR, welche zu einer erhöhten oder auch

verminderten Aktivität des Rezeptors führen und schwerwiegende Auswirkungen auf Betroffene im Sinne einer Hypo- beziehungsweise Hyperthyreose haben können (95). Auch TSH-Antikörper modifizieren die Bindung an den TSHR und die Signalinduktion. Inaktivierende Antikörper blockieren entweder die Bindungsstelle für TSH oder binden an den Rezeptor und halten ihn in einer bestimmten Konformation, sodass keine Signalisierung induziert werden kann. Dadurch kann auch die konstitutive Aktivität des Rezeptors im Sinne eines invers-agonistischen Effekts supprimiert (2, 96, 97) werden. Solch ein Effekt wäre auch bei Bindung des durch die Mutation veränderten TSH der Patienten denkbar. Das modifizierte TSH könnte als inverser Agonist wirken und die Basalaktivität des Rezeptors unterdrücken, was dann wiederum den schweren Phänotyp erklären könnte.

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Angeborene zentrale Hypothyreosen sind sehr seltene Erkrankungen. Entgegen der lang herrschenden Meinung, dass isolierte zentrale Hypothyreosen nicht zu einer schweren mentalen Retardierung der betroffenen Patienten führen, zeigen neuere Daten, dass auch ein isolierter TSH Mangel schwerwiegende Auswirkungen auf die mentale und psychomotorische Entwicklung haben kann. Ein Beispiel für eine Mutation, die unbehandelt zu einer schweren kongenitalen Hypothyreose führt, ist die Mutation **C105Vfs114X** im *TSHB* Gen. Patienten, die diese Mutation tragen, zeigen einen besonders schweren Phänotyp mit häufig irreversiblen motorischen und kognitiven Einschränkungen. Seit etwa 20 Jahren wird in der Literatur von Patienten mit dieser Mutation berichtet. Der Pathomechanismus, der für diesen ausgeprägten Phänotyp verantwortlich ist, ist jedoch immer noch nicht geklärt. 1996 wurde eine Hypothese der Arbeitsgruppe um Medeiros-Neto publiziert, die angewendeten Methoden lieferten jedoch keinen eindeutigen Hinweis auf molekularer Ebene.

Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe von neueren Methoden diese Mutation genauer als bisher möglich zu untersuchen und die molekulare Ursache, wie beispielsweise einen invers-agonistischen Effekt des mutierten TSH, die für den schweren Phänotyp verantwortlich ist, nachzuweisen. Zunächst sollte analysiert werden, ob der verkürzte C-Terminus oder die veränderte Aminosäuresequenz ursächlich für das veränderte TSH und dessen Auswirkungen auf molekularer Ebene sind. Durch ortsgerichtete Mutagenese sollten Konstrukte generiert werden, mit denen diese Frage geklärt

werden kann. Besonderes Augenmerk lag bei der Konstruktion dieser Mutanten auf den Disulfidbrückenbindungen, welche bei Glycoproteinhormonen generell eine wichtige Rolle für die Struktur und Funktion spielen. Dies wurde in Bezug auf die Mutation **C105Vfs114X** bisher noch nicht untersucht. Da eine der Disulfidbrückenbindung bei der Patientenmutation am C-Terminus lokalisiert ist, wurden die anderen hergestellten Mutationen basierend auf dem Modell von Dr. Gunnar Kleinau (Abbildung 1.5) und mit Fokus auf den verkürzten C-Terminus, den veränderten C-Terminus und die Disulfidbrückenbindung C19-C105 generiert (2, 60). Die Herstellung der Konstrukte erfolgte durch unseren Koperationspartner (AG um Dr. Adolfo Rivero-Müller) und ist im Methodenteil ausführlich beschrieben.

Im Weiteren sollte untersucht werden, ob durch Transfektion dieser Mutationen *in vitro* das veränderte Protein herstellbar ist. Die so generierten mutierten Proteine sollten dann funktionell charakterisiert werden. Dabei wurde vor allem die Signaltransduktion am TSHR über den Gs, Gq/11 und Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)-Signalweg untersucht. Die Mutanten sind so konstruiert, dass ihre funktionelle Charakterisierung Aufschluss darüber geben soll, ob der verkürzte C-Terminus, die veränderte Aminosäuresequenz an sich oder das freie Cystein an Position 19 für die gestörte Funktion verantwortlich ist oder als Ursache für den schwer ausgeprägten Phänotyp ausgeschlossen werden kann.

2 Materialien und Geräte

2.1 Materialien

2.1.1 Zellreihen

Tabelle 2.1: Verwendete Zellreihen

Bezeichnung	Art der Zellreihe	Herkunft	Verwendung
CHO Zellen	<i>Chinese Hamster Ovary</i> - Zellen	American Type Culture Collection (ATCC)	Produktion von TSH (Transfektion)
HEK293 Zellen	<i>Human Embryonic Kidney</i> - Zellen	ATCC	Produktion von TSH (Transfektion) Funktionelle Charakterisierung von TSH (cAMP-Assay, Reporterassays)
FTC-133 + TSHR Zellen	<i>Follicular Thyroid Cancer</i> – Zellen, die einem humanen Primärtumor entstammen und mit dem TSHR stabil transfiziert wurden	Peter Goretzki (98) Stabile Transfektion IEPE (Charité)	Funktionelle Charakterisierung von TSH (cAMP-Assay) IP1-ELISA
FTC-238 Zellen	<i>Follicular Thyroid Cancer</i> – Zellen, die humanen Lungenmetastasen entstammen	Peter Goretzki (98)	Funktionelle Charakterisierung von TSH (cAMP-Assay)
Sf-9 Zellen	Insekten-Zelllinie aus Ovar-Zellen von <i>Spodoptera frugiperda</i>	ATCC	Produktion von TSH im Insektenzellsystem (Transfektion)
Tn-5 Zellen	Insekten-Zelllinie aus Ovar-Zellen von <i>Trichopulsia-ni</i>	ATCC	Produktion von TSH im Insektenzellsystem (Infektion)

Fortsetzung Tabelle 2.1: Verwendete Zellreihen

Bezeichnung	Art der Zellreihe	Herkunft	Verwendung
E. coli DH5α	Chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Stamm zur Klonierung von Plasmiden	ThermoFisher Scientific	Produktion von TSH im Säugerzellsystem und Insektenzellsystem (Transformation)
E. coli DH10Bac	Chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Stamm zur Produktion von rekombinanten Bacmiden	ThermoFisher Scientific	Produktion von TSH im Insektenzellsystem (Transformation)

2.1.2 Antibiotika und Antimykotika

Tabelle 2.2: Verwendete Antibiotika und Antimykotika

Bezeichnung	Hersteller
Ampicillin	Sigma Aldrich
Amphotericin B	Sigma Aldrich
Hygromycin	Thermo Scientific
Kanamycin	Sigma Aldrich
Penicillin	Biochrom AG
Puromycin	Sigma Aldrich
Streptomycin	Biochrom AG

2.1.3 Medien und Zusätze in der Zellkultur

Tabelle 2.3: Verwendete Medien und Zusätze in der Zellkultur

Material	Hersteller
Advanced MEM	Gibco
Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)	Biochrom AG
Charcoal stripped fetales Kälberserum (cFKS)	Sigma Aldrich
Express Five SFM (1x) (serumfreies Medium)	Gibco
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG

Fortsetzung Tabelle 2.3: Verwendete Medien und Zusätze in der Zellkultur

Material	Hersteller
Ham's F12-Medium	Biochrom AG
Insect X-Press (mit L-Glutamin)	Lonza
Iscove Basal Medium	Biochrom AG
Nicht-essentielle Aminosäuren	Biochrom AG
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS Dulbecco)	Biochrom AG
Trypsin Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Biochrom AG

2.1.4 Weitere Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 2.4: Verwendete Reagenzien und Chemikalien

Name	Hersteller
3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX)	Sigma Aldrich
Agarose	Carl Roth
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma-Aldrich
Bovines Serumalbumin (BSA)	New Enlands Biolabs
Bromphenolblau	Lonza
Bluo-gal	Thermo Fisher
Clarity™ Western ECL Blotting Substrates	Bio Rad
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich
Entwickler	Kodak
Ethanol 98,9% und 70%	Carl Roth GmbH
Ethidiumbromid	Roche Diagnostics
FuGene-6	Promega
Glycerol	Eurofins MWG Operon
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Thermo Fisher
Kanamycin	Biochrom AG

Fortsetzung Tabelle 2.4: Verwendete Reagenzien und Chemikalien

Name	Hersteller
Metafectene®	Biontex
Methanol	J.T. Baker
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH
Polysorbat (Tween 20®)	Sigma-Aldrich
TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE Buffer)	Eppendorf
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Thermo Scientific
Tetracyclin	Biochrom AG
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth GmbH
Xylencyanol	Lonza

2.1.5 Verwendete Reagenziensysteme

Tabelle 2.5: Verwendete Reagenziensysteme

Kit	Hersteller
Alpha Screen® cAMP Detection Kit	PerkinElmer
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
CellTiter 96® Aqueous Solution Cell Proliferation Assay (MTS)	Promega
IP-One Gq ELISA Kit	Cisbio
Kapa Hifi PCR Kit	Kapa Biosystems
Luciferase Assay System	Promega
Mini Prep "Fast Plasmid Mini" Kit	Eppendorf
Pure Yield™ Plasmid Maxiprep System	Eppendorf
Pure Link™ HiPure Plasmid Miniprep Kit	Life Technologies
Pure Link™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit	Life Technologies
QIA Quick Gel Extraction Kit	QIAGEN
QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit	Agilent
TSH (Human) ELISA Kit	Abnova

2.1.6 Antikörper und Größenmarker

Tabelle 2.6: Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Klonalität	Epitop
Anti-Human-CGA (n-terminal region)	Aviva Systems Biology	Polyclonal	Rabbit
Anti-Human GPHB5	MyBioSource	Polyclonal	Sheep
Anti-Human-Thyroid Stimulating Hormone	Dako	Monoclonal	Mouse
Anti-Human TSH-alpha	Biomol	Polyclonal	Rabbit
Anti-sheep IgG	Dako	Polyclonal	Rabbit
Goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology	Polyclonal	Goat
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Dako	Polyclonal	Goat

Tabelle 2.7: Verwendete Größenmarker

Bezeichnung	Hersteller
Page Ruler	Thermo Scientific
Gene Ruler	Thermo Scientific

2.1.7 Hormone und Enzyme

Tabelle 2.8: Verwendete Hormone und Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Pfu-Turbo Polymerase	Agilent
Restriktionsendonuklease <i>DpnI</i>	New England Biolabs
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs
Trypsin/EDTA-Lösung	New England Biolabs
TSH, bovin	Sigma Aldrich

2.1.8 Medien, Puffer und Lösungen

Tabelle 2.9: Verwendete Medien zur Bakterienanzucht

Lösungen	Zusammensetzung
Lysogeny Broth (LB) -Nährmedium für Escheria coli (E.coli)	Hefeextrakt 5,0 g/l NaCl 10,0 g/l Trypton/Pepton 10,0 g/l Antibiotika 0,1 g/l in H ₂ O eingestellt auf pH 7,4
LB-Agar für E.coli	Hefeextrakt 5,0 g/l NaCl 10,0 g/l Trypton/Pepton 10,0 g /l Agar-Agar 15,0 g/l Antibiotika 0,1 g/l in H ₂ O eingestellt auf pH 7,4
SOB-Medium	Hefeextrakt 5,0 g/l NaCl 0,5 g/l Trypton/Pepton 20,0 g/l KCl 0,25 mM in H ₂ O eingestellt auf pH 7,4
SOC-Medium	MgCl ₂ 20 mM Glucose 20 mM in hitzesterilisiertem SOB-Medium

Tabelle 2.10: Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung/Hersteller
cAMP Stimulationspuffer	138 mM NaCl 6 mM KCl 1 mM MgCl ₂ *6H ₂ O 5,5 mM Glucose 20 mM Hepes 1 mM CaCl ₂ *2H ₂ O 0,1 % BSA eingestellt auf pH 7.4

Fortsetzung Tabelle 2.9: Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung/Hersteller
LO-Puffer (Lysispuffer für cAMP Assay)	0,1% BSA 0,3% Tween 20 5 nM Hepes eingestellt auf pH 7.4
LI-Puffer (für cAMP Assay)	1 mM IBMX zu LO-Puffer
Paraformaldehyd (PFA) (für Probenfixierung)	4 % PFA in PBS
PBS-T	0,05% Tween 20 in 1 x PBS
Probenpuffer (Western Blot Verfahren)	1 M Tris pH 7.5 Glycerin 20 % SDS 1 % Bromphenolblau ddH ₂ O (doppelt destilliertes Wasser) 5 M DTT
TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE)-Puffer (5x) (Agarose-Gelelektrophorese)	Borsäure 27,5 g/l EDTA (0,5 M) Tris 54 g/l in H ₂ O eingestellt auf pH 8,0
Tfbl Puffer (Herstellung chemisch kompetente Zellen)	Kaliumacetat 3,0 g/l RbCl 12,1 g/l CaCl ₂ *2H ₂ O 1,5 g/l MnCl*4H ₂ O 10,0 g/l 100% Glycerin 150ml/l in H ₂ O eingestellt auf pH 5,8
Tfbll Puffer (Herstellung chemisch kompetente Zellen)	MOPS 4,3 g/l CaCl*2H ₂ O 11,0 g/l RbCl 1,2 g/l 100% Glycerin 150 ml/l in H ₂ O eingestellt auf pH 6,5
TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TEA-Puffer) (Western Blot Verfahren)	Eppendorf

2.2 Plasmide, Sequenzen und Vektoren

Angaben zu verwendeten Primern (Tabelle 7.1) Plasmiden (Tabelle 7.2), Sequenzen (Kapitel 7.3) und eingesetzten Vektoren (Abbildung 7.1) befinden sich im Anhang.

2.3 Technische Geräte

Tabelle 2.11: Technische Geräte

Name	Hersteller
Anthos Plattenreader 2001	Anthos Mikrosystem GmbH
Brutschrank Certomat® BS-1	Heraeus Instruments GmbH
Centrifuge Galaxy Mini	VWR
Centrifuge 5810R	Eppendorf
Centrifuge 5415D	Eppendorf
Centrifuge Sorvall RC 6 Plus	Thermo Fisher
ChemiDoc MP Imaging System	Bio Rad
Deep Freezer Forma -80 ULT-Freezer	Thermo Fisher
DNA-Sequenzierer ABI PRISM 3130xl	Applied Biosystems
Gelkammern Whatman compact XS/S	Biometra
Gel documentation system GeneFlash	Syngene
Heating block Thermomixer Compact	Eppendorf
Incubator kelvitron® t	Heraeus
Laminair HBB 2448	Heraeus Instruments GmbH
LUNA™ Automated Cell Counter	Logos Biosystems
Mastercycler ep Gradient s	Eppendorf
Mikroskop Axiovert 10	Zeiss
MilliQ-system Millipore Water Purification System	Merck Millipore
Mithras LB 940 Multimode Plate Reader	Berthold Technologies
pH-meter Seven easy	Mettler Toledo
Photometer BioPhotometer	Eppendorf
PowerPac 3000 Elektrophorese	Bio Rad

Fortsetzung Tabelle 2.11: Technische Geräte

Name	Hersteller
Schüttler IKA-vibrax-VXR	Janke&Kunkel
Schüttler Vari-Shaker	Dynatech
Spectrophotometer Nano Drop 1000	Thermo Scientific
Thermocycler Mastercycler® Gradient	Eppendorf
Trans Blot SD Semi Dry Transfer Cell	Bio Rad
Varioklav Dampfsterilisator	HP Medizintechnik GmbH
Vortexer Microspin FV2400	BioSan
Vortex-Genie 2	MO BIO Laboratories
Waage Sartorius CP2201-OCE	Sartorius
Waage Sartorius CPA 223S-OCE	Sartorius

2.4 Software

Die Messungen erfolgten durch das Plattenlesegerät Berthold Mithras LB 940 und mit Hilfe der Software *Mikrowin 2000* sowie des Anthos Plate Readers 2001 und der Software *Anthos WinRead Version 2.3*. Mathematische Auswertungen der Rohdaten wurden mit Hilfe von *Microsoft Excel* durchgeführt. Messungen am Lichtmikroskop erfolgten durch die Software *Live Aquisition*. Die Bilder des konfokalen Mikroskops wurden mit Hilfe der Software *Leica Application Suite* erzeugt. Die graphische und statistische Auswertung wurde mit Hilfe von *GraphPad Prism V.6* angefertigt.

2.5 Fragebogen

Der verwendete Fragebogen, der an die Autoren geschickt wurde, befindet sich im Anhang.

3 Methoden

In dieser Arbeit sollten die molekularbiologischen Ursachen der Patientenmutation **C105Vfs114X** sowie deren Effekte untersucht werden. Dafür sollte mit Hilfe unterschiedlicher Mutationen untersucht werden, ob ein verkürzter C-Terminus oder eine veränderte Aminosäuresequenz zu einer Änderung der Tertiär-/ Quartärstruktur des Proteins führt und letztlich für den Funktionsverlust des TSH verantwortlich ist. Dafür wurden zunächst die unterschiedlichen Konstrukte generiert. Daraufhin wurden das WT-TSH und die Mutanten in verschiedenen Zellsystemen exprimiert. Das WT-TSH und das mutierte TSH wurden dann quantifiziert und letztlich funktionell charakterisiert mit besonderem Fokus auf einen möglichen invers-agonistischen Effekt. Eine Übersicht über die verwendeten Methoden ist in Abbildung 3.1 dargestellt:



Abbildung 3.1: Übersicht der verwendeten Methoden. Zunächst erfolgte die Herstellung der unterschiedlichen Konstrukte durch Klonierung mittels PCR und ortsgerichteter Mutagenese. Es folgte eine DNA-Aufarbeitung und eine Transformation in Bakterienzellen zur Vermehrung der DNA. Die hergestellte Plasmid-DNA wurde in einem weiteren Schritt aufbereitet und letztlich sequenziert. Dann folgte die Proteinexpression in zwei unterschiedlichen Säugerzellsystemen. Um größere Mengen an rekombinantem Protein zu erzielen wurde zudem versucht, die Proteinexpression in einem Insektenzellsystem neu zu etablieren. Danach folgte die Proteinquantifizierung mit unterschiedlichen Methoden, da die Quantifizierung der Mutanten zunächst Probleme bereitete. Als Letzter Schritt wurden die rekombinanten Proteine hinsichtlich unterschiedlicher Signalwege (Gs, Gq/11 und MAPK-Weg) funktionell charakterisiert.

3.1 Generierung der Konstrukte

Mit der Generierung der unterschiedlichen Konstrukte sollte die Patientenmutante **C105Vfs114X** und insbesondere ihr Einfluss auf die Signalisierung am TSHR besser verstanden werden (Abbildung 3.2). Die Mutation führt am C-Terminus zum Austausch von Cystein zu Valin, womit eine Disulfidbrückenbindung verloren geht, die bekannt dafür ist, eine wichtige Rolle bei der Formation des sogenannten „seat-belts“ zu spielen. Dieses Strukturmotiv ist wiederum wichtig für die Stabilisation des Heterodimers (2). Die Hypothese war, dass dadurch, dass das Cystein an Position 105 bei der Mutante durch ein Valin ersetzt wird, es möglich ist, dass das freie Cystein an Position 19 eine neue, falsch-positive, Brückenbindung zu einem anderen Cystein eingeht. Dies könnte dann zu einer gänzlich anderen Struktur des TSH führen. Neben der Patientenmutante **C105Vfs14X** wurden deshalb auch zusätzlich die Mutanten C19V und die Doppel-Mutation C19V/C105V generiert (60). Mit ihnen sollte getestet werden, ob sie möglicherweise zu einer Wiederherstellung der Signalaktivierung am TSHR führen. Da bei diesen beiden Mutationen das Cystein an Position 19 ebenfalls ersetzt wird, wäre es in diesem Fall nicht mehr möglich, dass sich eine neue, falsch-positive Disulfidbrückenbindung formiert. Käme es bei diesen beiden Mutanten also zu einer Wiederherstellung der Signalisierungseigenschaften des TSH am TSHR, spräche dies dafür, dass das freie Cystein an Position 19 bei der Patientenmutation C105Vfs114X tatsächlich eine neue Disulfidbrückenbindung eingeht, die ursächlich für die TSH-Modifikation wäre. Um zudem den Einfluss des verkürzten C-Terminus zu überprüfen, wurde zusätzlich die Mutation C105V generiert, die zwar ebenfalls den Austausch von Cystein zu Valin an Position 105 aufweist, jedoch nicht den verkürzten

C-Terminus beziehungsweise die auf die Mutation folgende, veränderte Aminosäuresequenz. Sollte diese Mutante zu einer Wiederherstellung der Signalaktivierung am TSHR führen, wäre eher davon auszugehen, dass der verkürzte C-Terminus beziehungsweise die veränderte Aminosäuresequenz, nicht jedoch das freie Cystein an Position 19 ursächlich wäre. Diese Annahme könnte dann durch den direkten Vergleich der Patientenmutation C015Vfs114X mit der Doppel-Mutation C19V/C105Vfs114X bestärkt werden. Käme es bei beiden Frameshift Mutationen (**C105Vfs114X** und C19V/C105Vs114X) zu einer verminderten Signalisierung des Rezeptors, wäre eher davon auszugehen, dass der verkürzte C-Terminus oder die veränderte Aminosäuresequenz ursächlich für den Phänotyp ist, nicht jedoch eine falsch-positive Disulfidbrückenbindung. Käme es bei der Doppel-Mutation C19V/C105Vfs114X hingegen nicht zu einer verminderten Signalisierung, spräche dies eher dafür, dass die Disulfidbrückenbindung ursächlich für den Phänotyp wäre.

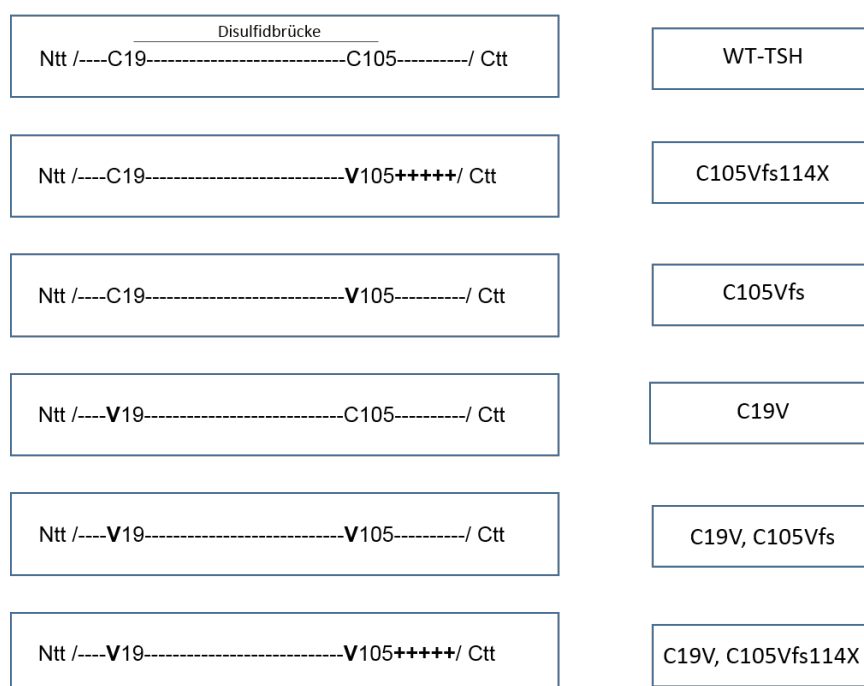


Abbildung 3.2: Abbildung der generierten Konstrukte. Es wurden der WT, die Patientenmutation **C105Vfs114X**, sowie weitere Mutationen hergestellt. Beim WT-TSH ist die intakte Disulfidbrückenbindung dargestellt, die bei den anderen Mutanten zerstört ist. Die veränderte Aminosäuresequenz ist durch das Symbol **+++++** dargestellt, der verkürzte C-Terminus durch einen früheren Stopp. **Ntt** = N-Terminus, **Ctt** = C-Terminus, **V** = Valin, **C** = Cystein.

Zudem wurden nachträglich zwei weitere Mutationen konstruiert, um auszuschließen, dass das mutierte Protein, intrazellulär degradiert, aggregiert oder sequestriert und somit nicht ins Medium sekretiert wird (Abbildung 3.3).

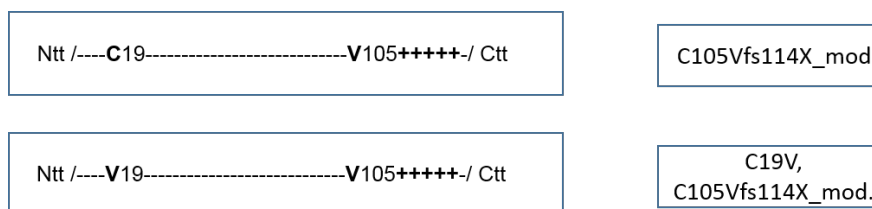


Abbildung 3.3: Abbildung der zusätzlich generierten Konstrukte. Die beiden Frameshift Mutationen wurden so verändert, dass sie am C-Terminus wie der WT mit dem mCherry fusionieren. **Ntt** = N-Terminus, **Ctt** = C-Terminus, **V** = Valin, **C** = Cystein.

Dafür wurde das Stopcodon an Position 114 so verändert, dass das *TSHB* am C-Terminus ähnlich wie beim WT mit dem mCherry fusioniert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

Die Klonierung der einzelnen Konstrukte erfolgte in drei unterschiedlichen Vektoren. Für die spätere Proteinexpression in CHO- und HEK293- Zellen wurden die Konstrukte in den pcDNA3 Vektor und den AmCyan-P2A-mCherry Vektor kloniert. Die Generierung der Konstrukte im AmCyan-P2A-mCherry Vektor erfolgte durch unsere Kooperationspartner (60, 99). Für diese beiden Vektoren wurden die beiden Untereinheiten separat voneinander kloniert und die CHO- bzw. HEK293-Zellen für Herstellung von rekombinantem TSH mit Plasmid-Desoxyribonukleinsäure (DNA) der beiden Untereinheiten co-transfiziert. Für die spätere Expression in Insektenzellen wurde der Vektor pFastBacDual™ verwendet. In diesem Vektor wurden die beiden Untereinheiten nacheinander in den Vektor kloniert. Die einzelnen Schritte der Klonierung zur Herstellung der Konstrukte im pcDNA3 Vektor und im pFastBacDual™ Vektor waren ähnlich. Abweichungen für die Klonierung im pFastBacDual™ Vektor können dem Protokoll Bac-to-Bac-Baculovirus Expression System von Thermo Fisher entnommen werden. Nach der Klonierung in den pFastBacDual™ Vektor schloss sich ein weiterer Schritt an: die Herstellung eines sogenannten Bacmids, welche unter 3.2.11 dargestellt ist. Die Aufarbeitung der DNA wurde mit Hilfe von unterschiedlichen Kits durchgeführt, welche in 3.2.5 aufgeführt sind. Die Transformation in DH5α E. coli Zellen und die Sequenzierung der Konstrukte unterschied sich im Säugerzellsystem

und Insektenzellsystem nicht. Im Insektenzellsystem folgte jedoch eine weitere Transformation in DH10Bac-Zellen, welche ebenfalls unter 3.2.11 beschrieben ist.

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Prinzip

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode, die der Vervielfältigung bestimmter DNA-Sequenzen dient (100). Dafür wird ein doppelsträngiger DNA-Strang, der den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt enthält (z.B. genomische DNA oder Plasmid-DNA), zwei Oligonukleotide (Primer), die den Start- und Endpunkt der Vervielfältigung markieren, sowie eine hitzestabile DNA-Polymerase und 2'Deoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) benötigt. Die PCR durchläuft dann verschiedene Einzelschritte im Thermocycler: Denaturierung (Strangtrennung), Annealing (Primerhybridisierung) und Elongation (Strangsynthese), welche in ca. 20 - 50 Zyklen wiederholt werden. In dieser Arbeit wurde die PCR als Grundlage vieler weiterer molekularbiologischer Methoden verwendet. Beispielsweise war sie Teil der ortsgerichteten Mutagenese, der Kolonie-PCR, der Gen-Sequenzierung sowie Grundlage von Klonierungsprozessen.

Durchführung

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde mit Hilfe der *Pfu* Polymerase durchgeführt. Zunächst wurde der Ansatz nach folgendem Schema (Tabelle 3.1) pipettiert.

Tabelle 3.1: Ansatz der Polymerase-Kettenreaktion

Reagenz	Menge
PfuTurbo Puffer	1 x
dNTP Mix	0,4 mM
Forward Primer	125 ng
Reverse Primer	125 ng
Template DNA	50 – 300 ng
PfuTurbo Polymerase	2.5 U
ddH₂O	auffüllen auf 25 µl
	∑ 25 µl

Der Ansatz wurde dann in den Thermo-Cycler gegeben und die Polymerase-Kettenreaktion mit folgendem Programm (Tabelle 3.2) durchgeführt.

Tabelle 3.2: Cycler Programm der Polymerase-Kettenreaktion

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	95 °C	5 Minuten
Denaturierung	30	95 °C	30 Sekunden
Primerhybridisierung		55 °C	30 Sekunden
Elongation		72 °C	5 Minuten
Elongation	1	72 °C	10 Minuten
Abkühlung	-	4 °C	bis zur Verwendung

3.2.2 Ortsgerichtete Mutagenese

Prinzip

Mit Hilfe der ortsgerechten Mutagenese ist es möglich, gezielte Insertionen, Substitutionen oder Deletionen von Nukleotiden vorzunehmen (Abbildung 3.4) (101).

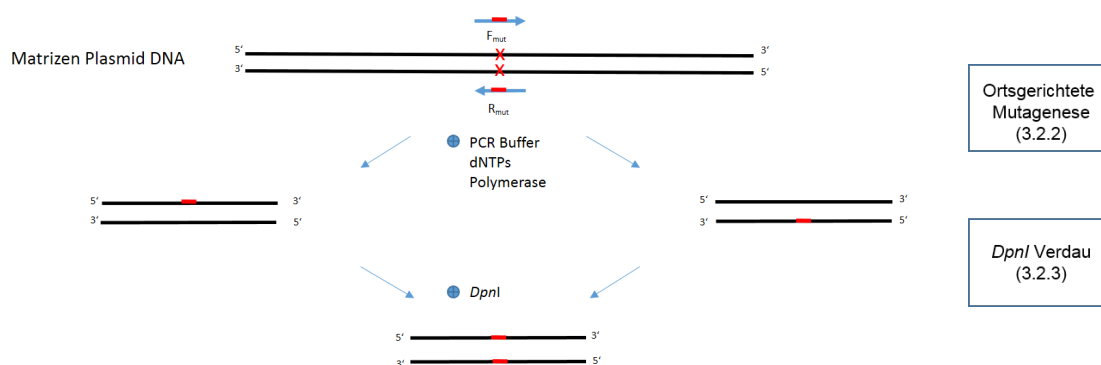


Abbildung 3.4: Ablauf der ortsgerechten Mutagenese mit Substitution einer DNA-Sequenz. Die zu mutierende DNA liegt in Form einer Plasmid DNA vor. Komplementäre Primer (F_{mut} und R_{mut}), die die zu verändernde Region abdecken, wurden designed und synthetisiert. Nach Zugabe eines PCR Puffers, dNTPs und der Enzym Polymerase erfolgte die ortsgerechte Mutagenese mit Hilfe eines PCR Programms im Thermo-Cycler. Dabei hybridisieren die Primer mit den jeweils dazugehörigen Strängen der Matrizen-DNA. Diese werden dann im Zuge der PCR vervielfältigt. Durch den anschließenden Verdau mit *DpnI* wird die ursprüngliche Sequenz entfernt, sodass für die Transformation nur mutierte DNA vorliegt. **PCR:** Polymerase-Kettenreaktion; **DNA:** Desoxyribonukleinsäure; **dNTPs:** 2'Desoxyribonukleosidtriphosphate.

Durchführung

Dafür wurden zunächst forward- und reverse- Primer designed, die die gewünschte Mutation mittig aufwiesen. Geliefert wurden die Primer in pulverisierter Form und wurden dann gemäß des mitgelieferten technischen Datenblatts mit ddH₂O zu 50 µM verdünnt. Zum besseren Pipettieren wurde eine weitere 1:10 Verdünnung vorgenommen, sodass die Primer in einer Konzentration von 5 µmol/µl vorlagen. Daraufhin wurde gemäß dem Protokoll des Quick-Change Site-directed Mutagenesis Kit® verfahren. Jeweils zwei Ansätze mit unterschiedlicher DNA-Menge wurden dann nach folgendem Schema (Tabelle 3.3) in PCR-Reaktionsgefäße pipettiert.

Tabelle 3.3: Ansatz der ortsgerichteten Mutagenese

Reagenz	Ansatz 1 Endkonzentration	Ansatz 2 Endkonzentration
PCR Puffer	1 x	1 x
dNTPs	0,4 mM	0,4 mM
Forward-Primer (5 µM)	125 ng	125 ng
Reverse-Primer (5 µM)	125 ng	125 ng
PfuTurbo DNA Polymerase	2,5 U	2,5 U
Template	50 ng	100 ng
ddH ₂ O	auffüllen auf 50 µl	auffüllen auf 50 µl
	Σ 50 µl	50 µl

Die ortsgerichtete Mutagenese wurde dann mit folgendem Programm im Thermo-Cycler durchgeführt (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Thermo-Cycler Programm für ortsgerichtete Mutagenese

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	95 °C	30 Sekunden
Denaturierung	12-18	95 °C	30 Sekunden
Primerhybridisierung		55 °C	1 Minute
Elongation		68 °C	1 Minute/kb Plasmidlänge
Abkühlung	-	4 °C	bis zur Verwendung

3.2.3 Verdau mit *DpnI*

Prinzip

Ziel des Verdau mit der Endonuclease *DpnI* ist es, die Ausgangs-DNA, also die nicht mutierte DNA aus dem Mutagenese-Ansatz zu entfernen. Durch eine vorangegangene Amplifikation in *E.coli* Bakterien liegt die Ausgangs - DNA methyliert vor und besitzt somit Schnittstellen für *DpnI*. *DpnI* kann also die methylierte Ausgangs-DNA verdauen. Die neu generierte DNA ist hingegen noch nicht methyliert, weist folglich keine Schnittstellen für *DpnI* auf und bleibt somit in dem Ansatz enthalten (101).

Durchführung

Nach der PCR wurde 1 µl *DpnI* (10 U/µl) zu dem Ansatz hinzugegeben und vorsichtig vermischt. Das Gemisch wurde dann eine Stunde bei 37°C inkubiert.

3.2.4 Agarose Gelelektrophorese

Prinzip

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung und Isolation von DNA-Fragmenten beispielsweise nach einer PCR. Dabei werden die DNA-Fragmente ihrer Größe nach in einem elektrischen Spannungsfeld aufgetrennt. Mit Hilfe eines Standards, der ebenfalls in diesem Spannungsfeld aufgetrennt wird, kann dann Rückschluss auf die Größe und Masse der einzelnen Moleküle gezogen werden.

Durchführung

Zunächst wurde ein Agarosegel hergestellt. Je nach erwarteter Größe der PCR-Produkte und Anzahl der Proben wurde ein 1-2 % Agarosegel in entsprechender Größe hergestellt. Dafür wurde zunächst die gewünschte Menge an Agarose abgewogen und in einen Glaskolben mit der gewünschten Menge an TAE-Puffer gegeben. Das Ganze wurde dann in der Mikrowelle erwärmt, bis sich die Agarose in dem Puffer löste. Das Gemisch wurde insgesamt 3 x aufgekocht. Dann wurde das Gel auf ca. 70°C abgekühlt und Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,025 %) zugegeben. Ethidiumbromid interkaliert mit den Nukleinsäuren und sorgt somit dafür, dass die DNA unter UV-Licht sichtbar wird. Das Gemisch wurde dann in eine Gießkammer gegossen und je nach Anzahl der Proben 1 – 2 Kämme eingesetzt.

Während das Gel aushärtete, wurden die DNA-Proben mit einem Ladepuffer (6x), der Bromphenolblau enthielt, versehen. Sobald das Gel ausgehärtet war, wurden die Kämme und Seitenbegrenzungen abgenommen, das Gel in das Gelelektrophoresesystem platziert und der Laufpuffer 0,5xTBE hinzugegeben. Als Größenstandard der DNA wurde *Gene Ruler*® verwendet und ganz links auf das Gel aufgetragen (8 µl). Die DNA-Proben (30 µl) wurden in die Taschen daneben pipettiert. Da es sich um DNA-Proben handelte, wurde die Kathode oben an das System und die Anode unten an das System angeschlossen. So lief die DNA vom Minuspol zum Pluspol bei 90 Volt unter visueller Kontrolle für ca. 30 – 60 Minuten. Danach konnten die DNA-Banden unter ultraviolettem Licht (UV-Licht) mit Hilfe des *GeneFlash* sichtbar gemacht werden.

3.2.5 DNA-Aufarbeitung

Prinzip

Die DNA-Aufarbeitung dient der Extraktion von DNA, sodass diese dann in isolierter Form für weitere Schritte der Experimente zur Verfügung steht. Je nachdem, in welcher Form die DNA vorlag, wurden verschiedenen Kits verwendet, um die DNA zu extrahieren. Diese sind im Folgenden (Tabelle 3.5) dargestellt:

Tabelle 3.5: Übersicht der verwendeten Kits zur DNA-Aufarbeitung

Ausgangsmaterial	Kit
PCR Amplifikat aus Agarose Gel	QIAquick® Gel Extraction Kit
DNA Plasmid aus Mini-Bakterienkultur	Pure Yield™ Plasmid Miniprep System Fast Plasmid Mini® Kits
DNA Plasmid aus Midi-Bakterienkultur	Pure Yield™ Plasmid Midiprep System MACHEREY-NAGEL MaxiPrep System
DNA-Bacmid aus Mini-Bakterienkultur	Pure Link™ HiPure Plasmid Miniprep Kit
DNA-Bacmid aus Maxi-Bakterienkultur	Pure Link™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit

Allen gemeinsam ist, dass die DNA-Isolierung in vier Einzelschritten erfolgt. Zunächst wird die Zellmembran und der Nukleus lysiert, sodass die Nukleinsäuren frei vorliegen. Dann folgen die Extraktion der DNA sowie die Ethanolfällung zu Konzentrierung der

DNA. Um die Reinheit der DNA zu erhöhen schließt sich in der Regel ein weiterer Schritt zur Endotoxinentfernung an.

Durchführung

Die verwendeten Kits wurden gemäß des Herstellerprotokolls durchgeführt. Als letzter Schritt werden die Nukleinsäuren mit ddH₂O eluiert (Minipreps mit 50 µl, Midipreps mit 300 µl und Maxipreps mit jeweils 600 µl ddH₂O). Die Konzentration und Reinheit der Proben wurden anschließend mit Hilfe eines Photometers bestimmt, die Proben, wenn möglich auf 1 µg/µl verdünnt und schließlich bei -20°C gelagert.

3.2.6 Restriktionsverdau

Prinzip

Ein Restriktionsverdau wird sowohl bei Klonierungen als auch nach der Transformation für Restriktionsanalysen eingesetzt. Dabei wird die DNA an einer bestimmten DNA-Sequenz mit Hilfe von Restriktionsenzymen geschnitten, um entweder sogenannte *sticky ends* oder *blunt ends* zu erzeugen. *Sticky ends* zeichnen sich dadurch aus, dass einer der beiden DNA-Einzelstränge wenige Basen über das Ende hinausragt, es also zu 5'-3'-Überhängen kommt. So kann sich ein DNA-Strang mit komplementär passendem *sticky end* daran heften.

Für die Klonierung werden sie gegenüber *blunt ends* bevorzugt, denn sie verhindern, dass die Inserts bei der Klonierung falsch herum eingebaut werden oder ein Leervektor ohne Insert entsteht. Die Effizienz der Klonierung kann somit um ein Vielfaches gesteigert werden (102).

Für die Restriktionsanalyse werden die PCR-Amplifikate ebenfalls mit Restriktionsendonukleasen geschnitten, diese dann mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt. Die entstandenen Fragmente können dann mit einem DNA-Größenstandard hinsichtlich ihrer Größe verglichen werden. Somit kann kostengünstig vor Durchführung einer Sequenzierung überprüft werden, ob die PCR erfolgreich war.

Durchführung

Für die Klonierung werden je nach verwendetem Vektor bzw. dessen Schnittstellen unterschiedliche Enzyme eingesetzt. Im Folgenden (Tabelle 3.6) ist beispielhaft ein

Restriktionsverdau für die Klonierung in Insektenzellen im pfastBacDual Vektor dargestellt.

Tabelle 3.6: Ansatz Restriktionsverdau

Reagenz	Insert Menge	Vektor Menge
DNA-Fragmente	5 µg	5 µg
Verdau-Puffer	1 x	1 x
Enzym I (z.B. <i>BbsI</i>)	1 µl	2 µl
Enzym II (z.B. <i>KpnI</i>)	1 µl	2 µl
BSA	1 U	1 U
ddH ₂ O	auffüllen auf 30 µl	auffüllen auf 30 µl
	Σ 30 µl	30 µl

Der Restriktionsverdau-Ansatz nach der Klonierung wurde dann bei 37°C für eine Stunde inkubiert und per Agarose Gelelektrophorese analysiert.

Für Restriktionsanalysen nach der Transformation wurden je nach verwendetem Vektor entsprechende Endonukleasen verwendet, der Ansatz entsprechend pipettiert, inkubiert und ebenfalls per Gelelektrophorese analysiert.

3.2.7 Ligation

Prinzip

Nach einem Restriktionsverdau liegt die DNA in linearisierter Form vor. Ziel der Ligation ist es, die DNA-Enden mit Hilfe der T4-Ligase wieder zu verknüpfen (103).

Durchführung

Dafür wurde der Ansatz nach folgendem Schema (Tabelle 3.7) pipettiert:

Tabelle 3.7: Ansatz Ligation

Reagenz	Endkonzentration
Vektor	50 ng
PCR-Amplifikat	37,5 ng
T4 Ligations Puffer	1 x
T4-Ligase	200
ddH ₂ O	auffüllen auf 20 µl
	Σ 20 µl

Der Ansatz wurde dann entweder bei Raumtemperatur (RT) für 2 Stunden oder bei 16°C für 20 Stunden inkubiert. Der Ligationsansatz wurde dann in DH5- α E.coli Zellen transformiert.

3.2.8 Herstellung chemisch kompetenter DH5- α E.coli Zellen

Prinzip

E.coli Bakterienzellen vom DH5- α Typ können durch eine Behandlung mit Calciumchlorid eine natürliche Kompetenz entwickeln. Das heißt, sie sind dann in der Lage, DNA (beispielsweise in Form eines Vektorplasmids) aus dem umgebenden Medium aufzunehmen und diese zu vervielfältigen.

Durchführung

Zunächst wurden die DH5- α E.coli Bakterien vorsichtig auf Eis aufgetaut. Sie wurden dann auf einer LB-Agarplatte ohne Antibiotikazusätze ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Einzelkolonie gepickt und in 5 ml LB-Medium (antibiotikafrei) bei 37°C über Nacht im Schüttler kultiviert. Am Tag 3 wurde diese Vorkultur dann in ein größeres Gefäß mit 100 ml LB-Medium überführt und wiederum im Schüttler bei 37 °C für 2-3 Stunden inkubiert. Die Bakterienlösung wurde dann 15 Minuten auf Eis gekühlt und daraufhin bei 600 rpm für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet mit 10 ml gekühltem TfbI-Puffer gelöst und wiederum für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte dann eine weitere 10-minütige Zentrifugation bei 600 rpm und 4 °C. Wieder wurde der Überstand verworfen und das entstandene Pellet in 1 ml TfbII-Puffer resuspendiert und 15 Minuten auf Eis gekühlt. Dann wurden Eppendorf Reaktionsgefäße gekühlt und je 50 μ l der Zellsuspension in diese aliquotiert. Die fertigen Aliquots wurden dann umgehend in einem Bad aus CO₂- Eis und Ethanol schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.9 Transformation in chemisch kompetente DH5- α E.coli Zellen

Prinzip

Bei der Transformation wird das fertige Plasmid in kompetente Bakterienzellen übertragen und dort vervielfältigt (104).

Durchführung

Dafür wurden zwei Eppendorf Reaktionsgefäße mit jeweils 50 µl Zellsuspension aus der -80 °C Gefriertruhe geholt und vorsichtig auf Eis aufgetaut. Nach 15 Minuten wurden die Ligationsansätze dann in die jeweiligen Eppendorf Reaktionsgefäße mit den kompetenten Zellen überführt, vorsichtig vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 Sekunden. Dann wurde ein Kälteschock auf Eis für 2 Minuten durchgeführt. Jedem Eppendorf Reaktionsgefäß wurden dann 200 µl vorgewärmtes SOC-Medium zugeführt und bei 37 °C für 60 Minuten im Schüttler inkubiert. Danach wurde der komplette Ansatz auf eine LB-Agarplatte (supplementiert mit Ampicillin oder Kanamycin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden dann Kolonien, die gewachsen waren, mit einer sterilen Pipette gepickt, erst auf eine LB-Amp Platte (Masterplatte) getippt und dann in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (bzw. Kanamycin) überführt. Die Kultur wurde dann über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert und schließlich mit dem Pure Yield™ Plasmid Miniprep Kit nach Kitangaben aufbereitet und in 50 µl aufgenommen. Um den Erfolg der Transformation einfach und kostengünstig zu überprüfen, wurde eine Restriktionsanalyse der Plasmid DNA (wie oben beschrieben) durchgeführt.

3.2.10 Sequenzierung

Prinzip

Um die korrekte Basenabfolge einer DNA-Sequenz zu überprüfen, wurde die Sequenzier-Methode nach Sanger (Didesoxymethode) durchgeführt (105). Dabei handelt es sich um eine PCR bei der zusätzlich noch mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte 2',3'-Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs) eingebaut werden, um so die Sequenz später darstellen zu können. Dabei wird jeder der vier Nukleinbasen eine andere Farbe zugeordnet. Wird ein 2',3'-Didesoxyribonukleosidtriphosphat eingebaut, kommt es zum Abbruch der PCR, da die Nukleinbasen keine 3' Hydroxylgruppe besitzen die für die weitere Synthese nötig wäre. Es werden also unterschiedlich lange DNA-Stränge generiert, an deren Ende immer einer der vier Fluoreszenzmarker steht.

Nach der Amplifizierung wird die DNA dann durch eine Natriumacetat-Ethanol-fällung von Salzen und Proteinen gereinigt und im Sequenzierer schließlich elektrophoretisch

aufgetrennt. Anhand der Trennung und Sortierung der DNA im Sequenzierer kann dann Rückschluss auf die Basenabfolge gezogen werden.

Durchführung

Zunächst wurden die Sequenzansätze nach folgendem Schema (Tabelle 3.8) pipettiert.

Tabelle 3.8: Ansatz Sequenzierung

Reagenz	Endkonzentration
Plasmid-DNA (ca. 100 ng)	100 ng
Primer (5 μ M)	0,5 μ M
Sequenz Puffer (5x)	0,75 x
BigDye Terminator V3.1 Mix	0,75 μ l
ddH ₂ O	auffüllen auf 10 μ l
Σ	10 μl

Anschließend wurde folgendes Cyclor-Programm (Tabelle 3.9) durchgeführt:

Tabelle 3.9: Cyclor Programm für Sequenzierung

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	95 °C	5 Minuten
Denaturierung	30	95 °C	30 Sekunden
Primerhybridisierung		55 °C	30 Sekunden
Elongation		60 °C	5 Minuten
Elongation	1	60 °C	7 Minuten
Abkühlung	-	4 °C	bis zur Verwendung

Die Proben wurden dann entweder bei -20 °C gelagert oder direkt weiter aufbereitet. Bei der sogenannten DNA-Fällung wurde die DNA mit Hilfe von Alkohol konzentriert und aufgereinigt. Dafür wurden zunächst zu jeder Sequenzreaktion 2 μ l Natriumacetat (NaAc) und 20 μ l von 96% Ethanol hinzu pipettiert. Das Ganze wurde dann für 30 Minuten bei 15 °C und 10.500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin vorsichtig abgesaugt. Es folgte ein Waschschrir mit 200 μ l 70% Ethanol, ebenso wie eine erneute Zentrifugation für 15 Minuten bei ansonsten gleichbleibenden Einstellungen. Der Überstand wurde wiederum abgesaugt, der Rest ein weiteres Mal für 5-10 Minuten zentrifugiert und schließlich ein letztes Mal abgesaugt. Um die

Überreste des Ethanols zu eliminieren, folgte eine Trocknung von für 15 Minuten bei 37° C im Thermo Cycler. Danach wurde der Genetic Analyzer entweder mit den Proben direkt beladen oder die Proben zur späteren Analyse bei -20 °C gelagert. Die Auswertung erfolgte dann mit Hilfe des Programms *Sequencher 4.9*.

3.2.11 Herstellung eines rekombinanten Bacmids

Prinzip

Die Herstellung des Plasmids im pFastBacDual™ Vektor erfolgte analog zu der Herstellung in den Säugerzellsystemen. Für die spätere Proteinexpression in Insektenzellen muss jedoch ein weiterer Schritt folgen: die Herstellung eines sogenannten Bacmids. Ein Bacmid ist ein Shuttle-Vektor, der sich sowohl in *E.coli* Zellen als auch in Insektenzellen vermehren kann. Dafür werden DH10Bac™ Zellen verwendet, die sowohl den Baculovirus Shuttle-Vektor als auch ein Helfer Plasmid enthalten. Das hergestellte Bacmid wird dann zur Transfektion bzw. Infektion der Insektenzellen verwendet (71). Der Ablauf ist im Folgenden (Abbildung 3.5) schematisch dargestellt:

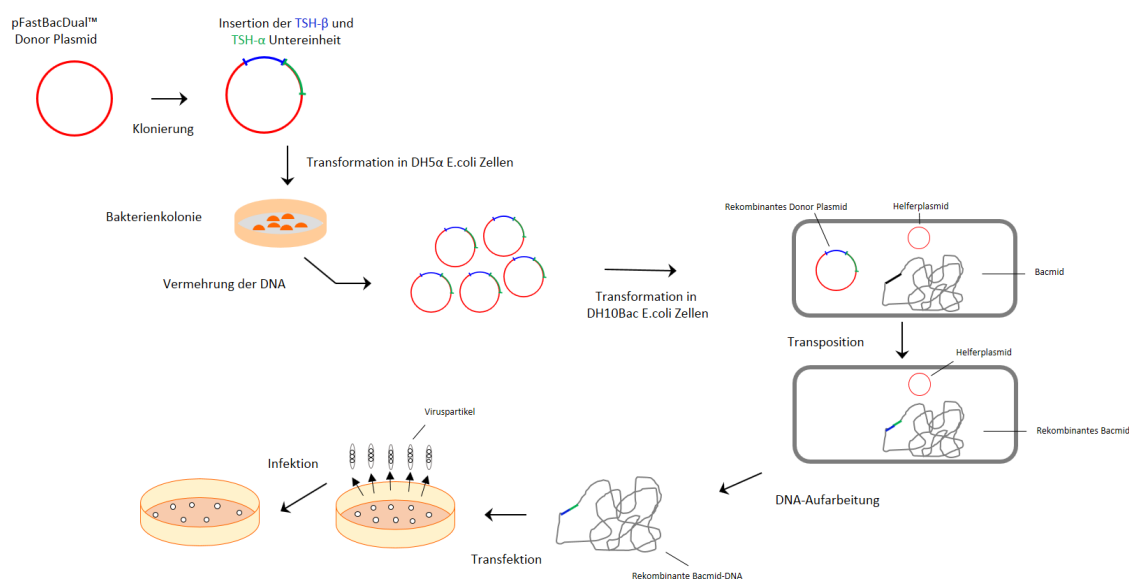


Abbildung 3.5: Schematischer Ablauf der Proteinexpression im Bac-to-Bac-Baculovirus Expressionssystem. Zunächst erfolgte die Klonierung der beiden Untereinheiten des TSH in den pFastBacDual Vektor. Zur Vervielfältigung der DNA folgte dann die Transformation in DH5α-Zellen. Als nächster Schritt folgte dann die Herstellung eines Bacmids durch Transformation in DH10Bac™-Zellen. Nach Einbau der DNA in das Bacmid erfolgte die Isolierung der Bacmid-DNA. Insektenzellen wurden dann mit der Bacmid-DNA transfiziert (siehe 3.3.6.2) und später, um eine größere Ausbeute zu erhalten, mit den Viruspartikeln infiziert (siehe 3.3.6.3).

*Durchführung**Supplementation der LB-Agarplatten*

Für die Transformation in DH10Bac™ Zellen, wurden LB-Agarplatten mit folgenden Zusätzen verwendet (Tabelle 3.10):

Tabelle 3.10: Zusätze der LB-Agarplatten für Transformation in DH10Bac™ Zellen

Zusatz	Menge
Kanamycin	50 µg/ml
Gentamicin	7 µg/ml
Tetracyclin	10 µg/ml
Bluo-Gal	100 µg/ml
IPTG	40 µg/ml

Transformation

Für die Transformation wurden zunächst DH10Bac kompetente *E.coli* Zellen auf Eis aufgetaut. Für jede Transformation wurden dann 100 µl der DH10Bac Zellen in ein vorgekühltes 15 ml Polypropylen Röhrchen überführt. Dann wurden 10 ng des pFastBacDual Plasmids hinzu pipettiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C Grad ohne Schütteln. Daraufhin wurden die Röhrchen sofort wieder auf Eis für weitere 2 Minuten gekühlt. Dann wurden 500 µl LB Medium (RT) hinzugegeben und für 4 Stunden bei 37°C Grad im Schüttler inkubiert. Jedes Konstrukt wurde dann 1:10 mit LB-Medium verdünnt und jeweils 100µl davon auf Agarplatten ausplattiert und die Platten bei 37°C Grad für 48 Stunden inkubiert.

Picken der Bakterienkolonien

Nach 48 Stunden erfolgte die Identifizierung der Bakterien, die das gewünschte rekombinante Bacmid enthielten, über eine Blau-Weiß-Selektion. Bakterien, die zu dieser Selektion fähig sind, enthalten eine funktionsfähige β-Galaktosidase. Diese Galaktosidasen setzen X-Gal enzymatisch um und bilden dabei Galaktose und den blauen Farbstoff 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol, durch welchen die Kolonien, die ein nicht-verändertes Bacmid enthalten, blau erscheinen. Die *multiple cloning site* des Vektors liegt im 5' Abschnitt des lac-Z Gens. Durch Einbau des gewünschten Fragments wird das Leseraster des Gens gestört und es kann keine funktionsfähige β-Galaktosidase

mehr gebildet werden, so dass die Bakterien, die das rekombinante Bacmid enthalten, weiß bleiben. Die ausgewählte Kolonie wurde dann in 1 ml LB-Medium (supplementiert mit 50 µg/ml Kanamycin, 10 µg/ml Tetracyclin und 7 µg/ml Gentamycin) über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden dann jeweils 200 µl der Bakterienkulturen zu 2,5 ml LB-Medium (ebenfalls supplementiert mit Kanamycin, Tetracyclin und Gentamycin) wiederum über Nacht im Schüttler angeimpft.

Aufarbeitung der DNA: Bacmid-DNA Isolierung

Für die Isolierung der Bacmid-DNA wurden 1,5 ml der Bakterienkultur in 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäße gegeben. Diese wurden dann für 15 Minuten bei 14.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin verworfen und der Rest der Bakterienkultur in die Reaktionsgefäße gegeben, der Zentrifugationsschritt wiederholt und die Überstände erneut verworfen. Dann wurden 100 µl von P1 (50 mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH8 plus 100 µg/ml Ribonukleinsäure-ase (RNAse)) hinzugeben und mit der Pipette vorsichtig resuspendiert. Danach wurden 300 µl von P2 (0,2 M NaOH und 5% SDS) hinzu pipettiert und das Ganze 5 Minuten bei RT inkubiert. Es wurden dann 300 µl P3 (3M Kaliumacetat, pH 5,5) hinzugegeben und gut durchmischt, ohne jedoch einen Vortexmischer zu verwenden. Die Proben wurden dann 5 bis 10 Minuten auf Eis gelagert und dann erneut bei 14.000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden dann in neue 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäße gegeben und 800 µl Isopropanol dazu gegeben, gemischt und bei -20 °C für mindestens 15 Minuten gelagert. Dann wurden die Proben bei 14.000 g für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dann vorsichtig verworfen, 500 µl 75% Ethanol dazu gegeben und das Gemisch wiederum für 10 Minuten bei 14.000 g zentrifugiert, bevor der Überstand erneut vorsichtig verworfen wurde. Das Pellet wurde dann in 100 µl ddH₂O aufgenommen. Die Konzentration wurde mit Hilfe eines Photospektrometers gemessen und auf 10 µg/µl verdünnt.

Überprüfung der Bacmid-DNA

Danach erfolgte eine Sequenzierung zur Überprüfung, ob die Plasmid DNA, die gewünschte Basenabfolge enthält.

3.3 Methoden der Zellkultur

3.3.1 Allgemeines

Die Zellkultivierung erfolgte stets unter sterilen Bedingungen inklusive steriler Materialien, Medien und Lösungen. Die verwendeten Zelllinien sowie Medien und Zusätze sind im Folgenden (Tabelle 3.11) aufgeführt:

Tabelle 3.11: Übersicht der verwendeten Zellen, Medien und Zusätze

Zellart	Vollmedium	Zusätze
CHO Zellen (<i>Chinese Hamster Ovary cells</i>)	Ham's F-12 (mit stabilem Glutamat)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 10% FKS ▪ 100 U/ml Penicillin ▪ 100 µg/ml Streptomycin
HEK293 Zellen (<i>Human Embryonic Kidney cells</i>)	Dulbecco's MEM (mit stabilem Glutamat)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 5% FKS ▪ 10% NEA (nicht-essentielle Aminosäuren)
FTC-133 + TSHR Zellen (<i>Follicular Thyroid Cancer cells + stabil transfiziertem TSHR</i>)	Iscove Basal Medium	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 1 % L-Glutamin ▪ 10% FKS ▪ 100 U/ml Penicillin ▪ 100 µg/ml Streptomycin
FTC-238 Zellen (<i>Follicular Thyroid Cancer cells</i>)	Iscove Basal Medium	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 1 % L-Glutamin ▪ 10% FKS ▪ 100 U/ml Penicillin ▪ 100 µl/ml Streptomycin ▪ 500 ng/ml Puromycin ▪ 60 µl/ml Hygromycin
SF-9 Zellen (Insektenzelllinie)	Insect X-Press	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 100 U/ml Penicillin ▪ 100 µl/ml Streptomycin ▪ 1,25 µg/ml Amphotericin B
Tn-5 Zellen (Insektenzelllinie)	Express Five SFM	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 1 % L-Glutamin ▪ 50 U/ml Penicillin ▪ 50 µl/ml Streptomycin ▪ 1,25 µg/ml Amphotericin B

Die Zellkultur-Arbeiten wurden unter einer sterilen Laminairflow-Werkbank durchgeführt und die Zellkulturen anschließend in dafür vorgesehenen Flaschen oder Platten bei 37° C mit 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Ausnahme waren Insektenzellen. Deren Kultivierung ist unter 3.3.5 dargestellt.

3.3.2 Kultivierung und Ernte

Den Zellen in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² wurden in der Regel 20 ml Medium zugeführt, denen mit einer Wachstumsfläche von 25 cm² in der Regel 10 ml. Das Medium wurde regelmäßig gewechselt, einen Hinweis auf den Nährstoffverbrauch gab eine Verfärbung des Mediums infolge einer pH-Änderung. Bei einer Konfluenz von 80-90% wurde das Medium gewechselt und zusätzlich je nach Zelltyp und der weiteren Verwendung der Zellen unterschiedliche Subkulturen generiert. Dazu wurden adhärente Zellen zunächst mit auf 37° erwärmtem PBS gewaschen, um Trypsinreste, Zelltrümmer und Stoffwechselprodukte der Kultivierung zu entfernen. Im Folgenden wurden die Zellen dann mit Trypsin/EDTA von der Oberfläche gelöst. Die Ablösung wurde durch eine kurze Inkubation von 3-5 Minuten bei 37° C im Brutschrank beschleunigt und die Enzymreaktion schließlich durch Zugabe von erwärmtem Medium gestoppt. Durch vorsichtiges Beklopfen und wiederholtes Spülen des Zellrasens mit frischem Medium wurden die Zellen vollständig von der Oberfläche gelöst und abhängig vom weiteren Vorgehen entweder geteilt oder in Einfriermedium eingefroren.

3.3.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für die spätere Verwendung vorgesehene Zellen wurden in einem Einfriermedium bestehend aus 90% fetalem Kälberserum (FKS; 9 ml) und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO; 1 ml) eingefroren. Dafür wurden zunächst die trypsinisierten Zellen in ein 15 ml Falcon Röhrchen überführt und die Zellen dann für 5 Minuten bei 200 g und 21° C zentrifugiert. Währenddessen wurden FKS und DMSO vermischt. Dann wurden 2 ml des Einfriermediums zum Zellpellet gegeben und dieses resuspendiert. Jeweils 1,5 ml dieser resuspendierten Zellen wurden dann in Kryoröhrchen und schließlich in eine Einfrierbox bei -80°C gegeben, die dafür sorgt, dass die Zellen gleichmäßig 1° C pro Minute herunterkühlen, sodass das DMSO langsam in die Zellen diffundieren kann, das Wasser verdrängen kann und somit die Bildung von Eiskristallen verhindert wird. Bereits eingefrorene Zellen wurden für die Verwendung aus dem -80 °C Gefrierschrank oder aus dem -180° C Stickstofftank entnommen. Die Kryoröhrchen wurden dann im Wasserbad aufgetaut und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Um das toxisch wirkende DMSO zu entfernen wurden sie dann bei 800 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das entstandene

Zellpellet wurde dann mit 5 ml Medium resuspendiert, in eine neue Zellkulturflasche überführt und diese auf 20 ml mit dem entsprechenden leicht erwärmten Medium aufgefüllt.

3.3.4 Zellzahlbestimmung

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurde eine *Neubauer Improved*-Zählkammer verwendet. Dazu wurde ein Deckglas auf die Trägerstege der Zählkammer gedrückt, bis an beiden Seiten sog. Newtonesche Ringe zu sehen waren. Dann wurden 10 µl der trypsinisierten Zellen unter das Deckglas pipettiert und die Zellen in den vier Quadraten unter dem Mikroskop ausgezählt, addiert und ihr Mittelwert berechnet. Das Ergebnis $\times 10^4$ gab dann die Zellzahl pro Milliliter an.

Alternativ wurde die Zellzahl mit Hilfe des *Luna™ Automated Cell Counter* bestimmt. Dazu wurden 10 µl der trypsinisierten Zellen auf die dafür vorgesehene Glasplatte pipettiert, die speziell geformt ist, sodass sich die Zellsuspension gleichmäßig verteilen kann. Die Glasplatte wurde dann in das Gerät gesteckt und die Zellzahl automatisch bestimmt.

3.3.5 Zellkultivierung von Insektenzellen

Im Gegensatz zu den Säugerzellen handelte es sich bei den verwendeten Insektenzellen um nicht-adhärenente Zellen. Sie wurden folglich in Zellkulturflaschen (i.d.R. 175 cm²) als Suspensionskultur kultiviert. Die Insektenzellen wurden in der Regel in einem Brutschrank mit 27 °C unter Sauerstoffzufuhr inkubiert. Eine CO₂-Zufuhr war nicht notwendig, da die verwendeten Medien Phosphat-gepuffert waren und somit kein CO₂ für die Aufrechterhaltung des pH-Wertes notwendig war.

Für die notwendige Sauerstoffzufuhr blieben die Deckel der Kulturflaschen leicht geöffnet und die Flaschen wurden regelmäßig geschüttelt, um eine gleichmäßige Zellzahl der Suspension zu erreichen. Für Subkulturen wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen gezählt und entsprechend der gewünschten Zellzahl mit frischem, leicht vorgewärmten Medium unter sterilen Bedingungen verdünnt. Es wurde darauf geachtet, dass nach der Verdünnung eine Zellzahl von mindestens 10⁵ Zellen/ml vorlag.

3.3.6 Transiente Transfektion

3.3.6.1 Transiente Transfektion in CHO- und HEK-Zellen zur Proteinexpression

Prinzip

Transiente Transfektion bezeichnet das Einbringen von DNA/RNA/Proteinen in kultivierte Wirtszellen. Sie ist dadurch gekennzeichnet, dass sie zeitlich begrenzt ist und im Gegensatz zur stabilen Transfektion keine Selektionsmarker aufweist und die Fremd-DNA/RNA/Proteine nicht ins Chromosom integriert werden. Das hier verwendete Transfektionsreagenz Metafectene® basiert auf der Methode der Lipofektion. Metafectene® enthält Lipide und Colipide in Wasser, welche mit der hinzugefügten DNA einen Komplex bilden. Die dadurch entstandenen Liposomen werden dann von der Zelle durch Endocytose aufgenommen und weiter zum Zellkern geschleust. Dort dissoziieren DNA und Lipide dann wieder, sodass das Plasmid in den Zellkern eingeschleust werden kann.

Durchführung

Für die Proteinexpression in CHO- und HEK293-Zellen, wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst, schließlich mit 10 ml des entsprechenden Vollmediums gespült und die Zellzahl bestimmt. Daraufhin wurden jeweils etwa $4,5 \times 10^6$ Zellen in einer 175 cm^3 Zellkulturflasche mit 30 ml Vollmedium ausgesät und für 24 Stunden im Brutschrank bei 37° C und CO_2 (5%) inkubiert (Abbildung 3.6). Am darauffolgenden Tag wurden gemäß des Protokolls des Transfektionsreagenz *Metafectene*® zwei Lösungen hergestellt. Lösung A enthielt 10 ml Medium (DMEM/Ham's F12 + 5% charcoal FKS) und pro Flasche 66 μg TSH- α Plasmid DNA (im pcDNA3 Vektor) sowie 22 μg TSH- β Plasmid-DNA (im AmCyan-P2A-mCherry Vektor) bzw. Mutanten der β -Untereinheit. Das Verhältnis von TSH α -Untereinheit zu TSH β -Untereinheit (WT und Mutanten) betrug somit stets 3:1. Lösung B enthielt neben dem Medium (ebenfalls 10 ml) 66 μl des Transfektionsreagenz *Metafectene*® pro Flasche. Lösung A wurde dann zu Lösung B gegeben und vorsichtig vermischt. Daraufhin folgte eine Inkubation von 15-20 Minuten bei RT. Nach etwa 10 Minuten konnte das Nährmedium der über Nacht inkubierten Flaschen abgesaugt werden und durch jeweils 25 ml frisches DMEM/Ham's F12 Medium ersetzt werden. Dann wurde zu jeder Flasche 5 ml des Mix aus Lösung A und Lösung B hinzugefügt, durch Hin-

und Herschwenken vorsichtig vermischt und über Nacht wieder im Brutschrank inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die Überstände gesammelt (Abbildung 3.6).

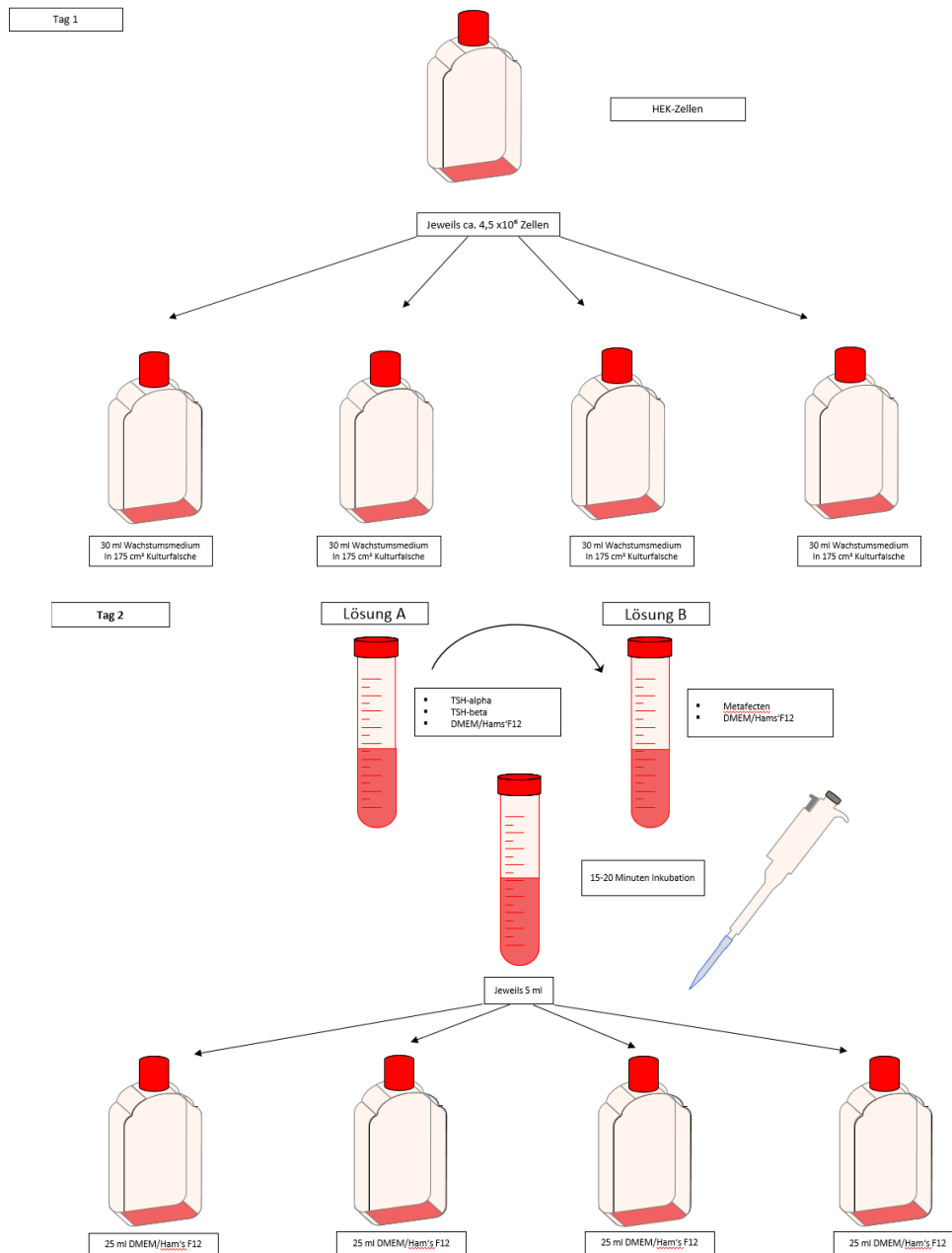


Abbildung 3.6: Schematischer Ablauf der transienten Transfektion in HEK293 und CHO-Zellen. An Tag 1 wurden die Zellen mit einer Dichte von $4,5 \times 10^6$ Zellen ausgesät und über Nacht inkubiert. An Tag 2 erfolgte die transiente Transfektion mit Metafectene® und der Plasmid-DNA der beiden Untereinheiten des TSH sowie eine erneute Inkubation von 48 Stunden. Danach wurden die Überstände gesammelt und aufgereinigt. **TSH**: Thyroidea-stimulierendes Hormon.

3.3.6.2 Transiente Transfektion in Insektenzellen zur Proteinexpression

Prinzip

Um eine erhöhte Ausbeute an WT-TSH und mutiertem TSH zu erhalten, wurde die Proteinexpression zusätzlich in Insektenzellen durchgeführt. Dafür wurden die Insektenzellen (Sf-9Zellen) zunächst transient transfiziert und eine anderer Stamm Insektenzellen (Tn-5 Zellen) dann mit den gewonnenen Viruspartikeln infiziert. Das hier verwendete Transfektionsreagenz FuGENE HD® Transfection Reagent basiert ebenfalls auf dem Prinzip der Lipofektion. Das Reagenz wurde auf Empfehlung des Instituts für Experimentelle Endokrinologie der Charité Berlin (Dr. Waldemar Minich) verwendet, da die Versuche mit Insektenzellen zunächst analog des dort etablierten Protokolls durchgeführt werden sollten.

Durchführung

Zunächst wurden SF-9 Zellen in Suspensionskultur genommen und mit dem Medium Insect X-Press (supplementiert mit Penicillin, Streptomycin und Amphotericin B; jeweils 1/200) inkubiert. Sie wurden eine Woche bei 27 °C unter sterilen Bedingungen kultiviert, bis dann die Transfektion folgte.

Dafür wurde zunächst die Zellzahl bestimmt und infolgedessen 8×10^5 Zellen pro Well in mehreren 6-Well-Platten ausgesät. 2 ml Insect X-Press Medium ohne Antibiotika- oder Fungizid-Zusätze wurden pro Well hinzugefügt und die Zellen bei 27 °C über Nacht inkubiert. Dann wurden pro Well 2 µg Baculovirus DNA in 100 µl Insect-X Press Medium ohne Zusätze gelöst. Hinzu kamen dann 8 µl FuGENE HD® Transfection Reagent pro Well. Dieser Mix wurde dann 10 Minuten bei RT inkubiert und jeweils 100 µl des Ansatzes vorsichtig in die Wells getropft. Bei 27 °C wurden die Zellen dann inkubiert bis sie ca. 24-72 Stunden später Zeichen einer späten Infektion zeigten (Wachstumsstillstand, granuläres Aussehen durch Abschnüren des Virus von der Zellmembran und Ablösung der Zellen von den Platten).

Dann wurde das das Virus enthaltene Medium in einem 50 ml Falcon Tube gesammelt und bei 500 x g für 5 Minuten zentrifugiert, um Zellen und Zelldebris zu entfernen. Der Überstand wurde dann in ein neues Falcon Röhrchen gegeben. Dieser P1 Stock wies eine geringe Konzentration an Viren auf. Er wurde in Aliquots von 5 ml aufgeteilt und entweder bei 4 °C zur weiteren Herstellung eines P2 Stocks oder bei -80 °C zur späteren Verwendung gelagert.

3.3.6.3 Infektion von Insektenzellen zur gesteigerten Proteinexpression

Prinzip

Ziel der Infektion von Insektenzellen mit dem P1 Stock ist ein P2 Stock, der einen erheblich höheren Virustiter aufweist und somit wesentlich effektiver Proteine wie TSH herzustellen vermag.

Durchführung

Um den P1 Stock zu amplifizieren, wurden Tn-5 Insektenzellen (High Five) in Kultur genommen und bei 27°C mit Express Five SFM Medium kultiviert. Eine Woche später wurden dann zu 100 ml Zellsuspension mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml, 5 ml des P1 Stocks gegeben und für 72 Stunden bei 27 °C im Schüttler inkubiert. Zu Beginn und jeweils 24 und 48 Stunden später wurden 400 µl entnommen, um später eine Kinetik beurteilen zu können. Nach 72 Stunden wurde dann das restliche Medium abgenommen, bei 500 x g für 5 Minuten zentrifugiert, um Zellen und Zelldebris zu entfernen. Schließlich wurde der Überstand bei der Firma Brahms in Hennigsdorf auf 20 ml aufkonzentriert, in Aliquots von 500 µl und 100 µl überführt und diese wiederum bei -80 °C gelagert.

3.3.6.4 Transiente Transfektion in HEK-Zellen und CHO-Zellen zur mikroskopischen Proteinquantifizierung

Prinzip

Die Transfektionseffizienz des WT und der Mutanten sollten später miteinander verglichen werden, um Rückschluss auf die Menge des hergestellten Proteins ziehen zu können. Für Untersuchungen unter dem Lichtmikroskop wurde der Versuch in sogenannten FluoroDishes® Schalen bzw. für das konfokale Mikroskop mit Deckgläsern, die in 6-Well Platten fixiert wurden, durchgeführt.

Durchführung

Der Versuch wurde wie unter 3.3.6.1 durchgeführt, die Zellzahl, die Menge an Medium, DNA und Transfektionsreagenz jedoch an die Größe der Schalen bzw. 6-Well Platten angepasst. Für die spätere Quantifizierung der Proteinmenge am Lichtmikroskop wurden FluorDishes® verwendet, die einen besonders dünnen Boden aufweisen und somit für die Lichtmikroskopie gut geeignet sind. Die FluoroDishes® wurden zunächst

mit Poly-L-Lysin beschichtet, um eine bessere Haftung der Zellen zu gewährleisten. Dafür wurde Poly-L-Lysin 1:2 mit PBS vermischt und die Platten mit dem Gemisch benetzt. Nach 10 Minuten wurde das Poly-L-Lysin Gemisch wieder abgenommen und die Schalen zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden HEK293-Zellen mit einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ pro Well ausgesät und jeweils 2 ml des jeweiligen Vollmediums hinzugegeben. 24 Stunden später wurden die Zellen mit jeweils 2,4 µg Plasmid DNA der TSH α -Untereinheit (im pcDNA3Vektor) und 0,8 µg Plasmid-DNA der TSH β -Untereinheit (im AmCyan-p2A-mCherry Vektor) sowie 6 µl Metafectene® pro Well transient transfiziert und in DMEM/Ham's F12 Medium kultiviert. Die Quantifizierung der Proteinmenge anhand der lichtmikroskopischen Messungen erfolgte 24 Stunden später.

Für die spätere visuelle Quantifizierung der Proteinmenge anhand des konfokalen Mikroskops wurden HEK293- und CHO-Zellen in 6 Well-Platten, die Deckgläser enthielten, ausgesät. Die Vorbereitung mit Poly-L-Lysin, die Menge des Mediums, der Plasmid-DNA und des Transfektionsreagenz entsprachen der Transfektion in FluorDishes®. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Probenfixierung der Deckgläser für das konfokale Mikroskop.

3.3.6.5 Transiente Transfektion für cAMP Assay

Prinzip

Zur funktionellen Charakterisierung des WT-TSH und der Mutanten am TSHR mussten HEK293-Zellen vor der Stimulation mit dem TSHR transient transfiziert werden.

Durchführung

An Tag 1 wurden HEK293-Zellen mit einer Dichte von $1,5 \times 10^4$ pro Well in 96-well Platten ausgesät und mit Vollmedium (DMEM mit 5% FKS und NEA) kultiviert. 24 Stunden später wurden die Zellen dann mit 45 ng/well TSHR Plasmid-DNA (im pcDps Vektor) und 0,45 µl Metafectene® pro well und in Medium (DMEM ohne Zusätze) kultiviert. 48 Stunden später wurden die Zellen dann mit den Liganden stimuliert.

3.3.6.6 Transiente Transfektion für Reportergergenassays

Prinzip

Vor Durchführung der Reportergergenassays mussten HEK293-Zellen sowohl mit dem TSHR, als auch mit dem jeweiligen Reportergergen (in dieser Arbeit *Nuclear Factor of Activated T-cells* (NFAT) und *Serum Response Element* (SRE)) transient co-transfiziert werden.

Durchführung

An Tag 1 wurden $1,5 \times 10^4$ Zellen pro Well in 96-well Platten ausgesetzt und mit Vollmedium (DMEM mit 5% FKS und NEA) kultiviert. 24 Stunden später wurden die Zellen dann mit jeweils 45 ng TSHR Plasmid-DNA (im pcDps Vektor) pro Well und 45 ng des Reportergergens (NFAT bzw. SRE in pcDps Vektor) sowie 0.45 μ l Metafectene® pro well transient co-transfiziert. Nach 48 Stunden erfolgte dann die Stimulation mit den Liganden.

3.3.6.7 Übersicht der durchgeführten Transfektionen

Im Folgenden (Tabelle 3.12) ist eine Zusammenfassung der durchgeführten Transfektionen dargestellt.

Tabelle 3.12: Übersicht der durchgeführten Transfektionen

	Proteinexpression CHO-/HEK293 Zellen	Proteinexpression Insektenzellen	Proteinquantifizierung Lichtmikroskop	Proteinquantifizierung konfokales Mikroskop	Reportergergen- assay NFAT	Reportergergen- assay SRE
Zelltyp	CHO Zellen HEK293 Zellen	SF-9 Zellen	CHO Zellen HEK293 Zellen	CHO Zellen HEK293 Zellen	HEK293 Zellen	HEK293 Zellen
Kultivierungs- gefäß	175 cm ² Kulturflaschen	6-Well Platten	FluoroDishes®	Deckgläser in 6-Well Platten	96-Well Platten	96-Well Platten
Zellzahl	$4,5 \times 10^6$ pro Flasche	8×10^5 pro Well	$1,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$
Vollmedium	20 ml DMEM/Ham's F12 pro Flasche	2 ml Insect X-Press Medium pro Well	2 ml DMEM/Ham's F12 pro Well	2 ml DMEM/Ham's F12 pro Well	100 μ l DMEM	100 μ l DMEM
Zusätze Vollmedium	5% charcoal- treated FKS	Amphotericin B 0,5 % Streptomycin: 0,5 % Penicillin: 0,5 %	5% charcoal- treated FKS	5% charcoal- treated FKS	5 % FKS NEA	5 % FKS NEA
Plasmid-DNA (inkl. Menge)	66 μ g TSH- α 22 μ g TSH- β	2 μ g Baculovirus DNA (enthält TSH- α und TSH- β)	2,4 μ g TSH- α 0,8 μ g TSH- β	2,4 μ g TSH- α 0,8 μ g TSH- β	0,45 μ g TSHR 0,45 μ g NFAT Reportergergen	0,45 μ g TSHR 0,45 μ g SRE Reportergergen
Transfektions- reagenz (inkl. Menge)	66 μ l Metafectene®	8 μ l FuGENE HD®	6 μ l Metafectene®	6 μ l Metafectene®	0,45 μ l Metafectene®	0,45 μ l Metafectene®
Transfektions- medium	20 ml DMEM/Ham's F12 pro Flasche	2 ml Insect-X-Press Medium pro Well	2 ml DMEM/Ham's F12 pro Well	2 ml DMEM/Ham's F12 pro Well	100 μ l DMEM/Ham's F12	100 μ l DMEM/Ham's F12
Zusätze Transfektions- medium	5% charcoal-treated FKS	Keine Zusätze	5% charcoal-treated FKS	5% charcoal-treated FKS	Keine Zusätze	Keine Zusätze

3.3.7 Probenfixierung für konfokales Mikroskop

Prinzip

Für weitere Untersuchungen am konfokalen Mikroskop mussten die Proben fixiert werden, um die histologischen Strukturen zu erhalten. Das hier verwendete PFA eignet sich gut als Fixierungsmittel für die Fluoreszenz-Mikroskopie. Durch Denaturierung bewirkt es eine Anhaftung der Zellen an das Deckglas, ohne jedoch die Struktur der Zelle maßgeblich zu verändern. Das anschließend verwendete Medium *Vectashield HardSet Antifade Mounting* verhindert nach der Fixierung das Ausbleichen der Fluoreszenzen und härtet die Probe aus, sodass das Deckglas fest am Objektträger fixiert wird.

Durchführung

An Tag 3 des Protokolls wurde zunächst das Medium aus den 6-Well Platten entfernt. Die Deckgläser wurden dann vorsichtig 2 x mit vorgewärmten PBS gewaschen, das PBS wieder abgesaugt und dann mit 4 % PFA für 20 Minuten bei RT fixiert. Danach wurden die Deckgläschen mit einem Skalpell vorsichtig aus den FluoroDishes® genommen, das Paraformaldehyd abgetropft und mit 30 µl *Vectashield HardSet Antifade Mounting Medium* auf einem Objektträger fixiert. Die Proben wurden dann bei 4°C im Dunkeln bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.4 Mikroskopie

3.4.1 Quantifizierung der Proteinmenge anhand des Lichtmikroskops

Prinzip

Der Sinn der Klonierung des WT-TSH und der Mutanten in den AmCyan-P2A-mCherry Vektor war, durch dessen Fluoreszenzproteine die Transfektionseffizienz im Mikroskop zu vergleichen und somit Rückschluss auf die Proteinmenge ziehen zu können. Der Vektor kodiert zwei Fluoreszenzproteine, deren Intensitäten verglichen werden können. Zum einen durch die tatsächliche Messung der Intensität am Lichtmikroskop mit Hilfe einer Software und zum anderen anhand des visuellen Vergleichs der Proben am konfokalen Mikroskop. Mit Hilfe des Lichtmikroskops wurden die Fluoreszenz-Intensitäten von AmCyan der transfizierten Zellen nach der Mäander-Methode gemessen, Mittelwerte berechnet und diese dann verglichen.

Durchführung

Die FluoroDishes® wurden 24 Stunden nach der Transfektion in das Lichtmikroskop Axiovert10 von Zeiss eingelegt. Da die Plasmide die Fluoreszenzgene AmCyan und mCherry enthielten, wurden Filter, die deren Wellenlängen abdeckten, eingesetzt (Tabelle 3.13):

Tabelle 3.13: Übersicht der verwendeten Wellenlängen

Name	Anregung	Emission
AmCyan	458 nm	470 – 579 nm
mCherry	543 nm	578 – 696 nm

Mit Hilfe des Software Programms Live Acquisition konnten nun die Fluoreszenz-Intensitäten der transfizierten Zellen beurteilt werden. Nach der Mäander Methode wurden die Zellen nach und nach einzeln gemessen. Eine technische Assistentin des Instituts übernahm freundlicherweise die Messungen, um diese durch Voreingenommenheit nicht zu beeinflussen. Die Messungen der einzelnen Zellen wurden nach dem folgenden Protokoll (Tabelle 3.14) durchgeführt:

Tabelle 3.14: Protokoll zur Messung der Lichtintensitäten

Protokoll

Wellenlänge Kanal 1 (AmCyan)	465 nm
Wellenlänge Kanal 2 (mCherry)	558 nm
Belichtungsdauer	200 ms
Abstand zwischen den einzelnen Messungen	8000 ms
Zyklusdauer	50.000 ms
Wiederholungen	100

3.4.2 Quantifizierung der Proteinmenge anhand des konfokalen Lasermikroskop

Prinzip

Als zweiter Teil zur Quantifizierung der produzierten TSH-Menge wurden die Zellen visuell mit Hilfe eines hochauflösenden konfokalen Lasermikroskops verglichen. Beim konfokalen Mikroskop wird zu einem bestimmten Zeitpunkt immer nur ein bestimmter Ausschnitt eines Präparats durch einen fokussierten Laser beleuchtet. Der Laserstrahl scannt dann punktweise das gesamte Präparat bzw. den zu erfassenden Ausschnitt, sodass am Ende ein komplettes Bild rekonstruiert werden kann. So kann im Gegensatz zum konventionellen Lichtmikroskop eine wesentliche höhere räumliche Auflösung und in diesem Fall ein genauerer Vergleich der Transfektionseffizienz gewährleistet werden.

Durchführung

Etwa 24 Stunden, nachdem die Proben fixiert wurden, waren sie vollständig ausgehärtet und konnten unter dem Leica *TCS SPE Lasermikroskop* betrachtet werden. Die Anregung von AmCyan erfolgte mit einer Wellenlänge von 458 nm, mCherry wurde hingegen mit einer Wellenlänge von 540 nm angeregt. Mit der Software *Leica Application Suite* konnten dann Bilder rekonstruiert werden und eine optimale Einstellung hinsichtlich Auflösung und Laserstärke gefunden werden, ohne gleichzeitig eine zu schnelle Ausbleichung der Proben zu verursachen.

Im Anschluss wurde die Menge des WT-TSH per ELISA bestimmt und die Menge der Mutanten gleichgesetzt, da es keine Unterschiede zwischen WT-TSH und den Mutanten in Hinblick auf die Messung der Fluoreszenzintensitäten oder dem visuellen Abgleich gab.

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Probenaufarbeitung

3.5.1.1 Ultrafiltration der Überstände

Prinzip

Die Ultrafiltration mit dem Amicon Ultracel® -3K Filtersystem stellt eine geeignete Methode zur Aufkonzentrierung von Proben dar. Dieses Filtersystem zeichnet sich dadurch aus, dass es Moleküle einer bestimmten Größe nicht durchlässt. Die verwendeten Filter haben einen Molecular weight cut-off (MWCO) von 3000, sodass Moleküle mit einem Gewicht von ≥ 3 kDa zu 90% durch die Membran zurückgehalten werden. Die TSH-Moleküle und die hergestellten Mutanten haben ein Molekulargewicht von ca. 28,5 kDa, sodass sie von der Membran zurückgehalten werden konnten.

Durchführung

Etwa 48 Stunden nach der Transfektion in CHO- und HEK293-Zellen wurden die Überstände in einem bzw. mehreren Falcon Röhrchen gesammelt und zunächst 10 Minuten bei 4700 rpm und 4° C, zentrifugiert um den Zelldebris zu entfernen. Die Überstände wurden dann in ein neues Falcon Röhrchen gegeben und in dem Amicon Ultracel® -3K Filtersystem aufkonzentriert. Die Überstände wurden portionweise in diese Filter überführt, diese in ein 50 ml Falcon Röhrchen gesteckt und bei 2500 rpm und 4° C zunächst für 30 Minuten zentrifugiert. Der Vorgang wurde so lange wiederholt, bis die Überstände auf 10 ml aufkonzentriert waren. Die konzentrierten Überstände wurden dann auf 20 PCR-Reaktionsgefäße à 500 µl überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80° C eingefroren.

3.5.2 Proteinanalytik

3.5.2.1 Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Prinzip

Zur Überprüfung der TSH-Konzentration in den Überständen wurde ein kommerzieller ELISA durchgeführt. Bei dem TSH (Human) ELISA Kit von Abnova handelt es sich um einen Sandwich-ELISA. Dabei binden zwei Antikörper nacheinander an zwei unterschiedliche Epitope des Antigens. Der zweite Antikörper bindet dann ein Enzym,

welches nach Zugabe eines Substrats einen Farbumschlag herbeiführt. Dieser Farbumschlag kann dann photometrisch gemessen und ausgewertet werden.

Durchführung

Gemäß des Protokolls wurden zunächst die Standardkurve und die Kontrollen aus Filterpapier mit Blut ausgestanzt, in die Well-Platten gegeben und in 100 µl Probenpuffer gelöst. Die Proben wurden je nach Versuch unterschiedlich mit dem Probenpuffer verdünnt und ebenfalls in die Wells, die den ersten Antikörper gebunden hatten, gegeben. Die Platte wurde dann für 1 Stunde bei 4° C inkubiert, dann für 20 Sekunden geschüttelt und erneut für 20 Stunden bei 4° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gemisch entfernt und die Platte fünfmal mit dem mitgelieferten Waschpuffer gewaschen, um ungebundene Bestandteile zu entfernen. Danach wurden 100 µl des Enzymkonjugats (Enzym und zweiter Antikörper) in jedes Well pipettiert und die Platte bei 37° C für eine Stunde im Brutschrank inkubiert, sodass sich Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe bilden konnten. Danach wurde der Waschvorgang wiederholt, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Schließlich wurden 100 µl der Substratlösung in jedes Well gegeben und die Platte erneut im Brutschrank inkubiert. Nach 15 Minuten wurde die Reaktion durch jeweils 100 µl der Stopplösung beendet. Innerhalb von 30 Minuten wurde dann die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm mit Hilfe des *Anthos Plattenreaders*® gemessen. Mit Hilfe der mitgeführten Standardkurve konnte dann die Konzentration des TSH berechnet werden.

3.5.2.2 Western Blot Verfahren

Prinzip

Mit Hilfe des Western Blot Verfahren sollten die hergestellten rekombinanten Proteine semiquantitativ analysiert werden. Bei dem sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-Page) - Western Blot handelt es sich um ein denaturierendes Verfahren. SDS wirkt als Detergens auf die Proteine und führt somit zu einer Zerstörung der Sekundär- und Tertiärstruktur. Zudem lagert sich SDS so an die Proteine an, dass deren Eigenladung überdeckt wird und die Proteine somit alle negativ geladen sind. Die Trennung im Polyacrylamidgel erfolgt dann anhand der unterschiedlichen Größe der Polypeptidketten. Zudem wird ein Größenstandard (*Page Ruler*™ Prestained Plus Protein Ladder) auf jedes Gel aufgetragen, anhand dessen die Proben dann analysiert werden können.

Gelherstellung: Trenngel und Sammelgel

Zunächst wurden Trenngel, deren Acrylamidkonzentration sich nach dem Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine richtete, gegossen. Für die Analyse des TSH-WT und der Mutanten lag diese Konzentration zwischen 10-15%. Auf das Trenngel wurden dann 800 µl ddH₂O pipettiert, sodass sich eine glatte Kante bilden konnte. Das Gel war nach etwa 30 Minuten auspolymerisiert, das Wasser konnte entfernt werden und das Sammelgel hergestellt werden.

Das Gel wurde auf das bereits ausgehärtete Trenngel gegossen, die Taschenkämme eingesetzt und wiederum etwa 30 Minuten gewartet, bis auch dieses Gel auspolymerisiert war. Sammelgele wiesen stets eine Acrylamidkonzentration von 5% auf. Die Herstellung eines 15% Trenngels (Tabelle 3.15) und Sammelgels (Tabelle 3.16) sind im Folgenden dargestellt:

Tabelle 3.15: Ansatz eines 15% Trenngels

Substanz	Menge (1 kleines Gel 15%)
ddH₂O	-
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1,25 ml
20 % Gellösung (30 % Acrylamid, 2 % Bisacrylamid, ddH₂O)	3,75 ml
10 % APS	50 µl
TEMED	5 µl

Tabelle 3.16: Ansatz eines Sammelgels

Substanz	Menge (1 kleines Gel 5%)
ddH₂O	1 ml
0,5 M Tris-HCl pH 6,8 + 0,4 % SDS	500 µl
20 % Gellösung (30 % Acrylamid, 2 % Bisacrylamid, ddH₂O)	500 µl
10 % APS	20 µl
TEMED	2 µl

Probenvorbereitung

Zu den Proben wurden in der Zwischenzeit 6 x Ladepuffer hinzu pipettiert und diese dann für 10 Minuten bei 95 °C inkubiert. Der Ladepuffer enthielt SDS im Überschuss, sodass sowohl Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins durch dieses Verfahren zerstört wurden als auch die Eigenladungen der Proteine durch Anlagerung der SDS

Moleküle überlagert wurden. Somit wiesen die Proteine alle eine negative Ladung auf, was Voraussetzung für die folgende Gelelektrophorese war.

Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden dann die Glasplatten, die das Gel enthielten, in einer Vorrichtung mit einer Gegenplatte befestigt, das Ganze in die dafür vorgesehene Kiste gegeben und mit Laufpuffer aufgegossen. Wichtig war es darauf zu achten, dass die beiden Systeme stets getrennt blieben, der Laufpuffer also nicht über die Glasplatte gegossen wurde. Dann wurden die Kämme entfernt und in die äußerste Tasche 7 μl *Page Ruler*TM pipettiert, um Größenstandards später auf dem Gel sichtbar zu machen. Jeweils 20 μl der Proben wurden dann der Reihe nach in die benachbarten Taschen pipettiert. Die Gelelektrophorese Box wurde daraufhin verschlossen und zunächst auf 60-65 Volt, nach 20 – 30 Minuten dann auf 100 Volt eingestellt. Innerhalb von 60-120 Minuten erfolgte so die Auftrennung der Polypeptidketten anhand ihrer relativen Größe im Polyacrylamidgel.

Protein-Blotting

Der nächste Schritt war dann, die Polypeptidbanden auf eine Membran zu transferieren. Dazu wurden das Gel, eine Microcellulose Membran und das sogenannte Blotting Papier mit dem Transferpuffer einzeln für 2-5 Minuten äquilibriert und auf dem Trans Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell System folgendermaßen angeordnet (Abbildung 3.7):

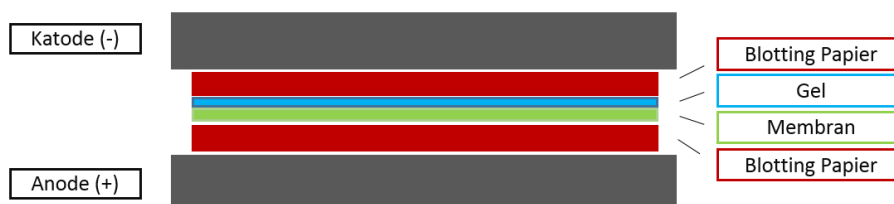


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung des Semi-Dry-Blottings (Elektrotransfers). Hierbei werden die Proteine, die im Gel enthalten sind, auf eine Membran transferiert. Dabei wird das Gel auf die Membran gelegt und beide Seiten mit Blotting-Papier, die vorher in Transferpuffer eingelegt wurden, begrenzt. Die Membran befindet sich dabei näher zur Anode, das Gel näher zur Katode. Es wird eine Spannung von 10 Volt angelegt, woraufhin die Proteine von der Katode zur Anode und somit vom Gel auf die Membran transferiert werden.

Wichtig war es, darauf zu achten, dass sich zwischen den einzelnen Lagen keine Luftblasen gebildet hatten. Dann wurde der Deckel des Systems geschlossen und die Proteinbanden konnten durch das Anlegen einer elektrischen Spannung von 10 Volt von dem Gel auf die Membran transferiert werden. Nach etwa 60 Minuten konnten die transferierten Banden dann zur weiteren Immundetektion verwendet werden.

Färbung

Zur Überprüfung des erfolgreichen Transfers der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde diese mit einer sogenannten Ponceau-Lösung angefärbt. Ponceau-Lösung enthält einen roten Azofarbstoff, der reversibel an Proteine binden kann, später jedoch mit Wasser auch wieder ausgewaschen werden kann.

Membran Blockierung und Antikörper Inkubationen

Um im weiteren Verlauf unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, wurde die Nitrocellulosemembran mit den Proteinbanden zunächst mit einem Blocking-Puffer (5% Magermilchpulver gelöst in TBST (Tris-buffered saline with Tween 20)) für ca. 1 Stunde im Schüttler (100 rpm) bei 4°C abgesättigt. Daraufhin wurde die Membran mit einem spezifischen, unkonjugierten Primärantikörper, der ebenfalls mit Blocking Puffer verdünnt wurde (Verdünnungsfaktor jeweils abhängig vom eingesetzten Antikörper), über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst 3 x kurz mit TBST gespült. Dann wurde die Membran mit TBST bedeckt und für 10 Minuten bei RT im Schüttler (100 rpm) gewaschen. Nach 10 Minuten wurde das TBST gewechselt und der Vorgang insgesamt 3 x wiederholt. Anschließend wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper behandelt. In diesem Fall war der Sekundärantikörper ein Konjugat, der mit dem Enzym HRP (Horseradish Peroxidase) markiert war, welches dem Nachweis des Primärantikörpers diente. Der Sekundärantikörper wurde also ebenfalls mit Blocking Puffer (Verdünnungsfaktor wiederum abhängig vom eingesetzten Antikörper) verdünnt und für 1 Stunde im Schüttler (100 rpm) bei RT auf die Blots gegeben. Danach folgten erneut die oben beschriebenen Waschschriffe mit TBST.

Blot-Analyse

Die Analyse des Western Blots erfolgte mittels Chemilumineszenz-Immundetektion. Dafür wurden die Blots einzeln in kleine lichtgeschützte Kästchen gegeben und mit jeweils 1 ml der zwei unterschiedlichen ECL-Reagenzien (enhanced chemiluminescence) für ca. 1 Minute inkubiert. Die HRP bewirkt eine Oxidation des darin enthaltenen Luminols, was zur Emission eines Licht-Signals führt. Dieses Signal ließ sich dann wiederum entweder auf einem Film, der in der Dunkelkammer entwickelt wurde oder durch Geräte wie beispielsweise das *ChemiDoc MP Imaging* erfassen.

3.5.2.3 Massenspektrometrie

Eine massenspektrometrische Analyse der Proteine wurde bei unserem Kooperationspartner der AG Selbach (Prof. Matthias Selbach) am Max-Dellbrück-Centrum Berlin durchgeführt.

3.5.3 Funktionelle Charakterisierung der rekombinanten Proteine

3.5.3.1 Überprüfung des Gs-Signalwegs: cAMP-Akkumulationsassay

Prinzip

Für das TSH ist bekannt, dass es verschiedene Signalwege des TSHR aktivieren kann (93, 94). Mit Hilfe des AlphaScreen cAMP-Assay kann die Aktivität des G_s - Signalwegs bestimmt werden, indem man die intrazelluläre cAMP Konzentration misst. Bei dem Assay handelt es sich um einen kompetitiven Assay. Aktiviert ein Ligand (in diesem Fall WT-TSH und die Mutanten) den TSHR, wird der G_s-Signalweg aktiviert und von den Zellen dabei endogenes cAMP synthetisiert. Dieses endogene cAMP konkurriert mit dem biotinylierten cAMP des Assays. Das Biotinmolekül des biotinylierten cAMP bindet zunächst an die Streptavidin-konjugierten Donorbeads, das cAMP Molekül dann an die anti-cAMP-Antikörper-konjugierten Akzeptorbeads. Ein Photosensitizer in den Donorbeads überträgt Energie auf umgebende Sauerstoffmoleküle, welche dann auf die Akzeptorbeads diffundieren, wenn sich diese in räumlicher Nähe (bis ca. 200 nm) befinden. Das dabei entstehende Fluoreszenzsignal wird dann detektiert (Emission 520-620nm). Endogenes cAMP bindet ebenfalls an die Akzeptorbeads, jedoch nicht an die Donorbeads, sodass es

durch fehlende räumliche Nähe zu keiner Energieübertragung auf die Akzeptorbeads und folglich auch zu keinem Fluoreszenzsignal kommt. Je mehr endogenes cAMP also in der Probe vorhanden ist, desto mehr wird das biotinylierte cAMP verdrängt und es kommt zur proportionalen Abnahme des Signals (Abbildung 3.8).

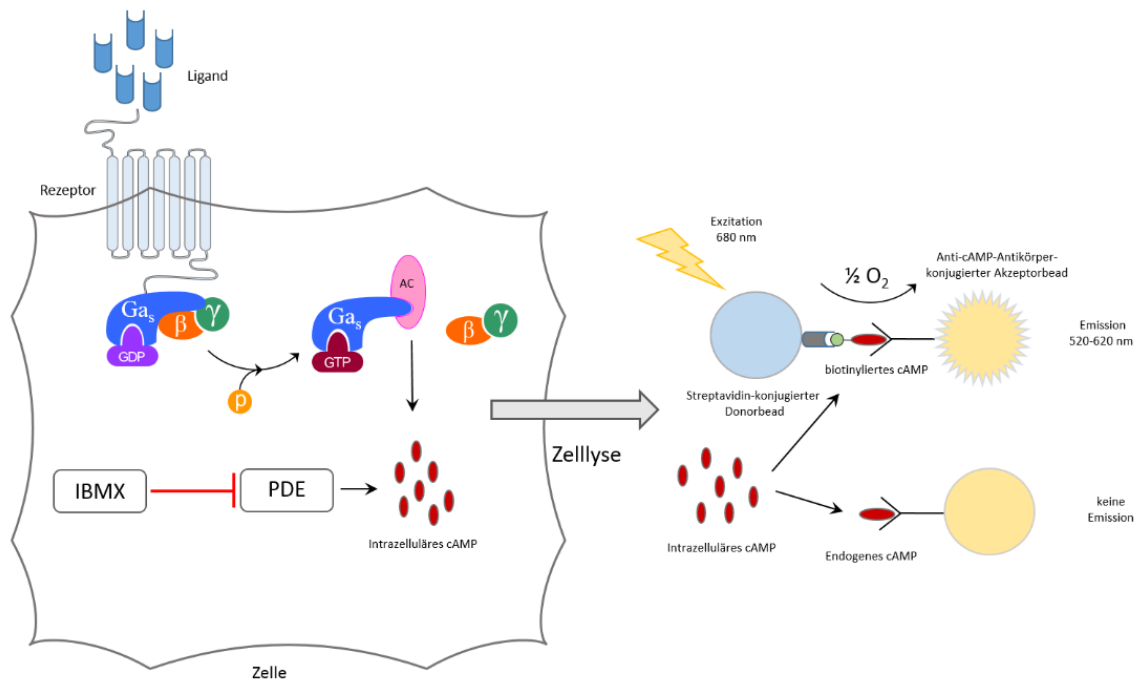


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung des AlphaSreen cAMP Assays. Der Ligand (WT-TSH und TSH-Mutanten) aktiviert den Rezeptor, infolgedessen es zu einer Konformationsänderung kommt. Dabei dissoziiert die G α -Untereinheit von der G $\beta\gamma$ -Untereinheit und die G α -Untereinheit bindet an AC. Diese sorgt für die Umsetzung von ATP zu endogenem cAMP. Endogenes cAMP wird physiologisch von der PDE abgebaut. In diesem Assay wird das durch Zugabe von IBMX verhindert und das endogene cAMP reichert sich in der Zelle an. Daraufhin wird eine Zellyse durchgeführt und es werden anti-cAMP-Antikörper-konjugierte Akzeptorbeads hinzugegeben. In einem weiteren Schritt werden dann Streptavidin-konjugierter Donorbeads und exogenes biotinyliertes cAMP hinzugegeben. Nach Exzitation kommt es dann zu einem Energietransfer von Akzeptorbeads auf Donorbeads, welches in Form von Lichtsignalen gemessen werden kann. Das endogene cAMP konkurriert um die anti-cAMP-Bindungsstellen des Akzeptors, führt jedoch nicht zu einem Energietransfer, was letztlich zu einer Abnahme der Lichtemission führt, welches durch den Assay erfasst wird. **cAMP**: cyclisches Adenosinmonophosphat; **PDE**: Phosphodiesterase; **AC**: Adenylatcyclase; **IBMX**: 3-Isobutyl-1-Methylxanthin **TSHR**: Thyreotropin-Rezeptor.

Durchführung

Der cAMP-Assay wurde mit zwei Zelllinien durchgeführt. Zunächst mit HEK293-Zellen, denen der TSHR transient transfiziert wurde. Zudem wurden FTC133-TSHR Zellen verwendet. Das sind Schilddrüsenkarzinomzellen, die den TSHR bereits stabil transfiziert hatten und die der humanen Physiologie ähnlicher sind.

HEK293-Zellen wurden an Tag 1 ausgesät und an Tag 2 des Experiments transfiziert. Da die FTC133-Zellen den TSHR bereits stabil transfiziert hatten, wurden sie an Tag 1 mit einer Dichte von 1×10^4 ausgesät und an Tag 2 stimuliert.

Für die Stimulation wurde zunächst der Stimulationspuffer mit IBMX versetzt (500 μ M), das den intrazellulären Abbau von cAMP verhindert. Die Liganden (c: ca. 20 mU/ml) wurden dann mit dem Stimulationspuffer verdünnt. Damit das IBMX in einer ausreichenden Konzentration vorlag, musste eine Verdünnung von mindestens 1:1 (Stimulationspuffer : Probe) vorliegen. Es wurden zwei Konzentrationen (10 mU/ml und 5 mU/ml) für den Assay eingesetzt. Jeweils 50 μ l des reinen Stimulationspuffers für den Basalwert und 50 μ l der Ligandenverdünnungen wurden dann in die Wells gegeben und für 45 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ stimuliert. Als Positivkontrolle wurde bTSH in den Konzentrationen 100 mU/ml und 1 mU/ml (bzw. 10, 1 und 0.1 mU/ml) mitgeführt. Der Stimulationspuffer wurde daraufhin aspiriert und jeweils 50 μ l des LI-Puffers (LO-Puffer + 500 μ M IBMX) in jedes Well gegeben. Im Schüttler konnten die Zellen dann unter dem Einfluss des Puffers bei 4°C für ca. 1-1,5 Stunden lysieren. Das Zelllysat wurde dann entweder direkt gemessen oder die Platten bei -20 °C eingefroren und der Assay am nächsten Tag beendet.

Für die tatsächliche Messung wurde zunächst eine Standardreihe gemäß des Protokolls des Kits hergestellt. Dann wurden jeweils 5 μ l der cAMP Standardreihe und der Proben in Dreifachbestimmung auf eine 384-Wellplatte übertragen. Die Platte wurde mit einer selbstklebenden Aluminiumfolie verschlossen und die Platte dann einmal kurz zentrifugiert. Da die Beads lichtempfindlich sind, erfolgten die nächsten Schritte im Dunkeln bzw. lediglich bei minimalem Lichteinfall von Grünlicht (520-560 nm). Jeweils 0,1 μ l Akzeptorbeads wurden mit 10 μ l LI-Puffer in einem Eppendorf Reaktionsgefäß verdünnt. Ein Reaktionsansatz für eine 384 Well Platte ist im Folgenden (Tabelle 3.17) dargestellt:

Tabelle 3.17: Ansatz Akzeptorbeads cAMP-Assay

Substanz	Menge
LI-Puffer	3801,6 μ l
Anti-cAMP conjugated acceptor beads	38,4 μ l
Σ	3840 μl

Mit einer Combitip Pipette wurden dann jeweils 10 μ l des Ansatzes in jedes Well pipettiert und die Platte wiederum mit der selbstklebenden Aluminiumfolie lichtgeschützt verschlossen. Die Platte wurde dann erneut kurz zentrifugiert und in eine lichtgeschützte Box gegeben, diese wurde verschlossen und die Platte darin für 30 Minuten bei RT inkubiert.

Nach ca. 20 Minuten wurde die Donorbeads-Verdünnung hergestellt. Dazu wurden pro Well 0,1 μ l Donorbeads, 10 μ l LI-Puffer und biotinyliertes cAMP (1/16 des Gesamtvolumens) pipettiert. Im Folgenden (Tabelle 3.18) ist beispielhaft ein Ansatz für 384 Wells dargestellt:

Tabelle 3.18: Ansatz Donorbeads cAMP-Assay

Substanz	Menge
LI-Puffer	3561,6 μ l
Biotinyliertes cAMP	240 μ l
Streptavidin-coated donor beads	38,4 μ l
Σ	3840 μl

Dann wurden jeweils 10 μ l der Akzeptorbeads-Verdünnung in jedes Well gegeben, die Platte erneut mit der Alufolie verschlossen und abzentrifugiert. Die Platte wurde dann wieder in die dafür vorgesehene Box gegeben und bei RT für 60 Minuten inkubiert. Die Analyse der Platte erfolgte dann mit Hilfe des Mithras *LB 940 Multimode Plate Reader* entsprechend den Angaben des Herstellers bei einer Exzitation von 680nm und einer Emission von 520 bis 620 nm. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte dann mit Hilfe des Computerprogramms *Graph Pad Prism (Version 6)*.

Die Stimulation der HEK293-Zellen erfolgte 48 Stunden nach deren transienten Transfektion mit dem TSHR entsprechend diesem Protokoll.

3.5.3.2 Überprüfung des Gq/11 und des MAPK-Signalweges: Luciferase-Reportergen-Assay

Prinzip

Für den TSHR ist bekannt, dass er neben dem Gs Signalweg auch den Gq/11 und den MAPK-Signalweg aktivieren kann. Diese beiden Signalwege können mit Hilfe eines sogenannten Luciferase-Reportergen-Assays überprüft werden. Prinzipiell wird dabei der TSHR durch den Liganden (in diesem Fall WT-TSH bzw. mutiertes TSH) aktiviert und die α -Untereinheit des G-Proteins dissoziiert von der $\beta\gamma$ -Untereinheit. Dadurch wird eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt, infolge derer Second Messenger Botenstoffe entstehen, die dann wiederum die Transkription bestimmter Response Elemente induzieren. Diese Response Elemente haben dann Reporter Gene wie beispielsweise die Luciferase *Photinus pyralis* gebunden, die ebenfalls transkribiert wird. Die Konzentration der Luciferase kann dann mit Hilfe des Assays gemessen werden und gibt somit Rückschluss auf die Aktivität des Signalwegs.

Für diese Arbeit wurden Konstrukte NFAT und SRE verwendet.

Die α -Untereinheit des G-Proteins aktiviert die PLC, die dann wiederum Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP_2) in Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) transformiert. Dann teilt sich die weitere Signalkaskade: Für den Gq/11 Signalweg, bindet das gebildete IP_3 an Rezeptoren im endoplasmatischen Retikulum (ER), was dann zur Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen in den Intrazellularraum führt. Die Ca^{2+} Ionen binden dann an das NFAT-Response Element (NFAT-RE) und aktivieren somit die Transkription der Luciferase.

Für den MAPK-Signalweg kann das DAG hingegen die Proteinkinase C (PKC) aktivieren, die dann wiederum über das Raf-Protein (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma) den ERK1/2 Signalweg (Extracellular Signal-Regulated Kinase) aktiviert. ERK 1/2 bindet dann an SRE, was ebenfalls die Transkription der Luciferase induziert (Abbildung 3.9).

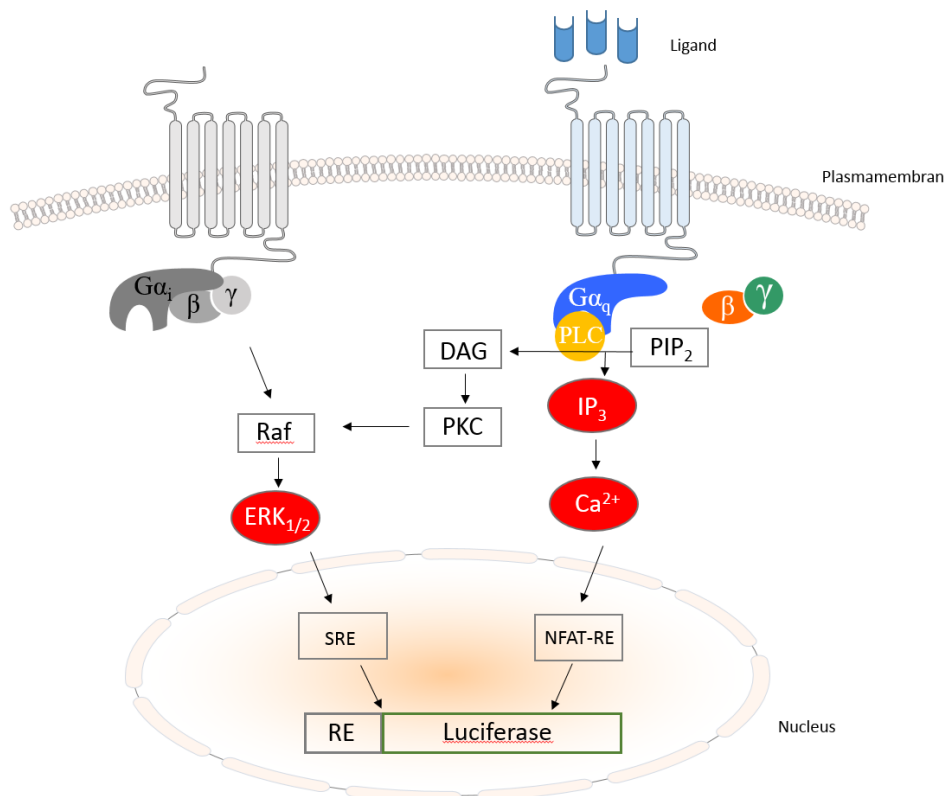


Abbildung 3.9: Schematischer Ablauf des Reportergenassays mit NFAT und SRE. Durch Bindung des Liganden (WT-TSH und TSH-Mutanten) an den Rezeptor wird dieser aktiviert und ändert seine Konformation. Dabei dissoziiert die $G\alpha_q$ – Untereinheit von der $G\beta\gamma$ – Untereinheit. Die $G\alpha_q$ – Untereinheit aktiviert die PLC, die dann PIP_2 in IP_3 und DAG umsetzt. Dann teilt sich die weitere Signalkaskade. Das IP_3 bindet an Rezeptoren im ER, infolgedessen Ca^{2+} -Ionen freigesetzt werden. Diese aktivieren das NFAT-RE, was wiederum zur Transkription der Luciferase führt. Für den MAPK-Weg aktiviert DAG, die PKC, welche dann wiederum über die Raf, die Proteinkinasen $ERK_{1/2}$ aktiviert. $ERK_{1/2}$ binden dann an SRE und induzieren damit ebenfalls die Transkription der Luciferase, welche dann mit Hilfe des Assays gemessen werden kann. **DAG**: Diacylglycerol; **PLC**: Phospholipase C; **IP3**: Inositoltriphosphat; **PKC**: Proteinkinase C; **SRE**: Serum-Response-Element; **NFAT-RE**: Nuclear factor of activated T-cells response element; **PIP2**: Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat; **Raf**: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma; **Ca²⁺**: Calcium.

Beiden Signalwegen ist dann wieder gemeinsam, dass die Luciferase mit Hilfe des Co-Substrats Magnesium, die Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin, CO_2 , Pyrophosphat (PPi), Adenosinmonophosphat (AMP) und Licht unter ATP und Sauerstoffverbrauch katalysiert. Die dabei entstehende Lichtemission kann dann gemessen werden und spiegelt sehr sensitiv die Aktivität des entsprechenden Signalwegs wider.

Durchführung

Für den Versuch wurden die HEK293-Zellen an Tag 1 ausgesetzt und 24 Stunden später mit der TSHR Plasmid DNA, sowie der Plasmid DNA der Reportergene transfiziert. 48 Stunden später erfolgte dann die Stimulation mit den unterschiedlichen Liganden. Dafür wurde das alte Medium abgenommen und die Liganden in verschiedenen Konzentrationen (10 mU/ml und 5 mU/ml) in 30 µl Trafomedium verdünnt und dies in die jeweiligen Wells pipettiert und für 6 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Als Positivkontrolle wurde bTSH in den Konzentrationen 10 mU/ml, 1 mU/ml und 0,01 mU/ml mitgeführt. Nach 6 Stunden wurde das Medium entfernt und 50 µl 1 x Passive Lysis Buffer (PLS) pro Well hinzugefügt und für 15 Minuten bei RT im Schüttler lysiert. Daraufhin wurde die Platte entweder bei -20 °C eingefroren oder direkt gemessen.

Für die Messung wurden jeweils 10 µl der lysierten Zellen auf schwarze 96-Wellplatten übertragen. Das Plattenlesegerät Berthold Mithras LB 940 wurde zunächst mit Wasser und Ethanol gewaschen. Dann wurden automatisch 40 µl des Luciferase Assay Substrats hinzugefügt und im Folgenden die Lichtemission bei 560 nm gemessen.

3.5.3.3 IP-One ELISA

Prinzip

Der IP-One (Inositolmonophosphat) ELISA von Cisbio ist ein kompetitiver Immunoassay, der ebenfalls als funktioneller Assay zur Bestimmung der Aktivität des Gq/11 Signalweges dient. Bindet TSH oder einer der Mutanten an den TSHR (G-Protein gekoppelter Rezeptor), dissoziiert die Gα Untereinheit von der Gβγ-Untereinheit und aktiviert die PLC. Diese spaltet dann PIP₂ in IP₃ und DAG. IP₃ bewirkt eine Ca²⁺ Freisetzung aus dem ER, bevor es nach einer kurzen Halbwertszeit von etwa 30 Sekunden in Inositolbiphosphat (IP₂) und schließlich in IP₁ umgewandelt wird. Dem Assaymedium wird dann Lithiumchlorid beigegeben, sodass IP₁ nicht in Inositol degradieren kann. Somit akkumuliert IP₁, welches dann mit Hilfe des kompetitiven Immunoassays gemessen werden kann. Das entstandene IP₁ und hinzugegebenes IP₁, das mit Horseradish Peroxidase (HRP) konjugiert ist, konkurrieren um die limitierten Bindungsstellen der anti-IP₁-monoklonalen Antikörper. Es wird dann ein HRP-Substrat hinzugegeben, welches zu einem Farbumschlag führt, der bei 450 nm

gemessen werden kann. Ein geringer Farbumschlag spricht für eine hohe Aktivität des Signalweges, da viel IP1 entstanden ist, welches das IP1-HRP verdrängt hat. Im Gegensatz dazu zeigt ein hoher Farbumschlag eine geringe Aktivität des Signalweges an.

Durchführung

An Tag 1 des Experiments wurden FTC133-TSHR mit einer Konzentration von 8×10^5 Zellen pro Well in 96 Well-Platten ausgesät und 200 μ l Vollmedium hinzugegeben und über Nacht inkubiert. An Tag 2 wurden die Liganden entsprechend dem Versuchsaufbau mit Stimulationspuffer verdünnt. Wichtig war es, dass die Verdünnungen stets eine Lithiumdchloridkonzentration von 50 mM aufwiesen, um einen Abbau von IP1 zu verhindern. Das Vollmedium wurde dann aus den Wells aspiriert, durch 30 μ l der verdünnten Liganden ersetzt und die Platten schließlich bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank für eine Stunde inkubiert. Danach wurden 30 μ l des Lysispuffers in die Wells gegeben und weitere 30 Minuten bei gleichen Bedingungen inkubiert. Dann folgte der Transfer von jeweils 50 μ l des Überstandes in die beschichteten ELISA-Platten. Die Platten enthielten neben den Proben, Standardwerte, Kontrollwerte im Sinne einer unspezifischen Bindung (NSB), eine Leerprobe (Blank) und die Bestimmung der Totalaktivität (TA). Die Reagenzien und Mengen sind dem Protokoll des Kits zu entnehmen. Die Platte wurde dann 3 Stunden bei RT auf einem Vertikalschüttler (200 rpm) inkubiert. Danach folgte ein Waschschrift mit 250 μ l des mitgelieferten Waschpuffers. Dieser Waschschrift wurde 5 x wiederholt, bevor jedem Well 100 μ l des Chromogens Tetramethylbenzidin (TMB) hinzu pipettiert wurde. Zusätzlich wurde den Wells, die die Totalaktivität bestimmen sollten, 5 μ l IP1-HRP-Conjugate hinzugefügt. Es folgte daraufhin eine weitere Inkubation von 20-30 Minuten bei RT in Dunkelheit. Zuletzt wurde in jedes Well 100 μ l der Stopplösung hinzugegeben und innerhalb von 2 Stunden die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm mit Hilfe des *Anthos Plattenreaders*® gemessen.

3.5.4 Viability Assay

Prinzip

Um zu überprüfen, ob die Ergebnisse der funktionellen Charakterisierung reliabel sind und die Zellen nicht durch die Transfektion oder Stimulation grob beschädigt wurden

und infolgedessen abstarben, wurde ein sogenannter Viability Assay durchgeführt. Der *CellTiter96®AQueos One Solution Assay* ist eine kolorimetrische Methode zur metabolischen Aktivität von Zellen und folglich zum Nachweis ihrer Lebensfähigkeit. Der Assay enthält eine Tetrazolium Komponente [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium (MTS) und das Elektrongekoppelte Reagenz Phenanzin Ethosulfat (PES). PES erhöht dabei die chemische Stabilität und formt mit MTS eine stabile Lösung. Diese wird von Zellen chemisch reduziert, was zu einem Farbumschlag führt, welcher bei einer Absorption von 490 nm gemessen werden kann. Die Reduktion ist vor allem von Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) in metabolisch aktiven Zellen abhängig. Sind die Zellen bereits zugrunde gegangen, bleibt dieser Farbumschlag folglich aus.

Durchführung

Zur Überprüfung, ob die Zellen durch die Transfektion geschädigt wurden, wurden sie an Tag 1 wie in 3.3.6.1 beschrieben, in 96 Well Platten ausgesät, an Tag 2 transfiziert und an Tag 3 ihre metabolische Aktivität mit Hilfe des Assays bestimmt. Dafür wurde das *CellTiter96®AQueos One Solution Reagenz* im Wasserbad bei 37 °C vorsichtig aufgetaut. Dann wurden jeweils 20 µl des Reagenzes auf das Medium in jedem Well gegeben und die Absorption bei einer Wellenlänge von 490 nm mit Hilfe des *Anthos Plattenreaders®* im Abstand von 30 Minuten über 3 Stunden gemessen.

Um einen Einfluss der Stimulation mit den Liganden auf die Lebensfähigkeit der FTC133-TSHR ausschließen zu können, wurden die Zellen wie unter 3.3.6.1 beschrieben, ausgesät und am nächsten Tag mit den Liganden gemäß des cAMP Akkumulations-Assay Protokolls für 45 Minuten stimuliert. Danach wurden die Ligandenverdünnungen abgesaugt und 100 µl PBS dazugegeben ebenso wie 20 µl des *CellTiter96®AQueos One Solution Reagenz*. Die Absorption wurde dann wiederum bei 490 nm gemessen.

3.6 Statistik

Für die statistische Analyse wurde die Software *Graph Pad Prism V.6* verwendet. Eine deskriptive Statistik wurde für alle Variablen durchgeführt und umfasste Mittelwerte,

Standardabweichungen und Standardfehler. Zudem wurde im Rahmen einer Varianzanalyse ein parameterfreier Kruskal-Wallis Test mit multiplen Vergleichen verwendet, um Unterschiede zwischen dem Basalwert und der Aktivierung des TSHR durch WT-TSH oder die jeweiligen TSH Mutanten zu bewerten. Wurde ein direkter Vergleich von zwei Variablen durchgeführt, wurde der Mann-Whitney-U Test verwendet. Statistische Signifikanz wurde anhand des p-Werts bestimmt. Dabei galt * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ und *** $p \leq 0.001$.

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Daten

4.1.1 Analyse der bisherigen phänotypischen Befunde bei Patienten mit der TSHB C105Vfs114X Mutation

In dieser Arbeit sollte zunächst durch eine Literaturrecherche analysiert werden, wie häufig die klinische Symptomatik einer schweren Hypothyreose bei Patienten mit **C105Vfs114X** Mutation auch bei anderen publizierten Fällen beschrieben war. Besonders im Fokus lagen dabei ihre Symptome, die Entwicklung der TSH-Werte, die Ergebnisse des Neugeborenscreenings und eventuelle Schilddrüsenerkrankungen in der Familie.

Leider waren die Fallbeschreibungen in vielen Fällen sehr ungenau und lückenhaft (Tabelle 4.1). Ein systematischer Vergleich war anhand der Publikationen deswegen nicht möglich. Aus diesem Grund wurde ein Fragebogen entwickelt (siehe Anhang), der die publizierten Fälle noch einmal genauer erfassen sollte.

Dieser Fragebogen wurde an die Autoren der publizierten Fallberichte geschickt. Leider war die Resonanz sehr gering. Nur einer der 14 angeschriebenen Autoren, schickte den Fragebogen ausgefüllt mit Informationen zu 5 Patienten zurück. Möglicherweise liegen die Informationen den Autoren auch nicht in ausreichender Qualität vor, da sie nicht auch die behandelnden Ärzte waren. Somit war es nicht möglich, ein genaues Zeitfenster für einen effektiven Therapiebeginn bei dieser Erkrankung zu bestimmen. Auch die Einschätzung des Ausmaßes der kognitiven Entwicklung war nicht präzise möglich, da dies nicht durch Ergebnisse einer standardisierten Testung mit Angabe eines Intelligenz- oder Entwicklungsquotienten hinterlegt wurde. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass Kinder, deren Substitution mit L-Thyroxin bereits in den ersten Lebensstagen begann, in ihrer weiteren Entwicklung keine signifikanten Defizite hinsichtlich der motorischen und mentalen Entwicklung aufwiesen. Deren Outcome ist somit vergleichbar mit Neugeborenen mit einer schweren Hypothyreose, z.B. einer Aplasie, die im Neugeborenscreening diagnostiziert werden. Bei verzögerter Diagnosestellung von meist Monaten kam es jedoch häufig zu erheblichen Defiziten der kognitiven Entwicklung. So gab es einen

Patienten, bei dem die Mutation **C105Vfs114X** erst im Alter von 3 Monaten und 6 Tagen nachgewiesen wurde. Seine zentrale Hypothyreose wurde daraufhin mit L-Thyroxin behandelt. Ein Entwicklungstest (Wechsler Intelligence Scale for Children WISCIII) dieses Patienten mit 11 Jahren zeigte einen IQ von 59 (Anhang Fragebogen: Patient 5). Allerdings gab es auch drei Berichte, die auch bei späterem Behandlungsbeginn (2,5 Monate (Patient 7a Tabelle 4.1), 4 Monate (Patient 8a Tabelle 4.1) und 5 Monate (Patient 3a Tabelle 4.1)) eine normale Entwicklung berichteten (44, 46, 47). Bei einigen weiteren Publikationen ist das Outcome nicht sicher geklärt. Aufgrund der geringen Fallzahl und der ungenauen Angaben des Therapiebeginns konnte nicht sicher abgeleitet werden, wann spätestens die Substitutionstherapie bei Mutationsträgern initiiert werden muss, um eine Beeinträchtigung der Entwicklung zu vermeiden. Der Vergleich der publizierten Patienten konnte daher zu keiner allgemeingültigen Aussage führen. Es lässt sich jedoch aus der Literaturrecherche und Befragung der Autoren ableiten, dass es bei Patienten mit **C105Vfs114X** Mutation vergleichbar mit den Patienten mit angeborener Schilddrüsendysgenese essentiell ist, eine frühe Diagnose zu stellen und eine Substitution mit Schilddrüsenhormonen einzuleiten, um mit Sicherheit Folgeschäden zu vermeiden. Dies ist eine wichtige Erkenntnis, da bislang davon ausgegangen wurde, dass eine isolierte zentrale Hypothyreose aufgrund eines TSH- Mangels nur eine milde Hypothyreose hervorruft, die nicht mit schweren Folgeschäden der mentalen Entwicklung einhergeht.

Tabelle 4.1: Übersicht über die publizierten Patienten mit der Mutation C105Vfs114X

Pat	Alter bei Diagnose	Klinische Symptome	T4/ft4 bei Diagnose	TSH bei Diagnose	Hypothyreose bei Geschwistern /Eltern	Entwicklungsalter bei Diagnose	Entwicklung	Schule	Referenz
1a	-	„Typische Symptome“	T4: 0,5 µg/dl	0,8 mU/l	Mutter: lodmangel-Struma	-	-	-	Medeiros-Neto et al. 1996
1b	-	„Typische Symptome“	T4: 0,5 µg/dl	0,02 mU/l	Mutter: lodmangel-Struma	-	-	-	Medeiros-Neto et al. 1996
1c	-	„Typische Symptome“	T4: 0,5 µg/dl	0,3 mU/l	Mutter: lodmangel-Struma	-	-	-	Medeiros-Neto et al. 1996
2a		„Typische Symptome“	T4: 0,5 µg/dl	0,1 mU/l	nein	-	-	-	Medeiros-Neto et al. 1996
3a	5 Mo.	Muskelhypotonie, Makroglossie, Umbilikalhernie, offene posteriore Fontanelle, heisernes Schreien	n.d.	n.d.	nein	Knochenalter verzögert (3 Mo.)	Nach 6 Mo L-Thyroxingabe, Wachstum/ Gewicht entlang der 3. Perzentile	-	Doeker et al. 1998
4a	14 Tage	Ikterus, trockene Haut, Muskelhypotonie, Makroglossie, Lethargie, große offene Fontanellen, Verstopfungen, Schwierigkeiten beim Füttern	T4: 10,2 mmol/L	0,07 mU/L	nein	-	Normale Entwicklung bis auf Innenohrschwerhörigkeit	Normale Schule	Biebermann et al. 1999

Fortsetzung Tabelle 4.1: Übersicht über die publizierten Patienten mit der Mutation C105Vfs114X

Pat	Alter bei Diagnose	Klinische Symptome	T4/ft4 bei Diagnose	TSH bei Diagnose	Hypothyreose bei Geschwistern/ Eltern	Entwicklungsalter bei Diagnose	Entwicklung	Schule	Referenz
5a	2 Mo	Muskelhypotonie, Umbilikalhernie, heisernes Schreien, Schwellungen	T4: 0,36 µg/dl	0,03 mU/L	nein	-	Wachstum und Pubertät normal, leichte mentale retardiert	-	Heinrichs et al. 2000
6a	4 Mo	Makroglossie, Gedeihstörung/ Wachstumsretardierung, Umbilikalhernie, prolongierter Ikterus	n.d.	0,15 mU/l	Geschwisterkind betroffen (6b)	-	Mentale Retardierung	-	Brumm et al. 2002
6b	Geburt	Keine	n.d.	0,06 mU/ml	Geschwisterkind betroffen (6a)	-	Normale Entwicklung	-	Brumm et al. 2002
7a	2,5 Mo	Prolongierter Ikterus, Fütterprobleme, Gedeihstörung, erhöhte Leberenzyme	n.d.	0,3 mU/ml	Geschwisterkind betroffen (7b)	-	Verzögerte Entwicklung im Kleinkindalter, mit 9 Jahren unauffällig IQ 97	Normal	Brumm et al. 2002
7b	Geburt	Keine	ft4: 2 ng/l	0,02 mU/ml	Geschwisterkind betroffen (7a)	-	Normale Entwicklung	Normal	Brumm et al. 2002
8a	4 Mo	„Träge und dicklich“	-	-	Geschwisterkind betroffen (8b)	-	Normales Wachstum, gute Schulleistungen	-	McDer-mott et al. 2002
8b	Geburt	Keine	-	-	Geschwisterkind betroffen (8a)	-	-	-	McDer-mott et al. 2002
9a	1,5 Mo	Trockene Haut, Umbilikalhernie, leichte Makroglossie, grobe Gesichtszüge	ft4: 1,8 pmol/l	0,02 mU/ml		Knochenalter 34. SSW	Normal	-	Dela-doëy et al. 2003
10a	3 Mo	Gedeihstörung, Makroglossie, Muskelhypotonie, Umbilikalhernie, kleiner VSD, Fußödeme	T4: 12 nmol/l ft4: 2,5 pmol/l	0,03 mU/ml		Knochenalter 30. SSW	Größenwachstum entlang der 3. Perzentile, Gewicht entlang der 10. Perzentile, leichte mentale Retardierung, ADHS	Sonderunterricht	Deladoëy et al. 2003
11a	Geburt	Keine (durch NG-Screening mit T4 und TSH)	T4: 2,7 µg/dl	0,2 µU/ml	Geschwisterkind betroffen (11b)	-	Normal	-	Felner et al. 2004
11b	Geburt	Keine (durch NG-Screening mit T4 und TSH)	T4: 1,2 µg/dl	< 0,1 µU/ml	Geschwisterkind betroffen (11a)	-	Normal	-	Felner et al. 2004
12a	8,9 Jahre	-	T4: 1,4 µg/dl	0,04 mU/ml	-	-	-	-	Domené et al. 2004
13a	3 Mo	„Klinische Zeichen einer Hypothyreose“	T4: < 0,1 µg/dl ft4: 0,26 ng/dl	0,07 mU/ml	-	-	-	-	Domené et al. 2004
14a	3,7 Mo	„Klinische Zeichen einer Hypothyreose“	T4: < 0,1 µg/dl ft4: 0,10 ng/dl	0,77 mU/ml	-	-	-	-	Domené et al. 2004
15a	7 Mo	„Klinische Zeichen einer Hypothyreose“	T4: 4,6 µg/dl ft4: 0,06 ng/dl	0,10 mU/ml	-	-	-	-	Domené et al. 2004
16a	3 Mo	„Klinische Zeichen einer Hypothyreose“	T4: < 0,1 µg/dl	0,19 mU/ml	-	-	-	-	Domené et al. 2004
17a	3 Mo	„Klinische Zeichen einer Hypothyreose“	T4: < 0,1 µg/dl ft4: 0,20 ng/dl	0,80 mU/ml	-	-	-	-	Domené et al. 2004
18a	1,5 Mo	„Klinische Zeichen einer Hypothyreose“	T4: < 0,1 µg/dl	0,21 mU/ml	-	-	-	-	Domené et al. 2004
18b	1 Mo	„Klinische Zeichen einer Hypothyreose“	T4: < 0,1 µg/dl < 0,06 ng/dl	0,03 mU/ml	-	-	-	-	Domené et al. 2004
19a	1 Mo	Lethargie, Obstipation, Gedeihstörung	ft4: < 2,6 pmol/l	> 0,06 mU/l	-	-	Normales Wachstum und Entwicklung	-	Morales et al. 2014
20a	3 Mo	Prolongierter Ikterus, Muskelhypotonie, Makroglossie und Hypothermie	ft4: n.d.	n.d.	-	Knochenalter eines Neugeborenen	-	-	Karges et al. 2004
21a	Geburt	Makroglossie, trockene Haut, heisernes Schreien	T4: 7,59 pmol/l	0,013 mU/l	Geschwisterkind betroffen (3a)	-	Normale Entwicklung	-	Karges et al. 2004

Fortsetzung Tabelle 4.1: Übersicht über die publizierten Patienten mit der Mutation C105Vfs114X

Pat	Alter bei Diagnose	Klinische Symptome	T4/ft4 bei Diagnose	TSH bei Diagnose	Hypothyreose bei Geschwistern /Eltern	Entwicklungsalter bei Diagnose	Entwicklung	Schule	Referenz
22a	3 Mo	Makroglossie, Muskelhypotonie, Entwicklungsverzögerung	T4: 59 nmol/l	0,1 mU/ml	Geschwisterkind compound heterozygot	Knochenalter mit 20 Monaten 14 Monate zurück	Mentale Retardierung (IQ 68)	-	Karges et al. 2004
23a	2 Mo	Ikterus, Fütterprobleme, trockene Haut, Umbilikalhernie, Obstipation, große offene posteriore Fontanelle, Muskelhypotonie, heiseres Schreien	ft4: 6,4 pmol/l	23,8 µU/ml	Mutter Thyreoidektomie aufgrund eines Struma, Vater Struma	-	Leichte mentale Retardierung	-	Partsch et al. 2005
24a	2 Mo	Ikterus, Obstipation, Muskelhypotonie	ft4: 4,24 pmol/l	0,03 mU/l	Geschwisterkinder betroffen (24b und 24c)	-	Normales Größenwachstum	-	Ramos et al. 2010
24b	1 Mo	Ikterus, Obstipation	< 2,5 pmol/l	1,9 mU/l			Normales Größenwachstum	-	Ramos et al. 2010
24c	Geburt	keine	2,5 pmol/l	0,1 mU/l			Normales Größenwachstum	-	Ramos et al. 2010
25a	5 Wo	Somnolenz, Obstipation, trockene Haut	T4: < 10 nmol/l	-	Geschwisterkind betroffen 25b	-	Signifikante Beeinträchtigung des Sprechens und Hörens; Größenwachstum normal	Normale Schule, aber mit Nachhilfe	Nicholas et al. 2017
25b	Geburt	-	ft4: 6,5 pmol/l	< 0,05 mU/l	Geschwisterkind betroffen 25a	-	Normale Entwicklung	-	Nicholas et al. 2017

4.1.2 Beschreibung der Berliner Patienten

Zwei Patienten mit der in dieser Arbeit untersuchten Mutation **C105Vfs114X** wurden an der Charité Universitätsmedizin Berlin von Frau Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich und dem Team der Experimentellen Pädiatrischen Endokrinologie diagnostiziert und behandelt sowie deren Fälle publiziert (46, 53). Der erste Patient wurde am 14. Lebenstag bei Verdacht auf eine Infektion beziehungsweise differentialdiagnostisch auf eine Stoffwechselerkrankung auf die Neonatologie aufgenommen (Abbildung 4.1). Die Schwangerschaft, sowie die Geburt (41. SSW) des eutrophen Reifegeborenen (3435 g; 51 cm) waren unauffällig. Bei der Mutter war keine Schilddrüsenerkrankung bekannt, ebenso erhielt sie während der Schwangerschaft keine Iodsubstitution oder Medikamente, die Iod enthielten. Am Tag 7 wurde der Patient trotz dokumentierter Hyperbilirubinämie, einem verminderten Muskeltonus und Probleme beim Füttern nach Hause entlassen. Dort entwickelte er dann in der zweiten Lebenswoche Obstipationen, er war lethargisch und die Probleme beim Füttern nahmen zu. Der behandelnde Kinderarzt vermutete eine Hypothyreose und erfragte daraufhin den TSH-Wert im Vollblut des Neugeborenen-Screenings. Dieser war mit 1.3 mU/L im Referenzbereich. Am 14. Lebenstag wurde der Patient dann mit Zeichen einer ausgeprägten Hypothyreose (Ikterus, trockener Haut, muskulärer Hypotonie, Makroglossie, Lethargie und großer offener Fontanelle) aufgenommen (53).



Abbildung 4.1: Säugling mit lebensbedrohlicher kongenitaler Hypothyreose. Der 14 Tage alte Patient, weist die Mutation **C105Vfs114X** im *TSHB* Gen auf. Neben einer Lethargie, einer Trinkschwäche, einer nicht ausreichenden Gewichtszunahme, fällt hier besonders die Makroglossie auf. Abbildung dankenswerterweise von Prof. Grüters-Kieslich nach Genehmigung der Eltern zur Verfügung gestellt.

Tabelle 4.2: Serum Laborparameter von Patient 1 mit C105Vfs114X Mutation am 14. Lebenstag

Laborparameter (Serum)	Messwert	Referenzbereich
T4	10,2 nmol/l	116 – 285 nmol/l
T3	0,46 nmol/l	1.2 – 2.6 nmol/l
TSH	0,07 mU/l	0.2 – 5 mU/l
Bilirubin	172 µmol/l	< 22,2 µmol/l

Zusätzlich zu der in Tabelle 4.2 dargestellten Laborparameter wurden das Wachstumshormon, das Prolaktin, IGF-1, sowie der Cortisolspiegel bestimmt. Diese Messwerte lagen im Referenzbereich. Die Sonographie der Schilddrüse zeigte eine verkleinerte Schilddrüse (0,6 ml) mit normalem Schilddrüsengewebe in normaler Position. Der Ultraschall des ZNS war unauffällig. Aufgrund der Zusammenschau von Klinik und Labor wurde eine Mutation im *TSHB* Gen vermutet, die zu einer zentralen Hypothyreose führt und dementsprechend eine Sequenzierung des *TSHB* Gens durchgeführt. Diese Analyse bestätigte den Verdacht und zeigte die Mutation **C105Vfs114X**. Beide Eltern und Großmütter waren heterozygot für diese Mutation. Eine Substitutionstherapie wurde unverzüglich begonnen. Darunter entwickelte sich der Patient hinsichtlich Motorik und Kognition unauffällig und besuchte eine normale Schule. Eine Innenohrschwerhörigkeit wurde erst mit 2 Jahren entdeckt. Zu diesem

Zeitpunkt war nicht bekannt, dass auch zentrale Hypothyreosen ebenso wie primäre kongenitale Hypothyreosen zu Innenohrschwerhörigkeit führen können.

Die zweite Patientin, ein Mädchen, ist das erste Kind nicht-konsanguiner Eltern (Abbildung 4.2 und Tabelle 4.3). Sie wurde mit 4 Monaten in kritischem Zustand ins Krankenhaus eingeliefert und wies Symptome einer schweren kongenitalen Hypothyreose auf.



Abbildung 4.2: Säugling mit schwerer kongenitaler Hypothyreose. Auch dieser 4-Monate alte Säugling ist Träger der Mutation **C105Vfs114X** und weist Symptome einer schweren Hypothyreose auf. Besonders auffällig sind die Makroglossie, der prolongierte Ikterus, die Umbilikalhernie, sowie die Wachstumsretardierung des Säuglings. Abbildung dankenswerterweise von Prof. Grüters-Kieslich nach Genehmigung der Eltern zur Verfügung gestellt.

Tabelle 4.3: Serum Laborparameter von Patientin 2 mit C105Vfs114X Mutation mit 4 Monaten

Laborparameter (Serum)	Messwert	Referenzbereich
T4	0,8 µg/dl	8,9 – 22 µg/dl
T3	0,3 ng/ml	1,2 – 2,6 ng/ml
TSH	0,15 mU/l	0,73 – 8,35 mU/l

Die Sonographie der Schilddrüse zeigte eine unauffällige Schilddrüse hinsichtlich Größe und Position. Die Behandlung des Mädchens mit L-Thyroxin wurde schnell begonnen, worunter sich Schilddrüsenhormone normalisierten. Bei klinischem Verdacht auf eine Mutation im *TSHB* Gen wurde eine Genanalyse durchgeführt, welche die Mutation **C105Vfs114X** bestätigte. Bei der Stammbaumanalyse zeigte sich, dass beide Eltern heterozygot waren sowie der Großvater mütterlicherseits und die Großmutter väterlicherseits (46). Diese Patientin wurde so spät detektiert, dass die T4

Substitution Folgeschäden im Sinne einer mentalen Retardierung nicht vollständig verhindern konnte.

4.2 Überblick über experimentelle Daten

Aufgrund dieses ausgeprägten klinischen Phänotyps sollte in dieser Arbeit der zugrundeliegende molekulare Mechanismus und dessen funktionelle Auswirkungen auf den TSHR untersucht werden. Die zwei Haupthypothesen waren, dass der verkürzte oder der veränderte C-Terminus inklusive der Substitution von Cystein durch Valin an der Position 105 und die daraus resultierende veränderte Tertiärstruktur/Quartärstruktur des Proteins zu einer veränderten Signalisierung am Rezeptor führt. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob möglicherweise ein spezifischer Pathomechanismus, beispielsweise im Sinne eines invers-agonistischen Effekts des Liganden auf den TSHR, vorliegt, der dessen Basalaktivität im Gs Signalweg absenkt. Zunächst wurden dafür ausgewählte Konstrukte generiert und die Proteine in CHO-Zellen exprimiert. Zusätzlich wurde versucht, die rekombinanten Proteine in Insektenzellen herzustellen, da erwartet wurde, damit eine wesentlich größere Ausbeute an Protein zu erhalten. Es zeigten sich jedoch Probleme bei der Quantifizierung der hergestellten Proteine: Für die CHO-Zellen ließ sich lediglich die Menge des WT-TSH bestimmen, für das TSH aus Insektenzellen gelang dies mit keiner der zur Verfügung stehenden Methoden. Somit wurde die Produktion in Insektenzellen verworfen. Da es ebenfalls Probleme gab, das mutierte TSH zu quantifizieren, wurde eine neuere Methode eingesetzt, die die Klonierung in den sogenannten AmCyan-P2A-mCherry Vektor durch unseren Kooperationspartner einschloss (99). Im Zuge der erneuten Proteinexpression wurde dann auch die Transfektionseffizienz von CHO und HEK293-Zellen verglichen (siehe 4.4.3). Die HEK293-Zellen wiesen eine wesentlich bessere Transfektionsrate auf, sodass beschlossen wurde, weiter mit dieser Zelllinie zu arbeiten. Die Proteinexpression erfolgte analog zu der Expression in CHO-Zellen. Ebenso die Aufkonzentrierung der Proben. Letztlich wurde das WT-TSH sowie die hergestellten Mutanten hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Signalwegen (Gs-, Gq/11- und MAPK-Signalweg) mit unterschiedlichen Assays funktionell charakterisiert. Ein Überblick über die Vorgehensweise und die Ergebnisse sind im Folgenden (Abbildung 4.3) schematisch dargestellt und in den folgenden Unterkapiteln ausführlich beschrieben.

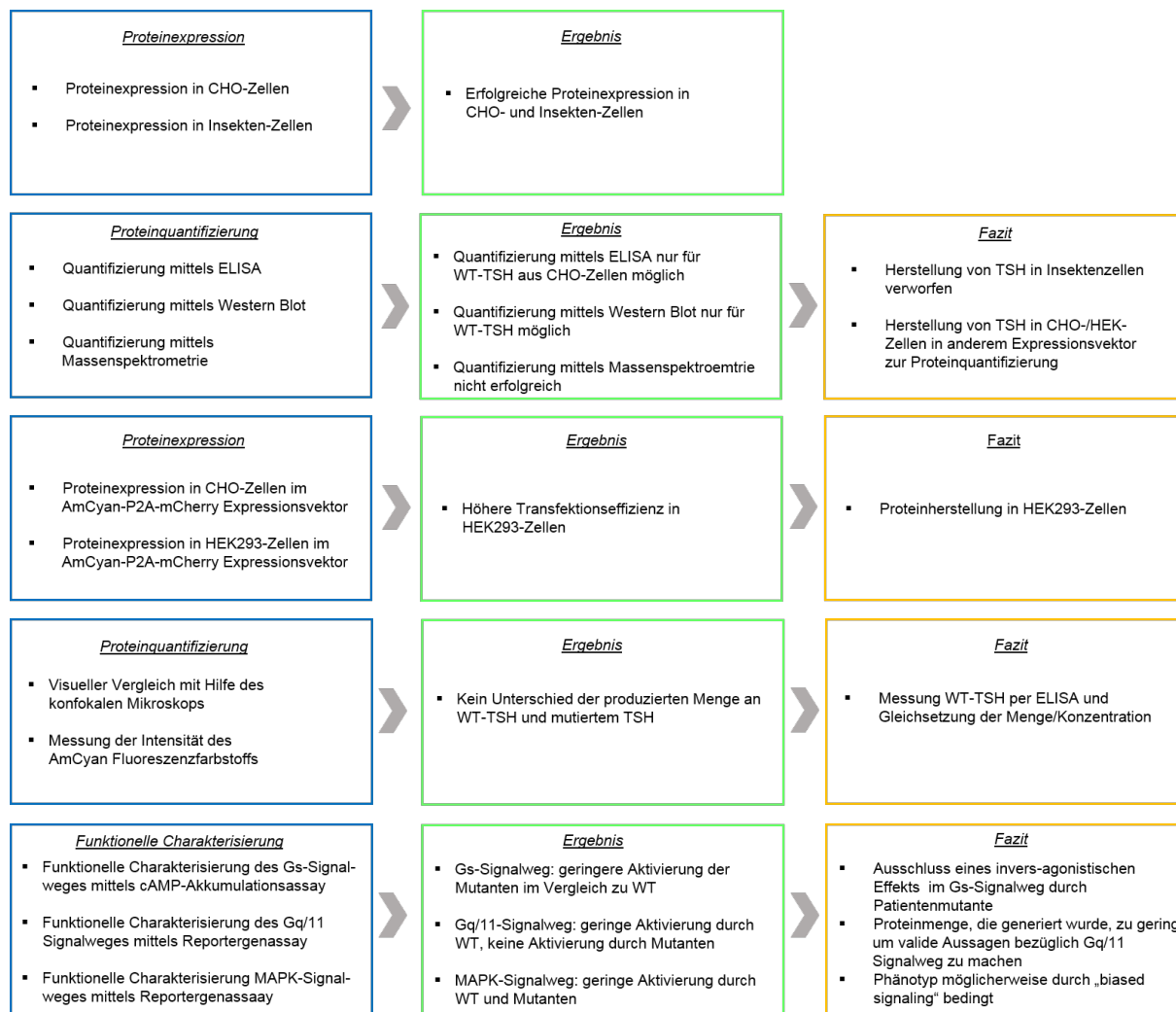


Abbildung 4.3: Abbildung über die experimentelle Vorgehensweise, Ergebnisse und Auswirkungen. Zunächst erfolgte die Proteinexpression in unterschiedlichen Zellsystemen. Bei der Quantifizierung der Proteinmenge zeigten sich erhebliche Probleme, sodass die Klonierung in einen anderen Vektor sowie eine erneute Proteinexpression mit folgender Proteinquantifizierung durchgeführt wurde. Im Anschluss wurde WT-TSH sowie mutiertes TSH funktionell charakterisiert. **TSH:** Thyroidea-stimulierendes Hormon; **WT:** Wildtyp; **ELISA:** Enzyme-linked Immunosorbent Assay

4.3 Optimierung der Transfektionseffizienz

4.3.1 Bestimmung der eingesetzten DNA-Menge

Zunächst sollte die optimale DNA-Menge für die Transfektion ermittelt werden. Ist die eingesetzte Menge zu gering, führt dies zu einer geringen Transfektionseffizienz und folglich zu einer geringen Proteinexpression. Eine zu hohe Menge DNA führt über eine Schädigung der Zellen ebenfalls zu einer verminderten Transfektionseffizienz und

Proteinexpression. Aus der Literatur ist zudem bekannt, dass die α - Untereinheit physiologisch im Überfluss vorkommt und auch für rekombinante Herstellung von hTSH konnte gezeigt werden, dass ein Verhältnis von 3:1 (α : β – Untereinheit DNA) zu einer verbesserten Proteinexpression führt (106). Aus diesem Grund wurden verschiedene DNA-Mengen im Verhältnis von 3:1 getestet (Tabelle 4.4) und die hergestellte Proteinmenge anschließend mit Hilfe eines kommerziellen ELISAs bestimmt.

Folgende Konzentrationen wurden für 2×10^6 Zellen in 10 cm Platten getestet:

Tabelle 4.4: Vergleich der eingesetzten DNA-Mengen

α -Untereinheit	β -Untereinheit
3 μ g Plasmid-DNA	1 μ g Plasmid-DNA
30 μ g Plasmid-DNA	10 μ g Plasmid-DNA
45 μ g Plasmid-DNA	15 μ g Plasmid-DNA

Dabei zeigte sich sowohl mikroskopisch als auch im später durchgeführten TSH-ELISA, dass mit der geringsten Konzentration von $3\mu\text{g}/1\mu\text{g}$ nur wenige Zellen transfiziert wurden, während bei der höchsten Konzentration von $45\mu\text{g}/15\mu\text{g}$ zwar viele Zellen transfiziert wurden, jedoch auch viele zugrunde gingen. Die mittlere Konzentration von $30\mu\text{g}/10\mu\text{g}$ zeigte hingegen mikroskopisch die höchste Transfektionseffizienz, als auch die höchste Ausbeute des rekombinanten WT-TSH in der Messung mit dem ELISA. Somit wurde mit dieser Konzentration weiter verfahren und die DNA-Menge an die Anzahl der verwendeten Zellen in den jeweiligen Experimenten angepasst.

4.4 Bestimmung der TSH-Konzentration

4.4.1 Bestimmung mittels ELISA

Die Herstellung von rekombinanten humanen TSH erfolgte zunächst in CHO- und Insektenzellen. WT und mutierte DNA wurde in den pcDNA3 Vektor bzw. pFastBacDual Vektor kloniert. Aufgrund von Problemen bei der Quantifizierung erfolgte die Klonierung später auch in den AmCyan-P2A-mCherry Vektor und die Proteinexpression in HEK293-Zellen. Die Konzentrationen des rekombinanten

hergestellten WT-TSH aus CHO- und HEK293-Zellen konnte mit einem kommerziellen ELISA gemessen werden. Für das mutierte rekombinante TSH gelang das nicht. Der verwendete ELISA zeigte Werte unterhalb der Nachweisgrenze an. Mögliche Gründe dafür werden in 5.2.2 diskutiert.

Das rekombinante TSH, welches in Insektenzellen hergestellt wurde, ließ sich mit dem kommerziellen ELISA ebenfalls nicht messen. Unterschiedliche Verdünnungen ergaben gleiche Absolutwerte für die TSH-Konzentration im ELISA. Diese konnten dann wiederum nicht reproduziert werden, sodass diese Methode für die Quantifizierung des in Insektenzellen hergestellten TSH nicht zielführend war.

4.4.2 Bestimmung mittels Western Blot

CHO- und HEK-Zellen

Da sich die Konzentrationen der unterschiedlichen Mutanten des rekombinanten TSH mittels ELISA nicht messen ließen, wurde versucht, diese mittels Western Blot semiquantitativ zu bestimmen und mit der Konzentration des WT zu vergleichen. Hierfür wurde zunächst ein Antikörper, der an die β -Untereinheit des TSH bindet, verwendet. Auch mit dieser Messmethode konnte lediglich die Konzentration für den WT abgeschätzt werden. Da sich die Bindungsstelle für den Antikörper, der gegen die β -Untereinheit gerichtet ist, möglicherweise in der Region der Mutation befindet, wurde der Western Blot Versuch mit zwei Antikörpern wiederholt, welche sich gegen die α -Untereinheit der Glycoproteinhormone richtet. Der eine sollte an den C-Terminus, der andere an den N-Terminus der α -Untereinheit binden. Doch auch mit diesen Antikörpern zeigte der Western Blot lediglich eine Bande für das WT-TSH. Somit wurde auch diese Methode zur Bestimmung der TSH-Konzentration verworfen.

Insektenzellen

Auch das WT-TSH, das **C105Vfs114X**-TSH und zusätzliches Thyrostimulin, welches in Insektenzellen hergestellt wurde, wurde per Western Blot analysiert.

Wie im Methodenteil beschrieben, wurden nach der Infektion der Insektenzellen mit dem Baculovirus an Tag 1,2,3,4 und 5 jeweils Proben der Suspensionkultur entnommen, um eine Kinetik der TSH-Produktion per Western Blot darstellen zu können. Zudem wurde eine Negativkontrolle (Suspensionskultur von nicht transfizierten/infizierten Insektenzellen) mitgeführt, um mögliche falsch-positive

Ergebnisse durch unspezifische Bindungen zu überprüfen. Zusätzlich wurde noch eine Probe des 10-fach aufkonzentrierten WT-TSH, **C105Vfs114X**-TSH und Thyrostimulin auf das Gel aufgetragen. Die beiden verwendeten Primärantikörper binden jeweils an die spezifischen β -Untereinheiten von TSH und Thyrostimulin. Für das Thyrostimulin zeigte sich eine ansteigende Konzentration bis Tag 4 (Abbildung 4.4 oben), danach fiel sie leicht ab. Die Konzentration des in Insektenzellen hergestellten WT-TSH stieg ab Tag 1 stetig an und zeigte die höchste Konzentration an Tag 5 (Abbildung 4.4 mittig). An Tag 5 wurde die komplette Suspensionskultur entnommen und das darin enthaltene TSH und Thyrostimulin auf ein Zehntel der ursprünglichen Menge aufkonzentriert. Dies zeigte sich als höchste Konzentration mit 10 x gekennzeichnet. Auch in diesem Fall konnte die Konzentration des mutierten TSH, welches in Insektenzellen hergestellt wurde, nicht per Western Blot abgebildet und mit dem WT semiquantitativ verglichen werden (Abbildung 4.5 unten)

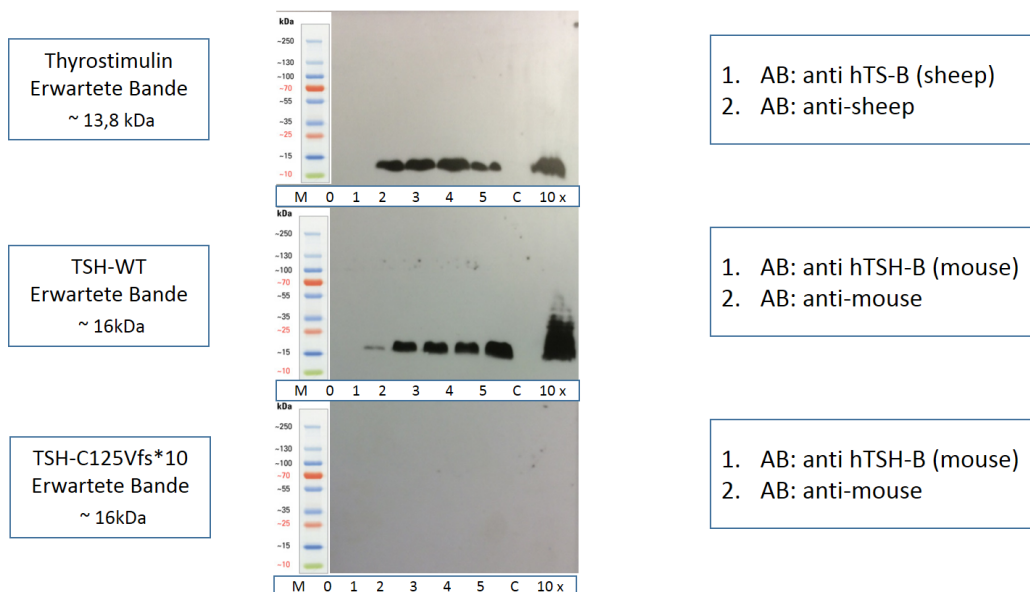


Abbildung 4.4: Nachweis des produzierten hTSH und Thyrostimulin mittels Western Blot. Dargestellt ist eine Kinetik mit Messungen an Tag 0, 1, 2, 3, 4, 5, einer Negativkontrolle (c) und dem 10-fach aufkonzentrierten Protein (10x), sowie ein Größenstandard (M). Während Thyrostimulin und TSH-WT einen Anstieg in der Produktion zeigen, ließ sich die Mutation **C105Vfs114X** mit diesem Verfahren nicht nachweisen. **TS**: Thyrostimulin; **TSH**: Thyroidea-stimulierendes Hormon; **WT**: Wildtyp.

4.4.3 Semiquantitative Bestimmung mittels konfokalen Mikroskops

Der verwendete Vektor ist der sogenannte AmCyan-P2A-mCherry. AmCyan enthält ein *nuclear localization signal* (NLS) und wird von mCherry durch das Peptid P2A getrennt, sobald der Vektor exprimiert wird. Während AmCyan dann in den Nucleus wandert, verbleibt mCherry im Zytoplasma. Somit kann die Expression im Nucleus durch AmCyan sowie die Biosynthese, der Transport und die Sekretion des Proteins mit Hilfe des mCherry beurteilt werden (99). Das WT-TSH und die Mutanten wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Dr. Adolfo Rivero-Müller in den Vektor kloniert und uns zur Verfügung gestellt.

Vergleich der Transfektionseffizienz von HEK-Zellen und CHO-Zellen

Zunächst wurde dann die Transfektionseffizienz von HEK293- und CHO-Zellen mit Hilfe des konfokalen Mikroskops überprüft. Dabei zeigten HEK293-Zellen eine wesentlich höhere Transfektionseffizienz (Abbildung 4.5 oben) als die CHO-Zellen (Abbildung 4.5 unten). Dies war sowohl beim WT auch bei allen Mutanten der Fall.

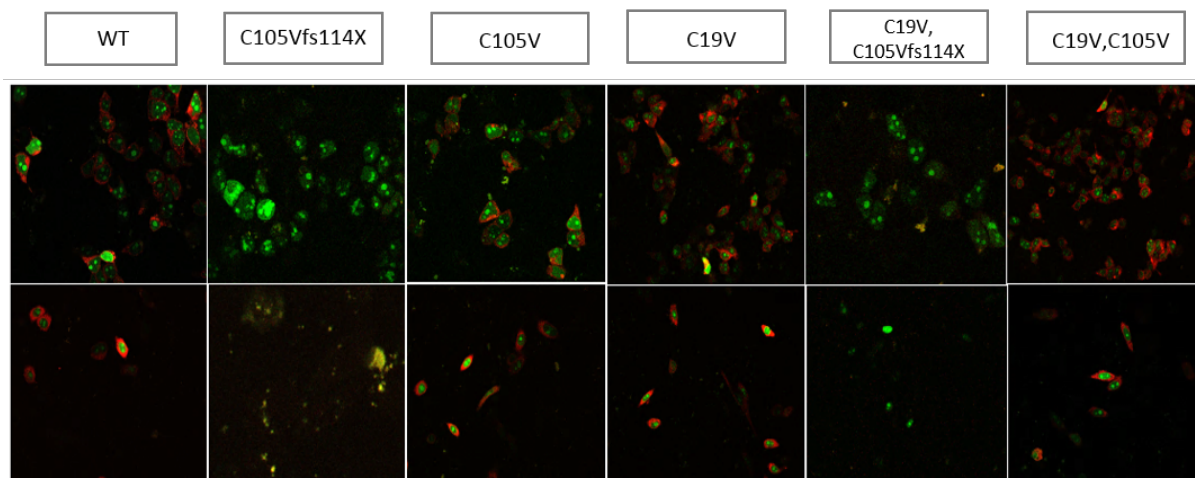


Abbildung 4.5: Vergleich der Transfektionseffizienz in CHO- und HEK293-Zellen. Die obere Reihe zeigt transfizierte HEK293-Zellen (WT und die unterschiedlichen Mutationen). Die untere Reihe zeigt hingegen transfizierte CHO-Zellen. Der visuelle Vergleich zeigt, dass die Transfektionsrate in HEK293-Zellen erheblich höher ist. **WT**: Wildtyp.

Die höhere Transfektionsrate in HEK293-Zellen ließ sich zusätzlich mit Hilfe des ELISAs für den WT bestätigen. Das rekombinante TSH aus HEK293-Zellen war signifikant höher, als das TSH, hergestellt in CHO-Zellen (Abbildung 4.6).

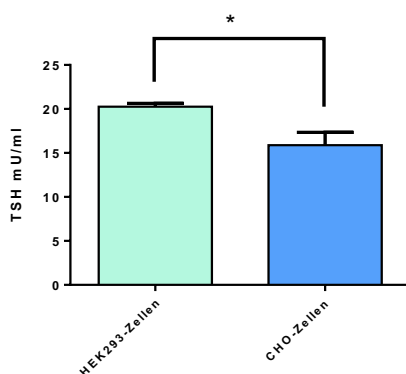


Abbildung 4.6: Vergleich der WT-TSH Konzentration in CHO-Zellen und HEK293-Zellen. Die Abbildung zeigt die Konzentration des rekombinant hergestellten WT-TSH in CHO-Zellen und HEK293-Zellen. Die Konzentration des rekombinant hergestellten TSH in HEK293-Zellen (grüner Balken) ist signifikant höher als die Konzentration des in CHO-Zellen hergestellten TSH (blauer Balken). Die Ergebnisse beruhen auf jeweiligen Doppelbestimmungen zweier unterschiedlicher Verdünnungen. Für die statistische Auswertung wurde ein Mann-Whitney-U-Test angewandt. HEK293-Zellen und CHO-Zellen wurden dabei miteinander verglichen. Dabei zeigt sich, dass die TSH-Produktion in HEK293-Zellen signifikant höher ist. Die Fehlerbalken sind als \pm SEM dargestellt. * < 0.05 .

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die weitere Herstellung des rekombinanten TSH in HEK293-Zellen durchgeführt.

Nachweis und Vergleich der TSH-Expression

In weiteren Schritten erfolgte dann die Transfektion und die Aufbereitung der Proben wie im Methodenteil beschrieben. Die Aufnahmen zeigen HEK293-Zellen, die jeweils mit der WT-DNA und der mutierten-DNA transfiziert wurden. Bezüglich der Transfektionseffizienz zeigen sich keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 4.7), was durch Messungen der Lichtintensitäten (siehe 4.5) bestätigt werden konnte. Die beiden Mutanten, die den Frameshift enthalten (C105Vfs114X; C19V,C105Vfs114X), weisen keine beziehungsweise nur eine geringfügige mCherry-Fluoreszenzfärbung auf. Dies ist am ehesten darauf zurück zu führen, dass die Mutation sich in dem Bereich befindet, in dem sich ebenfalls das Startcodon für das mCherry befindet. Auf dieses Problem wird jedoch noch ausführlich in der Diskussion eingegangen (5.2.4). Der Vergleich der Lichtintensitäten beruht somit primär auf der AmCyan Färbung im Zellkern.

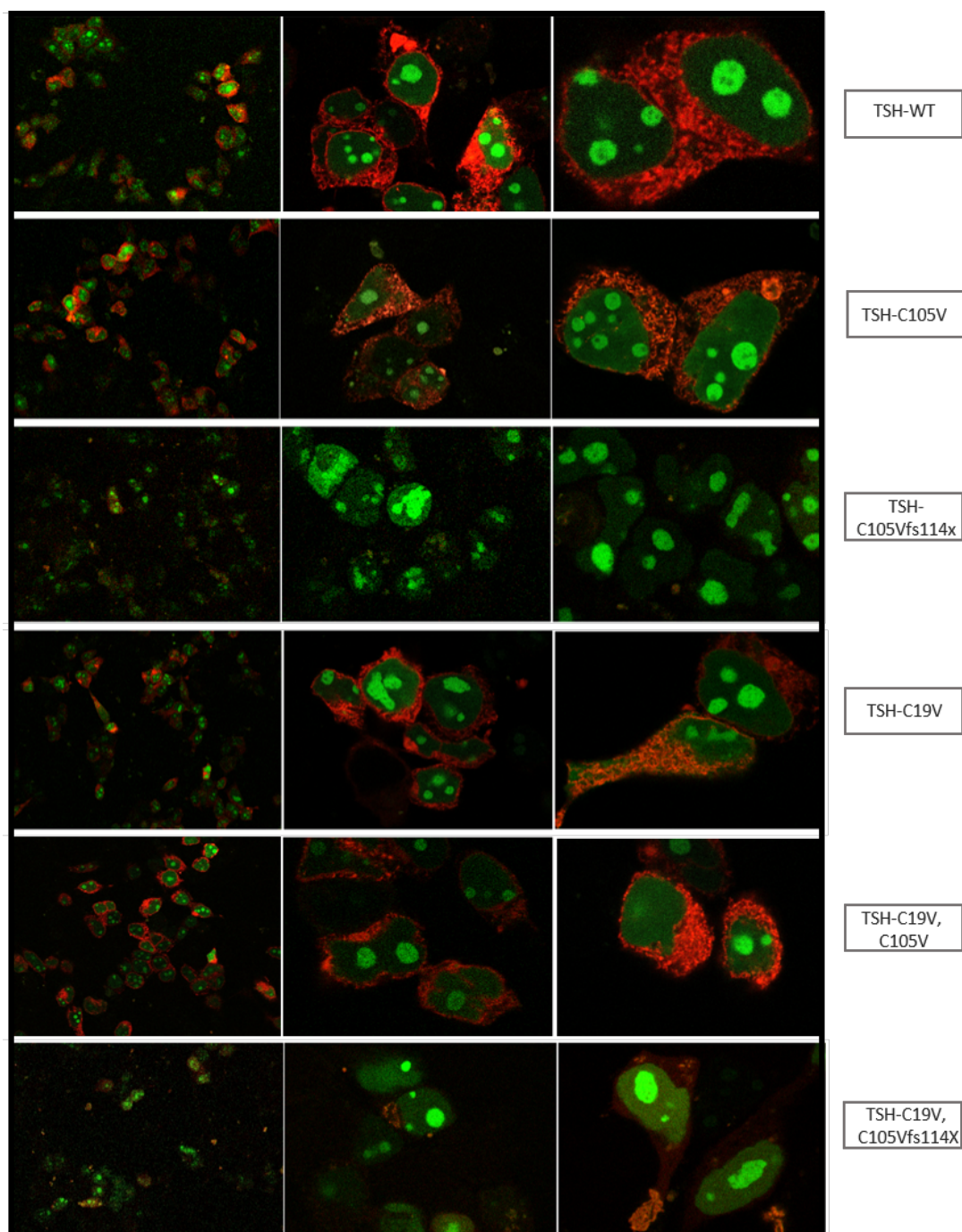


Abbildung 4.7: Nachweis der TSH Expression. Die Abbildung zeigt Aufnahmen mit einem konfokalen Lasermikroskop. Zu sehen sind HEK293-Zellen, die mit der α -Untereinheit und der β -Untereinheit des WT-TSH bzw. deren Mutanten transfiziert wurden. Die Aufnahmen erfolgten in drei verschiedenen Objektiven (20x, 40x und 63x), welche nebeneinander dargestellt sind. Die Transfektionseffizienz und folglich die Expression wird anhand von AmCyan verglichen. Der mChery Fluoreszenzfarbstoff ist bei den beiden Frameshift Mutationen nur sehr schwach exprimiert und eignet sich somit nicht zum Vergleich. Betrachtet man nur die AmCyan, weisen der WT und die Mutanten visuell keine Unterschiede hinsichtlich ihrer Expression auf.

Des Weiteren wurde zwei weitere Konstrukte hergestellt (C105Vfs114X_mod. und C19V, C105Vfs114X_mod.), um auszuschließen, dass die ursprünglichen Frameshift Mutationen zu einem Protein führen, welches nicht in das Medium sekretiert wird.

Die modifizierten Frameshift Mutationen zeigen Expressionsmuster, welche mit dem WT und den anderen nicht-Frameshift Mutationen vergleichbar sind (Abbildung 4.8)

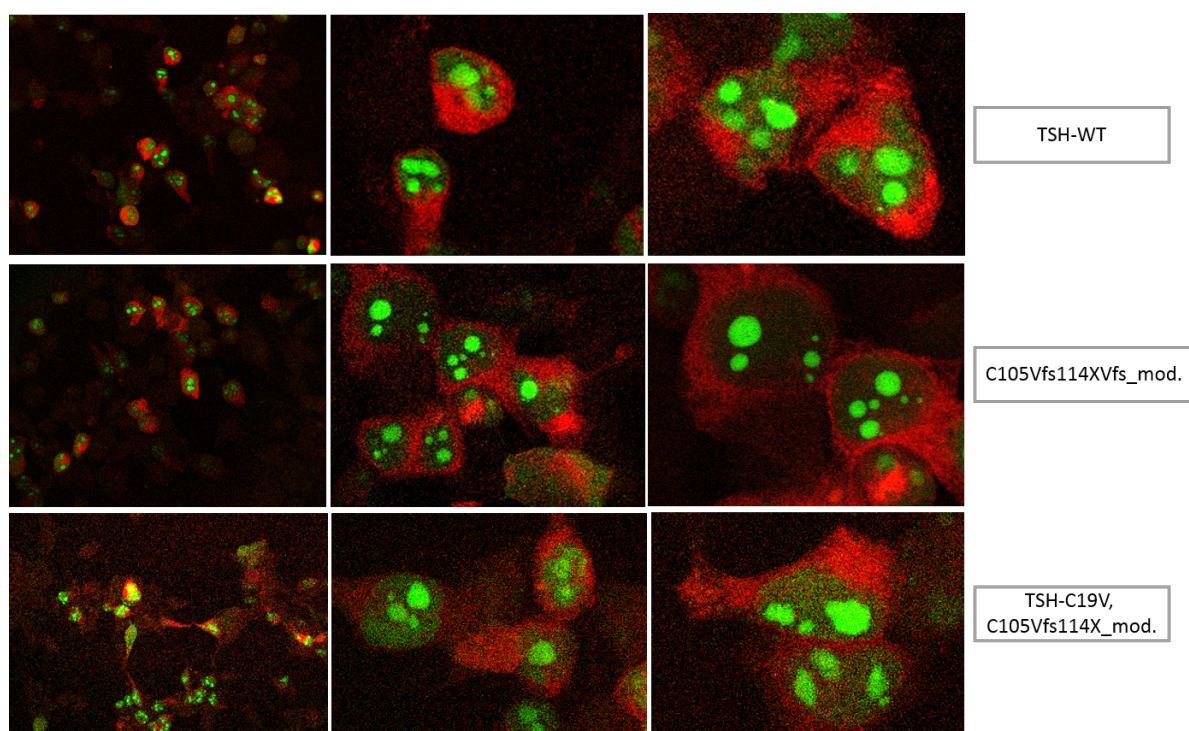


Abbildung 4.8: Nachweis der TSH-Expression. Die Abbildung zeigt Bilder des WT sowie der beiden modifizierten Frameshift Mutationen. Beide Mutationen zeigen ein Expressionsmuster vergleichbar mit dem WT.

4.5 Mikroskopischer Vergleich der Intensitäten

Um den visuellen Eindruck, dass sich Expression von WT-TSH und mutiertem TSH nicht signifikant unterscheidet, zu überprüfen, wurde die Intensität einzelner Zellen unter einem Lichtmikroskop bestimmt. Prinzipiell wird davon ausgegangen, dass eine höhere Transfektionseffizienz und somit Proteinexpression durch eine höhere Lichtintensität unter dem Lichtmikroskop und dem konfokalen Mikroskop angezeigt wird. Mit Hilfe der Mäander Methode wurden die Zellen ausgesucht, markiert und die Intensität des AmCyan Fluoreszenzfarbstoffes der einzelnen Zellen bestimmt und schließlich ausgewertet:

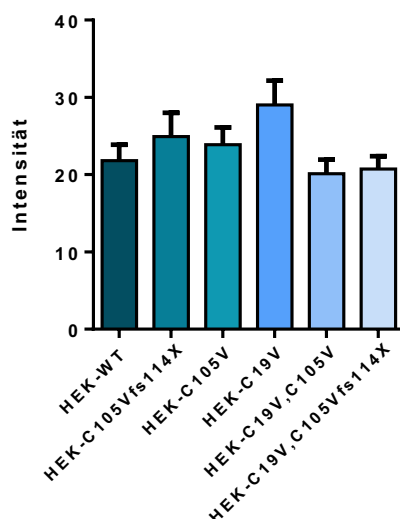


Abbildung 4.9: Vergleich der Lichtintensitäten zur Quantitätsbestimmung. Hierfür wurden HEK293-Zellen mit WT-TSH und den Mutanten im AmCyan-P2A-mCherry Vektor transient transfiziert. Zum Vergleich wurde die Intensität des AmCyan Fluoreszenzfarbstoffes der einzelnen Zellen gemessen. Messungen beruhen auf jeweils 39 Einzelbestimmungen für WT und Mutanten ($n=39$). Die statistische Auswertung erfolgte anhand einer ANOVA mit Kruskal-Wallis Test mit multiplen Vergleichen. Die Mutanten wurden dabei gegen den WT getestet. Fehlerbalken sind als \pm SEM dargestellt. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied der gemessenen Intensität zwischen WT und den einzelnen Mutanten, sodass die im ELISA (siehe 4.4.1) gemessene Konzentration des WT-TSH der Konzentration der Mutanten gleichgesetzt wurde.

Es wurden für den WT und die Mutanten die Lichtintensitäten von jeweils 39 Zellen ($n=39$) in 3 unabhängigen Experimenten bestimmt und diese dann miteinander verglichen. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Mutanten zum WT beziehungsweise der Mutanten untereinander (Abbildung 4.8). Somit wurde davon ausgegangen, dass sich auch die Transfektionseffizienz des WT-TSH und des mutierten TSH nicht signifikant unterschied. Folglich wurde die TSH-Konzentration für den WT mittels ELISA bestimmt (siehe 4.4.1) und dementsprechend die gleiche Menge (in $\mu\text{U/ml}$) des mutierten TSH für die funktionelle Charakterisierung eingesetzt.

4.6 Viability Assay

Viability Assay in HEK293-Zellen

Während des Mikroskopierens der transfizierten HEK293-Zellen entstand der Eindruck, dass einige Zellen möglicherweise bei der Transfektion mit den beiden

Frameshift Mutanten zugrunde gegangen seien. Um dies zu überprüfen, wurde ein sogenannter Viability Test durchgeführt. Dabei sollte vor allem geklärt werden, ob die Mutation **C105Vfs114X** bei der Transfektion einen apoptotischen Effekt auf die Zellen haben könnte und diese somit vermehrt zugrunde gingen. Wäre dies der Fall, könnte das wiederum eine Erklärung für den schweren Phänotyp sein. Die Zellen wurden dafür wie im Methodenteil beschrieben ausgesät und mit den unterschiedlichen Plasmiden transfiziert. Der Viability Assay wurde daraufhin durchgeführt. Er zeigt den Anteil der abgestorbenen Zellen durch einen Farbumschlag an, welcher nach 3 Stunden photometrisch gemessen wird.

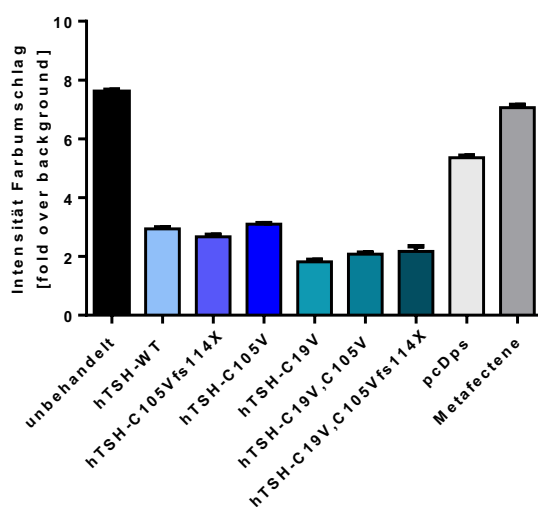


Abbildung 4.10: Viability Assay in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mit Plasmid-DNA des WT-TSH, der Mutanten (jeweils 150 ng /Well TSH- α , 50 ng/Well TSH- β) sowie mit dem Vektor pcDps (200 ng/Well) und mit Transfektionsreagenz Metafectene (8 μ l) transfiziert. Zur Kontrolle wurden ebenfalls unbehandelte Zellen mitgeführt. Es sollte überprüft werden, ob die Transfektion mit den mutierten Plasmiden und insbesondere die Mutation **C105Vfs114X** einen schädigenden Effekt auf die Zellen hat. Es zeigt sich, dass die Transfektion insgesamt einen schädigenden Effekt auf die Zellen hat, es jedoch keine Unterschiede zwischen WT und Mutanten gibt. Die statistische Auswertung erfolgte per ANOVA mit Kruskal-Wallis-Test und multiplen Vergleichen. Die Mutanten wurden dabei gegen das WT-TSH getestet. Hier zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Fehlerbalken sind als \pm SEM dargestellt.

Beschreiben, was gemacht wurde und was das Ergebnis ist dass die Transfektion generell einen schädigenden Einfluss auf die Zellen hat. Es aber keinen signifikanten Unterschied zwischen dem TSH-WT und der Patienten-Mutation C105Vfs gibt. Somit kann ausgeschlossen werden, dass mit der Mutation C105Vfs transfizierten Zellen vermehrt zugrunde gehen. Die Ergebnisse beruhen auf jeweils 10 Einzelbestimmungen (n=10). Statistische Berechnung anhand des Kruskal-Wallis-Test, was wurde gegen was getestet. Fehlerbalken: SEM.

Hier zeigt sich, dass die Transfektion an sich einen schädigenden Einfluss auf die Zellen hat (Abbildung 4.10). Von den unbehandelten Zellen sind signifikant weniger zugrunde gegangen. Eine Kontrolle mit Metafectene konnte zeigen, dass das Transfektionsreagenz nicht ursächlich für die Schädigung der Zellen war. Vielmehr scheint es, als sei dieser Effekt auf eine Schädigung durch die DNA zurückzuführen. Dass die Patienten Mutation **C105Vfs114X** jedoch toxischer auf die Zellen wirkt als der WT, konnte jedoch nicht gezeigt werden. Somit kann ein apoptotischer Effekt der Mutation **C105Vfs114X** als Ursache für den ausgeprägten Phänotyp ausgeschlossen werden (Abbildung 4.10).

Viability Assay in FTC133-Zellen

Der Viability Test wurde ebenfalls verwendet, um zu überprüfen, ob das hergestellte rekombinante TSH und insbesondere die Patientenmutante **C105Vfs114X** als Ligand einen toxischen Effekt auf die Zellen hat. Dabei wurden die FTC133-Zellen ausgesät und am nächsten Tag mit den Liganden (rekombinantes bTSH, hTSH-WT und **C105Vfs114X**-Mutante) und entsprechend des Protokolls des cAMP-Assays stimuliert. Der Farbumschlag wurde dann mit Hilfe des Viability Assays nach 45 Minuten gemessen.

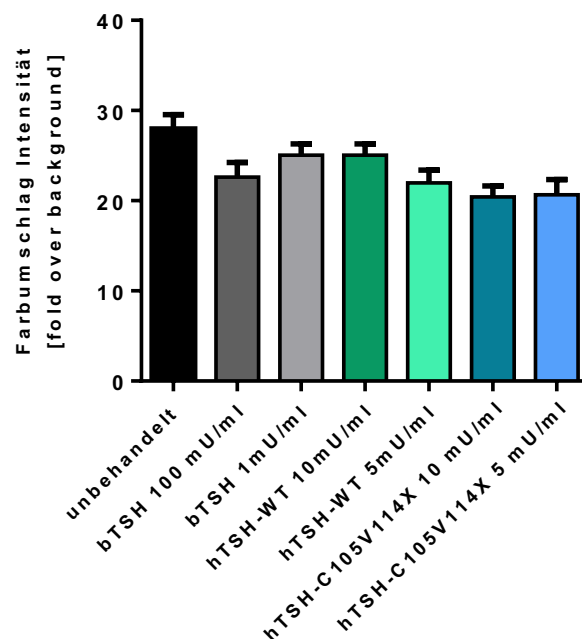


Abbildung 4.11: Viability Assay in FTC133-TSHR-Zellen. FTC133-TSHR-Zellen wurden mit dem rekombinanten TSH (bTSH, hTSH und **C105Vfs114X**-TSH) für 45 Minuten stimuliert. Die Abbildung zeigt, dass die Stimulation mit rekombinant hergestelltem WT-TSH, bovinem TSH und insbesondere mit dem rekombinant hergestellten **C105Vfs114X**-TSH keine signifikante Schädigung der Zellen hervorruft. Die Ergebnisse beruhen auf 6 Einzelbestimmungen ($n=6$). Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe einer ANOVA mit Kruskal-Wallis-Test und multiplen Vergleichen. Dabei wurde das bTSH, hTSH und die TSH-Mutante **C105Vfs114X** in verschiedenen Konzentrationen gegen die unbehandelten Zellen getestet. Fehlerbalken sind als \pm SEM dargestellt. Dabei zeigen sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich eines schädigenden Effekts der Proteine.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation prinzipiell eine leichte Schädigung hervorruft, diese jedoch nicht signifikant ist. Es zeigt sich zudem keine signifikante Schädigung durch die Stimulation mit rekombinant hergestellten Proteinen und insbesondere nicht durch die Patientenmutation **C105Vfs114X** (Abbildung 4.11). Somit kann eine schädigende Wirkung der Patientenmutation auf die Zellen ausgeschlossen werden und dies nicht die Ursache für den schweren Phänotyp darstellen.

4.7 Überprüfung der Signalisierung des WT und der Mutanten

4.7.1 cAMP-Assay mit HEK293-TSHR Zellen

Nach Herstellung der unterschiedlichen Konstrukte und Quantifizierung der Proteinmengen sollte das hergestellte TSH hinsichtlich seiner Aktivierung der unterschiedlichen Signalwege charakterisiert werden. Es ist bekannt, dass nach Bindung von TSH an den TSHR neben dem Gs-Signalweg auch der Gq/11- und der MAPK-Signalweg initiiert wird (93, 94). Für den Gs-Signalweg ist zudem bekannt, dass er eine konstitutive Aktivität aufweist (87). Da der Gs-Signalweg der Hauptsignalweg des TSHR ist, wurde er in dieser Arbeit als Erstes charakterisiert. Insbesondere sollte auch ein invers-agonistischer Effekt als möglicher Pathomechanismus des veränderten Proteins (TSH-**C105Vfs114X**) auf den TSHR untersucht werden.

Für die funktionelle Charakterisierung wurden die HEK293-Zellen ausgesät, mit dem TSHR transient transfiziert, 48 Stunden später mit den Liganden stimuliert und die cAMP Konzentration mit Hilfe des AlphaScreen cAMP-Assays gemessen. Als Positivkontrolle wurde bTSH mitgeführt, für das bekannt ist, dass es den TSHR 10-fach effektiver aktiviert, als hTSH (107-109). Somit ist zu erwarten, dass 1 mU/ml bTSH zu einer ähnlichen Aktivierung des TSHR führt wie 10 mU/ml hTSH. Die Ergebnisse des cAMP-Assays zeigen, dass das humane WT-TSH den Gs-Signlweg signifikant mehr aktiviert als die Mutanten. Innerhalb der Gruppe der Mutanten gibt es jedoch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Aktivierung des Signalwegs (Abbildung 4.12). Zudem lässt sich ein invers-agonistischer Effekt der Patientenmutation **C105Vfs114X** in diesem Signalweg ausschließen, da es zumindest in der höheren Konzentration zur Aktivierung des Rezeptors durch die Mutante kommt, auch wenn diese aufgrund der niedrigen eingesetzten Proteinmenge gering ist (Abbildung 4.12). Bei einem invers-agonistischen Effekt wäre zu erwarten gewesen, dass das veränderte TSH (**C105Vfs114X**) die Basalaktivität des Rezeptors herunterreguliert, insbesondere in höheren Konzentration. Solch ein Effekt des mutierten TSH kann somit für diesen Signalweg in diesem Zellsystem ausgeschlossen werden (60).

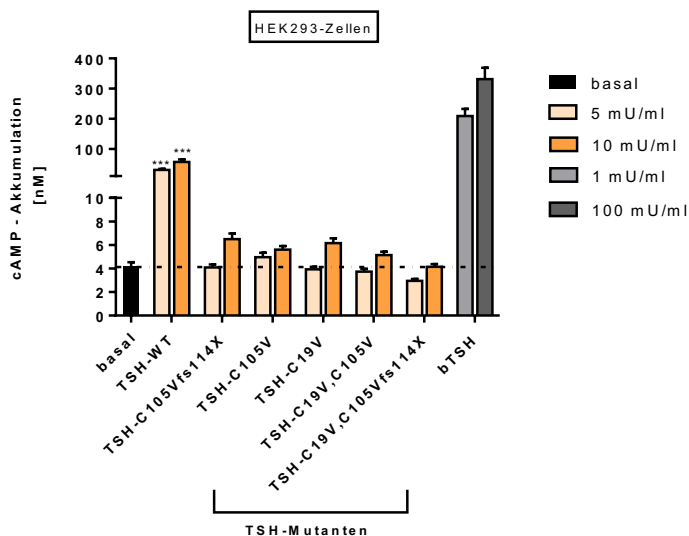


Abbildung 4.12: Funktionelle Charakterisierung des Gs/Adenylatzyklase Signalweges von WT-TSH und Mutanten am TSHR in HEK293-Zellen. Die Basalaktivität des Rezeptors ist in schwarz dargestellt. Dunkleres orange zeigt höhere Konzentrationen an, helleres orange niedrigere. Die Abbildung zeigt eine signifikant höhere Aktivierung (gemessen an der cAMP-Akkumulation) des TSHR durch den WT im Gegensatz zur Basalaktivität und den Mutanten. Innerhalb der Mutanten sind hingegen keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen. Die Signalaktivierung durch die Mutante **C105Vfs114X** ist zudem höher (vor allem in der höheren Konzentration von 10 mU/ml) als die Basalaktivität des Rezeptors (gestrichelte Linie), womit sich ein invers-agonistischer Effekt des veränderten TSH (**C105Vfs114X**) auf den Rezeptor ausschließen lässt. N=18 aus 6 unabhängigen Experimenten mit jeweiliger 3-fach Bestimmung. Statistische Auswertung erfolgte anhand einer ANOVA mit Kruskal-Wallis Test und multiplen Vergleichen. Dabei wurde die Basalaktivität gegen den WT und die Mutanten getestet. Der WT zeigt dabei einen signifikanten Anstieg des Signalweges im Vergleich zur Basalaktivität. Die Mutanten zeigen hingegen in der höheren Konzentration nur eine Tendenz, die nicht signifikant ist. Fehlerbalken sind als \pm SEM dargestellt. *** < 0.001.

4.7.2 cAMP-Assay mit FTC133-TSHR Zellen

In einem zweiten Schritt sollte überprüft werden, ob sich diese Daten und insbesondere der Ausschluss eines invers-agonistischen Effekts der Patientenmutation auf den TSHR in einem anderen, physiologischeren System reproduzieren lassen. Dafür wurden Schilddrüsenkarzinomzellen verwendet, die den TSHR bereits stabil transfiziert hatten (FTC133-TSHR Zellen). Da eine transiente Transfektion mit dem TSHR nicht notwendig war, erfolgte 24 Stunden nach dem Aussetzen der Zellen bereits die Stimulation mit bTSH als Positivkontrolle sowie WT-TSH und den Mutanten. Die Ergebnisse des durchgeführten cAMP Assays zeigen ähnliche Tendenzen (Abbildung 4.13). Die absolute cAMP-Akkumulation (in nM) ist bei dieser Zelllinie

wesentlich geringer. Mögliche Ursachen werden in 5.2.6 diskutiert. Ansonsten führt auch hier das WT-TSH zu einem signifikanten Anstieg der Rezeptoraktivierung. Hinzu kommt, dass auch die Mutanten (in der höheren Konzentration) einen signifikanten Anstieg der Aktivierung aufweisen. Untereinander unterscheiden sich die Mutanten hinsichtlich der Aktivierung des Signalwegs jedoch nicht. Zudem lässt sich auch in diesem Zellsystem ein invers-agonistischer Effekt der Mutation **C105Vfs114X** ausschließen, da ein Anstieg der Signalaktivierung im Vergleich zur Basalaktivität durch das mutierte TSH (**C105Vfs114X**) zu verzeichnen ist. Dieser Effekt ist zudem bei der höheren Konzentration ausgeprägter, sodass sich in diesem Zellsystem bestätigt, dass ein invers-agonistischer Effekt im Gs-Signalweg nicht für den schwerwiegenden Phänotyp verantwortlich sein kann (60).

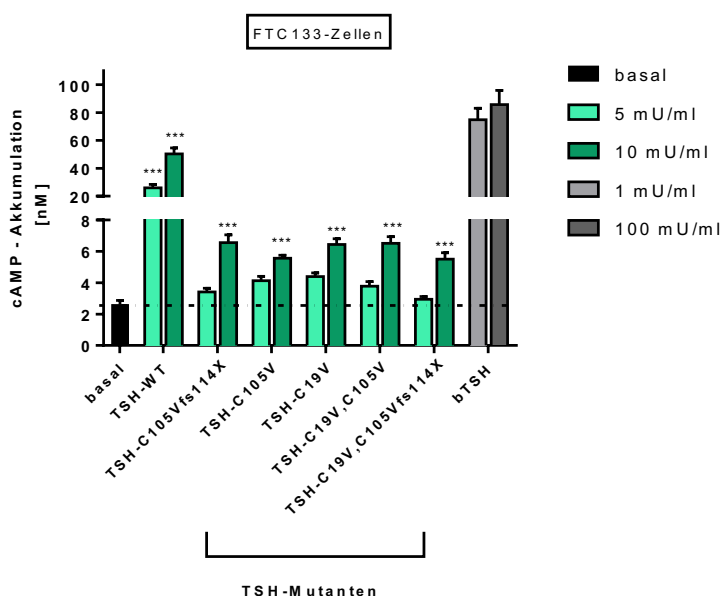


Abbildung 4.13: Funktionelle Charakterisierung des Gs/Adenylatzyklase Signalweges von WT-TSH und Mutanten am TSHR in FTC133-TSHR-Zellen. FTC-133-TSHR Zellen wurden in 96-well Platten ausgesetzt und 24 Stunden später mit den Liganden in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Die Abbildung zeigt die Basalaktivität des Rezeptors (schwarzer Balken) sowie die Signalisierung des TSHR durch hTSH-WT, Mutanten und der Kontrolle (bTSH) hinsichtlich der Aktivierung des Gs/Adenylatzyklase-Weges. hTSH-WT weist eine signifikant höhere Stimulation des TSHR als die Mutanten auf. Die Signalaktivierung der Mutanten ist zudem signifikant höher, als die Basalaktivität (gestrichelte schwarze Linie), womit ein invers-agonistischer Effekt ausgeschlossen werden kann. N=18 aus 6 unabhängigen Experimenten mit jeweiliger 3-fach Bestimmung. Statistische Auswertung anhand einer ANOVA mit Kruskal-Wallis-Test und multiplen Vergleichen. Dabei wurden WT-TSH und Mutanten in allen Konzentrationen gegen die Basalaktivität getestet. Fehlerbalken sind als \pm SEM dargestellt. *** < 0.001.

4.7.3 Reporteragenassays NFAT/SRE

Nachdem ein invers-agonistischer Effekt für den Gs/Adenylatzyklase Signalweg ausgeschlossen werden konnte, wurden zusätzlich der Gg/11- sowie der MAPK-Signalweg untersucht, um in diesen Signalwegen eine mögliche Erklärung für den schwerwiegenden Phänotyp zu finden. Für den TSHR ist nicht bekannt, dass er eine konstitutive Basalaktivität in diesen beiden Signalwegen aufweist. Somit ist hier auch kein invers-agonistischer Effekt des mutierten TSH auf den TSHR zu erwarten. Denkbar wäre es jedoch, dass das veränderte Protein dazu führt, dass einer dieser Signalwege oder auch beide komplett blockiert werden. Zur Überprüfung der beiden Signalwege wurde ein sogenannter Luciferase-Reporteragen-Assay durchgeführt. Die Transkription zweier unterschiedlicher Response Elemente (NFAT und SRE) als Reaktion auf die Aktivierung des Signalwegs durch den WT und die Mutanten sollte dabei gemessen werden. Für den Assay wurden HEK293-Zellen an Tag 1 in 96-Well Platten ausgesät. 24 Stunden später wurden sie dann mit dem TSHR und dem Response Element transient co-transfiziert. Weitere 48 Stunden später wurden sie mit den Liganden (bTSH, hTSH-WT und den Mutanten) stimuliert und schließlich die Stimulationen der jeweiligen Signalwege anhand des Assays gemessen.

SRE Reporteragenassay

Die Tendenzen des MAPK-Signalweges ähneln dem des Gs Signalweges. Die Positivkontrolle führt in den Konzentrationen 10 mU/ml und 1 mU/ml zu einer Aktivierung des Signalweges (Abbildung 4.14). Der WT und die Mutanten zeigen ebenfalls eine Stimulation des TSHR. Anders als beim Gs-Signalweg zeigt sich jedoch kein Unterschied zwischen WT und Mutanten hinsichtlich der Aktivierung des MAPK-Signalweges. Zudem fällt auf, dass die niedrige Konzentration der Mutanten zu einer gleichem beziehungsweise höheren Stimulation als die höhere Konzentration führt (Abbildung 4.14). Dieser Unterschied ist jedoch marginal und am ehesten auf Messschwankungen im Experiment zurückzuführen. Ein möglicher blockierender Effekt der Patientenmutante auf den TSHR in Bezug auf den MAPK-Signalweg kann zudem ausgeschlossen werden. Wäre dies der Fall, wäre keine Aktivierung des TSHR durch das veränderte TSH zu erwarten und die Ergebnisse im Bereich der Basalwerte oder darunter lokalisiert (60).

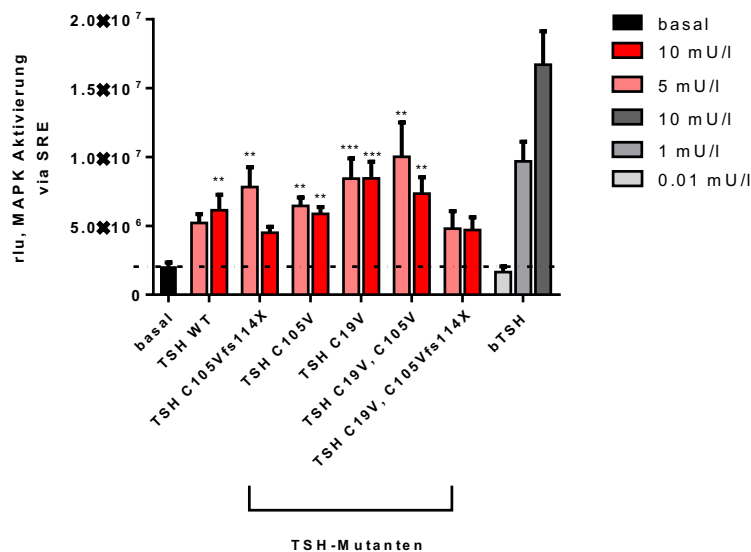


Abbildung 4.14: Funktionelle Charakterisierung des MAPK-Signalweges von WT-TSH und Mutanten am TSHR in HEK293-Zellen. Dunkelrote Balken zeigen die höheren, hellrote Balken die niedrigeren Konzentrationen an. Die Abbildung zeigt eine Aktivierung des MAPK-Signalweges durch die Positivkontrolle (bTSH), den WT und die Mutanten. Damit lässt sich ein blockierender Effekt der Patientenmutante **C105Vfs114X** auf den TSHR ausschließen. Im Gegensatz zum Gs-Signalweg zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen WT-TSH und den Mutanten hinsichtlich der Aktivierung des MAPK-Signalweges. N=12 aus 4 unterschiedlichen Experimenten mit jeweiliger 3-fach Bestimmung. Die statistische Auswertung erfolgte anhand einer ANOVA mit Kruskal-Wallis-Test und multiplen Vergleichen. WT-TSH und Mutanten wurden dabei in allen Konzentrationen gegen den Basalwert getestet. Fehlerbalken sind jeweils als \pm SEM dargestellt. ** < 0.01. *** < 0.001.

NFAT Reporterassay

Neben dem MAPK-Signalweg sollte auch der Gq/11 Signalweg betrachtet werden, um zu überprüfen, ob Probleme in diesem Signalweg eine Erklärung für den schweren Phänotyp liefern. Dieser wurde ebenfalls anhand eines Reporterassays überprüft, bei dem neben dem TSHR, das Response Element NFAT transient co-transfiziert wurde. 48 Stunden später wurden die transfizierten HEK293-Zellen mit der Positivkontrolle (bTSH), dem WT-TSH und den Mutanten stimuliert. Die Positivkontrolle führt in der Konzentration 1 und 10 mU/ml zu einer Aktivierung des Signalweges (Abbildung 4.15). Ansonsten unterscheiden sich die Ergebnisse von denen des Gs- und des MAPK-Signalweges. Das WT-TSH führt zu einer geringfügigen Stimulation des Rezeptors, welche jedoch nicht signifikant ist. Die Mutanten hingegen weisen keine Aktivierung dieses Signalweges auf. Die Messwerte liegen unterhalb der

Basalwerte. Dieser Effekt ist jedoch nicht signifikant, sondern zeigt lediglich eine Tendenz. Es wäre somit also denkbar, dass die Mutante **C105Vfs114X**, aber auch alle anderen Mutanten zu einem veränderten TSH führen, welches einen blockierenden Effekt auf den TSHR hinsichtlich des Gq/11 Signalweges hat und somit möglicherweise den schweren Phänotyp verursacht. Um diese Tendenz zu überprüfen, wären weitere Experimente mit größeren Mengen an höher konzentriertem TSH notwendig.

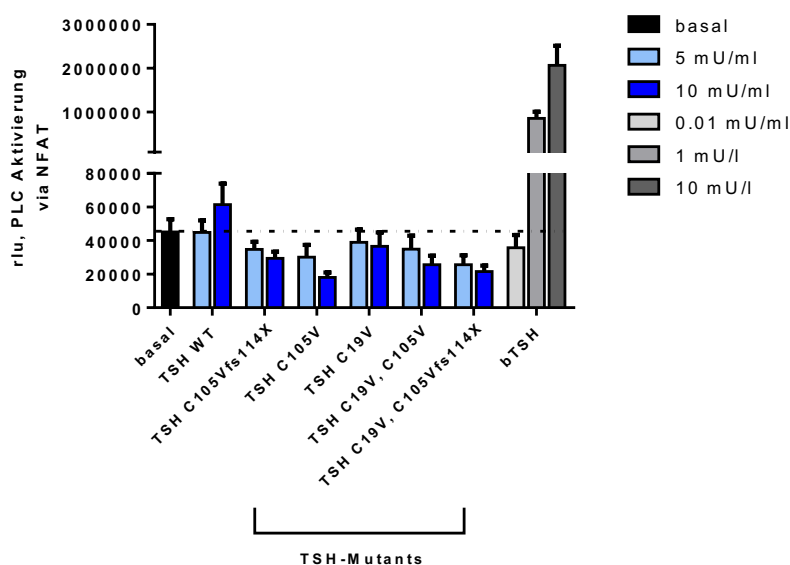


Abbildung 4.15: Funktionelle Charakterisierung des Gq/11-Signalweges von WT-TSH und Mutanten am TSHR in HEK293-Zellen. Die Positivkontrolle (bTSH) zeigt eine Aktivierung des Signalweges Gq/11. Es zeigt sich ebenfalls eine geringfügige Stimulation durch das WT-TSH, welche jedoch nicht signifikant ist. Die Mutanten zeigen hingegen eine verminderte Aktivität im Vergleich zum Basalwert an. Dieser Unterschied ist jedoch ebenfalls nicht signifikant. N=12 aus 4 unabhängigen Experimenten mit jeweiliger 3-fach Bestimmung. Statistische Auswertung erfolgte anhand einer ANOVA mit Kruskal-Wallis und multiplen Vergleichen. Dabei wurde das bTSH, WT-TSH und die Mutanten gegen den Basalwert getestet. Bis auf das bTSH in der höchsten Konzentration zeigten sich keine Signifikanzen. Fehlerbalken sind als \pm SEM dargestellt.

4.7.4 IP1-Assay

Um die Ergebnisse des NFAT-Reporterassays und damit einen möglichen blockierenden Effekt des mutierten TSH (**C105Vfs114X**) zu bestätigen beziehungsweise zu widerlegen, wurde ein weiterer Assay durchgeführt, der

sogenannte IP1-ELISA. Der IP1-ELISA ist ein kompetitiver Immunoassay, der ebenfalls den Gq/11-Signalweg überprüfen sollte. Die Ergebnisse dieses Assays zeigten keine ausreichende Stimulation des Rezeptors durch das WT-TSH oder die getesteten Mutanten. Dies ist vermutlich auf eine zu geringe Konzentration des rekombinant hergestellten TSH zurückzuführen. Der IP1-ELISA ist für diese Konzentrationen nicht sensitiv genug. Somit konnten die Tendenzen des NFAT-Reporterassays weder bestätigt noch widerlegt werden. Weitere Experimente mit höher konzentriertem rekombinanten TSH sind somit notwendig, um die Tendenzen im NFAT-Reporterassay besser einordnen zu können.

5 Diskussion

5.1 Besonderheiten der Mutation **C105Vfs114X**

Die untersuchte Mutation **C105Vfs114X** nimmt unter den Mutationen im *TSHB* Gen einen besonderen Stellenwert ein. Unbehandelt führt sie zu einem schweren Phänotyp mit ausgeprägter Hypothyreose und langfristigen Schäden hinsichtlich mentaler und motorischer Retardierung. Dies konnte ansonsten nur bei kombinierten hypophysären Defekten beispielsweise aufgrund von *PIT1*, *PROP1*, *LHX3*, *LHX4* Mutationen (13-16) und in einem Fall für die Mutation Q49X im *TSHB* Gen beobachtet werden (37). Isolierte zentrale Hypothyreosen aufgrund anderer Mutationen in der β -Untereinheit führen hingegen in der Regel nicht zum klassischen Bild einer schweren Hypothyreose. Betroffene Patienten zeigen daher im Kindesalter leichte bis moderate Ausprägungen einer Hypothyreose ohne langfristige Schäden auf Kognition oder Motorik (33, 36, 110). In diesen Fällen geht man davon aus, dass eine noch ausreichende Hormonproduktion der Schilddrüse stattfindet. Dies wird zum einen durch die Basalaktivität des TSHR erklärt, die unabhängig vom thyreotropen Regelkreislauf in geringem Maß Schilddrüsenhormone produziert, zum anderen durch eine mögliche Restaktivität des veränderten TSH (87, 111, 112). Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, weshalb es bei der Mutation **C105Vfs114X** zu einem so ausgeprägten Phänotyp vergleichbar mit Kindern mit einer Athyreose kommt und die Schilddrüsenhormonsynthese nicht ausreichend ist.

5.1.1 Unterschiedliche phänotypische Ausprägungen der **C105Vfs114X** Mutation

Zunächst wurde eine Literaturrecherche in Bezug auf die Mutation **C105Vfs114X** durchgeführt. Zudem wurde den Autoren, die bereits Fallberichte zu dieser Mutation publiziert hatten, ein Fragebogen zugesandt. Ziel war es, weitere Informationen zu bekommen, um einen detaillierten und standardisierten Vergleich der beschriebenen Patienten durchführen zu können. Leider war die Resonanz auf den Fragebogen und der Informationsgehalt doch so gering, dass sich der Vergleich letztlich vor allem auf die Publikationen stützen musste. Dabei fiel auf, dass sich der Zeitpunkt der Diagnosestellung und folglich der Beginn der L-Thyroxin Substitution zwischen den

Patienten erheblich unterschied. Ein systematischer Vergleich der Phänotypen war jedoch nicht möglich, da es sich vor allem um klinische Beobachtungen mit unterschiedlicher Schwerpunktsetzung handelte und keine wissenschaftlich festgelegten, vergleichbaren Kriterien herangezogen werden konnten. Dennoch ist davon auszugehen, dass die Ursachen der unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen sehr vielfältig sind. So hängt beispielsweise das Erkennen der Erkrankung und damit der Zeitpunkt der Diagnose sowohl von der Ausprägung der Symptome als auch vom Zugang zum Gesundheitssystem und letztlich auch der Expertise der Ärzte hinsichtlich dieser sehr seltenen Erkrankung ab. Ähnliches gilt für das Outcome nach L-Thyroxin Substitution: So gab es (n=3) Fallberichte von Kindern (44, 46, 47), die später oder zeitgleich substituiert wurden als andere, aber ein besseres Outcome aufwiesen sowie (n=4) Patienten (46, 51) [Patient 5 des Fragebogens im Anhang] die bei ähnlichem Behandlungsbeginn einen sehr schweren Phänotyp hatten. Bei den Patienten, die von Karges et al. beschrieben wurden, ist jedoch eine schlechte Compliance als Teil des schlechten Outcomes zu vermuten. Ein weiterer Patient wurde zudem bereits mit 1 Monat diagnostiziert und eine Behandlung begonnen, weist jedoch mit einem IQ < 60 einer der schwerwiegendsten Retardierungen auf [Fragebogen Patient 5]. Generell gilt es hierbei jedoch zu beachten, dass es wichtige Einflussfaktoren der psychomotorischen und kognitiven Entwicklung wie z.B. die Compliance der L-Thyroxin Einnahme, die Förderung der Patienten bei Defiziten und die Früherkennung von neuen Symptomen gibt, die das Outcome signifikant beeinflussen. Zudem ist prinzipiell das individuell unterschiedliche Potential in der Entwicklung der Patienten aufgrund von Genetik und Umweltfaktoren zu beachten. Auch eine Schilddrüsenunterfunktion der Mutter während der Schwangerschaft beziehungsweise eine nicht adäquate Jodversorgung in der Schwangerschaft können einen Einfluss auf die Entwicklung haben (113-115). Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass eine frühe L-Thyroxin Substitution sowie eine gute Compliance sicher den entscheidenden Einfluss auf das Outcome haben. Welche Wertigkeit die anderen diskutierten Faktoren haben, lässt sich in dieser retrospektiven Untersuchung ohne strukturiert erfasste Daten nicht beantworten. Wichtig ist jedoch festzuhalten, dass auch einige (n=12) Kinder mit der **C105Vfs114X** Mutation im *TSHB* Gen bei frühzeitiger diagnostizierter und mit L-Thyroxin substituierter Hypothyreose eine Entwicklung aufweisen können, die gesunden Gleichaltrigen entspricht (40, 44,

46-49, 51, 54). Um festlegen zu können, zu welchem Zeitpunkt bei verzögerter Therapie sicher mit Folgeschäden zu rechnen ist und um Risikofaktoren sowie mögliche klinische Frühsymptome zu identifizieren, bedürfte es einer kontrollierten Studie, welche jedoch bei der geringen Fallzahl schwierig durchzuführen ist. Selbst bei der angeborenen primären Hypothyreose, die im Neugeborenen-Screening erfasst wird und die eine Häufigkeit von 1:3500 Neugeborene hat, ist dies 40 Jahre nach Einführung des Neugeborenen-Screenings bislang nicht mit letzter Sicherheit möglich, wobei aufgrund der Datenlage ein Therapiebeginn in den ersten 14 Lebenstagen empfohlen wird (9, 65). Eine Alternative, welche geeignet ist, um alle Kinder mit zentraler Hypothyreose frühzeitig zu identifizieren und Folgeschäden wie im Falle der Mutationen **C105Vfs114X** zu verhindern, ist ein zusätzliches populationsbasiertes Screening von fT4 bei allen Neugeborenen. Dies wurde in den vergangenen Jahren immer wieder diskutiert, bei der geringen Fallzahl schwerwiegender Komplikationen oder Folgeschäden von zentralen Hypothyreosen wurde dies aber als nicht ausreichend wirtschaftlich erachtet. In den Niederlanden wurde das Screening jedoch bereits 1995 eingeführt und in einer zweijährigen Kohortenstudie mit 385.000 Neugeborenen, 19 zentrale kongenitale Hypothyreosen detektiert. Dies entspricht einer geschätzten Häufigkeit von ca. 1:20.000 (12). Eine weitere Studie von Kempers et al. kommt zu ähnlichen Ergebnissen und geht von einer Häufigkeit von 1:21.000 aus, basierend auf einer Untersuchung von 430764 Neugeborenen über einen Zeitraum von 2 Jahren (11). Daher sollte dies in Bezug auf die Entwicklung des Individuums, der Auswirkungen von Folgeschäden auf die Patienten und deren Familien bei gleichzeitig sinkenden Laborkosten und breiter Verfügbarkeit der Screeningmethode auch in Deutschland neu bewertet werden.

5.2 Limitationen der eingesetzten Methoden bei den zellbiologischen Experimenten

5.2.1 Limitationen der Zellsysteme

Bei der Auswahl eines geeigneten Zellsystems für die Produktion von hTSH spielten vor allem zwei Faktoren eine Rolle: eine ausreichende Produktion von rekombinantem TSH zu erreichen und gleichzeitig die physiologischen Bedingungen der betroffenen Patienten in einem *in vitro* Experiment bestmöglich zu

imitieren. Um eine optimale Ausbeute zu erreichen, wurde in unserem Labor erstmals versucht, hTSH in Insektenzellen unter Verwendung des sogenannten Bac-to-Bac-Baculovirus Systems herzustellen. Von einer erfolgreichen Expression von hTSH in diesem System berichteten Grossmann et al. (71). In dieser Publikation wies die Arbeitsgruppe darauf hin, dass sich das *in vitro* hergestellte hTSH in Insektenzellen maßgeblich von *in vivo* hergestelltem hTSH aus Insektenzellen in Bezug auf die biologische Aktivität unterschied. TSH hergestellt in Insektenzellen enthält eine große Menge an Oligosacchariden vom Mannose-Typ. Die biologische Aktivität des *in vivo* hergestellten hTSH in Insektenzellen sei möglicherweise deshalb vermindert, da es *in vivo* von körpereigenen Mannose-Rezeptoren frühzeitig abgebaut wird. Da in der vorliegenden Arbeit lediglich *in vitro* Experimente zur Herstellung von hTSH durchgeführt wurden, erschien das Insektenzellsystem als geeignetes Zellsystem, um eine große Menge hTSH für die funktionelle Charakterisierung herzustellen. Dass sich Insektenzell-hTSH von Säugerzell-hTSH in ihrem jeweiligen Glykosylierungsmuster unterscheidet, wurde dabei bedacht. Für den Fall, dass dies für die weiteren Experimente ein Problem darstellen sollte, wurden hTSH gleichzeitig in einem Säugerzellsystem hergestellt.

Dafür kam sowohl eine Expression in CHO-Zellen als auch in HEK293-Zellen in Betracht. Der Vorteil der CHO-Zellen lag darin, dass aus der Literatur bekannt ist, dass die Glykosylierung der CHO-Zellen den humanen Hypophysenzellen am ähnlichsten ist, wenn sie sich auch leicht unterscheiden (116, 117). Ein wesentliches Problem dieser Zellen ist jedoch, dass ihre Transfektionsrate sehr gering ist und es somit sehr schwierig ist, ausreichend TSH zu produzieren, um damit eine funktionelle Charakterisierung durchführen zu können. Dies war auch in dieser Arbeit der Fall. Ein Vergleich von CHO- mit HEK293-Zellen zeigte sowohl eine wesentlich höhere Transfektionsrate von HEK293-Zellen im konfokalen Mikroskop als auch eine wesentlich höhere Produktion von zumindest immunologisch aktivem hTSH in der Messung mit einem kommerziellen ELISA. Aufgrund der höheren Produktionsmenge von hTSH in HEK293-Zellen wurde daher beschlossen, die zellbiologischen Experimente in HEK293-Zellen durchzuführen.

In zukünftigen Experimenten wäre es ebenfalls denkbar, eine stabile Zelllinie beispielsweise in CHO-DG44 Zellen zu generieren. Eine solche Zelllinie herzustellen bedarf jedoch eines großen zeitlichen Aufwands, vieler Laborressourcen und muss

adaptiert werden, um eine auf Dauer hohe Produktion des Proteins gewährleisten zu können (118). Gelingt jedoch eine Herstellung dieser stabilen Zelllinie mit einer hohen Produktionsrate, wäre das dabei hergestellte TSH der *in vivo* Situation am ähnlichsten und eine langfristige Produktion als sie durch transiente Transfektion möglich ist, könnte sichergestellt werden.

5.2.2 Limitationen der antikörperbasierten Nachweisverfahren

Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)

Nach Transfektion von CHO-, HEK293- und Insekten-Zellen wurde das rekombinant hergestellte TSH aufgereinigt und gemessen. Dazu wurde zunächst ein kommerzieller ELISA verwendet, mit Hilfe dessen sich jedoch lediglich das WT-TSH aus CHO- und HEK293-Zellen adäquat messen ließ. Für alle verwendeten Mutanten (**C105Vfs114X**; C105V; C39; C19V/C105V; C19V/C105Vfs114X) waren die Werte stets unter der Nachweisgrenze. Somit ist davon auszugehen, dass diese Mutanten eine gestörte immunologische Reaktivität aufweisen. In der späteren funktionellen Charakterisierung zeigten diese Mutanten jedoch eine Aktivierung des Signalweges, sodass davon auszugehen ist, dass hTSH prinzipiell auch bei den Mutanten hergestellt wurde und dies auch eine biologische Aktivität aufweist. Dass der Nachweis im ELISA fehlschlug, kann dadurch begründet sein, dass der verwendete Antikörper nicht mehr an das veränderte TSH-Molekül binden kann. Dies kann entweder als direkte Konsequenz der Aminosäuresubstitution und einer somit fehlenden Bindungsstelle für den Antikörper oder durch eine veränderte Tertiärstruktur des gesamten Moleküls, wodurch der Antikörper die Bindungsstelle im Molekül nicht identifizieren kann, begründet sein. Es wurde sowohl rekombinantes TSH analysiert, welches eine Mutation am C-Terminus (**C105Vfs114X**) und ein hTSH, dessen Mutation näher am N-Terminus (C19V) lokalisiert ist, analysiert. Bei beiden Varianten lagen die Messwerte unterhalb der Nachweisgrenze, am ehesten bedingt durch eine Veränderung der gesamten Proteinstruktur. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um diese Annahme bestärken.

Die Messergebnisse des TSH, welches in Insektenzellen hergestellt wurde, war im Gegensatz dazu in den Versuchen (n= 8; 4 unabhängige Versuche jeweils mit Doppelbestimmungen) nicht unter der Nachweisgrenze. Die Ergebnisse der Messungen schwankten jedoch enorm zwischen den einzelnen Messungen und

konnten in den 4 unabhängigen Versuchen nicht reproduziert werden. Eine Interaktion eines Inhaltsstoffes des Mediums mit dem Antikörper konnte durch Einsatz von reinem Medium ohne mutiertem TSH mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Dabei zeigten sich konstant Messwerte unter der Nachweisgrenze. Somit ist eine der Möglichkeiten, dass auch hier eine gestörte Antikörperbindung aufgrund einer veränderten Proteinstruktur vorliegt. Mögliche Gründe für die veränderte Proteinstruktur könnten zum einen durch veränderte Disulfidbrückenbindungen, zum anderen aber auch durch die unterschiedlichen Glykosylierungsmuster von hTSH aus Insektenzellen bzw. Säugerzellen bedingt sein. Die Glykosylierung kann zudem auch einen Einfluss auf die Heterodimerisierung mit der α -Untereinheit haben. All diese Mechanismen können dazu beigetragen haben, dass sich das hTSH aus Insektenzellen nicht robust messen ließ.

Western Blot

Bei dem Versuch, das mutierte hTSH semiquantitativ mit Hilfe des Western-Blot Verfahrens zu bestimmen und die Konzentration durch Vergleich mit dem WT-TSH abzuschätzen, verhielten sich die Messungen entsprechend dem ELISA für CHO- und HEK293-Zellen. Das WT-TSH ließ sich nachweisen, während das mutierte hTSH **C105Vfs114X** zu keiner sichtbaren Bande im Western Blot führte. Mehrere verschiedene Antikörper wurden eingesetzt. Zunächst wurde vermutet, dass die Bindungsstelle des Antikörpers im Bereich der veränderten Aminosäuresequenz am C-Terminus des mutierten TSH liegen könnte und dieser deshalb nicht binden könnte. Aus diesem Grund wurden zwei weitere Antikörper getestet, welche an die α -Untereinheit des TSH binden. Eines an den C-Terminus, das andere an den N-Terminus der α -Untereinheit. Doch auch unter Verwendung dieser Antikörper konnte keine Bande nachgewiesen werden. Deshalb muss am ehesten davon ausgegangen werden, dass eine komplett veränderte Struktur des gesamten TSH-Moleküls dazu führt, dass dieses vom Antikörper nicht erkannt werden kann.

Vergleichende Studien

Auch andere Autoren berichteten von Problemen, mutiertes hTSH (R55G) adäquat messen zu können. Eine große Studie von Drees et al. wies diese Mutation 2014 erstmals nach (56). Eine euthyreote Indexpatientin wies unterschiedliche Messwerte

bei Testung ihres TSH-Werts auf. In einer Routineuntersuchung war der Wert unterhalb der Messgrenze, bei Wiederholung der Messung mit einem anderen Test, war der TSH-Wert hingegen normal. Daraufhin wertete die Arbeitsgruppe etwa 2 Millionen Patientendaten aus und fand bei einer Kohorte von 20 Patienten die hypothyreot oder euthyreot waren, dass 4 von 8 gängigen TSH-Assays, Messwerte unter der Nachweisgrenze anzeigten. In 12 der 20 Fälle wurde die TSH-Variante R55G nachgewiesen, die dazu führte, dass der in dem jeweiligen Assay verwendete Antikörper nicht binden konnte und so fälschlicherweise zu falsch-niedrigen Werten führt. Bei den restlichen 8 Patienten wurde keine Sequenzierung des *TSHB* Gens durchgeführt, diese Mutation aber ebenfalls angenommen. Als Ursache für die fehlende Bindung diskutieren die Autoren zwei Mechanismen. Eine Möglichkeit wäre, dass der monoklonale Antikörper nicht mehr an das Epitop, welches durch die Mutation verändert wurde, binden kann. Da die Hersteller keine Angaben zur Epitopsequenz machen, ist es jedoch schwierig dies nachzuweisen. Eine weitere Möglichkeit sehen die Autoren in der Glykosylierung. Die betroffenen Patienten könnten durch die Mutation eine veränderte Glykosylierung aufweisen, die dann wiederum zu einer veränderten Expression des TSH-Epitops und folglich zu einer gestörten Bindung der verwendeten Antikörper führen könnte (56, 119). Die Autoren berichten außerdem, dass 7 der 20 Patienten aufgrund ihres TSH-Werts unter der Nachweisgrenze mit L-Thyroxin behandelt wurden, obwohl die fT3 und fT4 Werte im Normbereich lagen und somit widersprüchlich zu den TSH-Werten waren. Im klinischen Alltag wird eine Therapie häufig anhand des TSH-Werts initiiert, jedoch zeigen diese Fälle, dass niedrige TSH-Werte stets nur in Zusammenschau mit der Klinik und den Konzentrationen der freien Schilddrüsenhormone bewertet und nur bei kohärenter Konstellation eine Therapie begonnen werden sollte.

Pappa et al. berichteten ebenfalls von der Mutation R55G im *TSHB* Gen, welche zu einer intakten Bioaktivität, aber zu einer eingeschränkten Immunoreaktivität führt (57). Die betroffenen Patienten (Brüder) wiesen in einem initialen Test TSH-Werte unterhalb der Nachweisgrenze auf, zeigten jedoch keine Anzeichen einer Hypothyreose (57). Daraufhin folgten TSH-Messungen der Geschwister und deren Eltern mit 5 unterschiedlichen Immunoassays, welche zu unterschiedlichen Ergebnissen führten. Die Arbeitsgruppe konnte hier die veränderte Aminosäuresequenz als Ursache für die fehlende Immunoreaktivität des Moleküls ausmachen. Immunoassays, deren

Antikörper in der Region der Mutation binden, führen dann zu einem Messwert unterhalb der Nachweisgrenze, während andere Antikörper mit Bindungsstellen außerhalb der veränderten Region des Proteins zu messbaren Konzentrationen mit immunologischen Methoden führen. Die Autoren warnen daher vor Fehldiagnosen, da unterschiedliche Methoden zu unterschiedlichen Messwerten führen können. Dies kann zur Folge haben, dass aufgrund der immunologischen Messmethode klinisch relevante Fälle einer Hypothyreose mit *TSHB* Mutationen übersehen werden bzw. niedrige Werte in ihrer klinischen Relevanz überschätzt werden. Deshalb sollten niedrige TSH-Werte im bestmöglichen Fall mit anderen Messmethoden kontrolliert werden und nur in Zusammenhang mit der Klinik der Patienten bewertet werden.

Beide Studien zeigen, dass TSH-Assays anfällig beziehungsweise hypersensitiv auf kleine Veränderungen im TSH-Molekül reagieren und diese Methode somit bei Experimenten von TSH-Mutationen wie im Falle der vorliegenden Arbeit nicht uneingeschränkt möglich ist.

5.2.3 Limitationen der Massenspektrometrie

Auch mit Hilfe der Massenspektrometrie war es nicht möglich, die TSH-Konzentration zu messen. Während für TSH, welches in CHO- und HEK293-Zellen hergestellt wurde, kein Peptid nachgewiesen werden konnte, konnten die Messwerte des TSH, welches in Insektenzellen hergestellt wurde, nicht reproduziert werden. Zunächst wurde eine Intervention von Proteinen, welche in dem verwendeten Medium enthalten waren, vermutet. Neue Proben, die in einem serumfreien Medium ohne Zusätze generiert wurden, führten jedoch zu ähnlichen Ergebnissen. Als weitere mögliche Ursache wurde die Möglichkeit diskutiert, dass die Proben während des Transports, der Lagerung oder auch der Aufbereitung/Messung signifikant degradiert sind, unter anderem deshalb, da den Proben primär kein Proteaseinhibitor hinzugefügt wurde. Um diesen Effekt auszuschließen, müsste ein weiterer Versuch unter Verwendung eines Proteaseinhibitors und mit besonderem Augenmerk auf Transport und Lagerung durchgeführt werden. Prinzipiell ist diese quantitative Methode am wenigsten anfällig für Fehler, die auf die Proteinprimär- oder tertiärstruktur zurückzuführen sind, sodass bei weiterführenden Experimenten versucht werden sollte, diese als Messmethode zu etablieren.

5.2.4 Limitationen der Messungen anhand des konfokalen Mikroskops

Anfärbung

Bei der Messung mit dem konfokalen Mikroskop fiel besonders die geringfügigere Färbung der Mutanten, die einen Frameshift enthielten, im Gegensatz zu den anderen Mutanten und dem WT auf. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass die Mutanten eine geringe Transfektionseffizienz aufweisen. Wahrscheinlicher spielen aber der vorzeitige Stopp und die daraus resultierende fehlende Translation der MCherry-Sequenz eine Rolle. Beim WT und den Mutanten ohne vorzeitigen Stopp wird die Sequenz von TSH und mCherry ohne Unterbrechung abgelesen (Abbildung 5.1). Bei den Frameshift Mutanten kommt es jedoch zu einem verfrühten Stopp. Damit mCherry abgelesen werden kann, bedarf es also eines erneuten Startcodons (ATG). Dieses ist jedoch nicht zu Beginn des mCherry lokalisiert, sodass die Transkription des Gens nicht vollständig erfolgen kann. Weshalb jedoch eine gewisse, wenn auch schwächere Anfärbung mit mCherry auch bei den beiden Frameshift Mutanten zu beobachten ist, ist möglicherweise darauf zurück zu führen, dass die folgende Sequenz ebenfalls ATG Codons enthält, die in frame mit der mCherry sind. Diese führen möglicherweise dazu, dass sich die Polymerase daran orientiert und wieder „anspringt“. Aus der Tatsache resultiert eine geringere Expression des mCherry Fluoreszenzproteins, was wiederum zu einer geringeren Färbung im konfokalen Mikroskop führt. Zur besseren Veranschaulichung ist die Sequenz des *TSHB* und des mCherry im Folgenden (Abbildung 5.1) dargestellt.

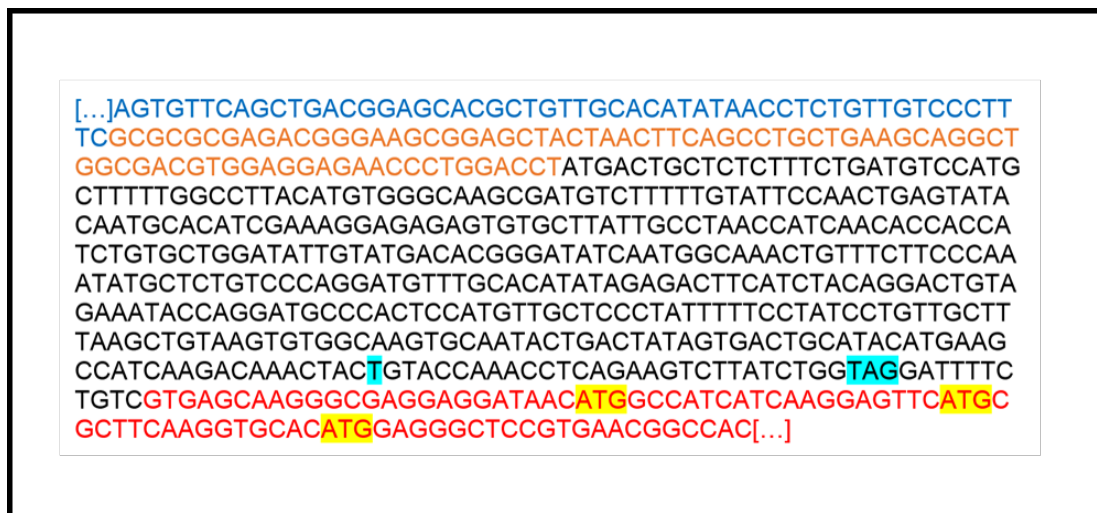


Abbildung 5.1: Ausschnitt der Sequenz des AmCyan-P2A-mCherry Vektors und des *TSHB*. Ein Teil der Sequenz des AmCyan ist in blau dargestellt, in orange ist die Sequenz des P2A (self-cleaving Peptide) dargestellt, schwarz ist die Sequenz des *TSHB* und rot die Sequenz des *mCherry*. In Türkis dargestellt ist die T-Deletion (Mutation **C105Vfs114X**), die zu einem frühzeitigen Stopp (ebenfalls türkis) führt. Aufgrund des vorzeitigen Stops bedarf es eines erneuten Startcodons (ATG in gelb dargestellt), damit mCherry abgelesen und exprimiert wird. Dies geschieht jedoch nicht zu Beginn des Gens, was wahrscheinlich die geringe Expression von mCherry bei den Frameshift Mutationen begründet.

Um sicher zu gehen, dass die Mutation nicht zu einem Protein führt, welches degradiert, aggregiert oder intrazellulär sequestriert wird und somit nicht ins Medium sekretiert wird, wurden zwei weitere Frameshift Mutationen konstruiert, bei denen das Stopcodon an Position 114 übersprungen wurde und das *TSHB* an das mCherry ähnlich wie beim WT gebunden ist. Hier zeigten sich keine Unterschiede im Vergleich zum WT bzw. den Mutationen, die zu keinem Frameshift führten (60).

Insgesamt lässt sich also davon ausgehen, dass die geringe mCherry Expression auf das Stopcodon der beiden Frameshift Mutationen und nicht auf eine gestörte Sekretion des mutierten TSH zurückzuführen ist. Dies wurde auch durch die funktionelle Charakterisierung der modifizierten Frameshift Mutanten bestätigt (60).

Des Weiteren fiel bei den Frameshift Mutationen eine ungleiche Verteilung der Anfärbung auf. Es wurde der Eindruck erweckt, dass nur der Zellkern intakt ist, während das Zytoplasma fragmentiert erschien. Eine im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Hypothese war daher, dass die veränderte Aminosäuresequenz durch die Frameshift Mutation bedingt zu einem Apoptosesignal für die Zellen führen könnte. Eine weitere Hypothese war, dass sich das veränderte und möglicherweise

fehlgefaltete Protein an überlebensnotwendige Strukturen in der Zelle anlagert und diese dann infolge einer Inaktivierung dieser Strukturen zugrunde geht.

Um zu überprüfen, ob der induzierte Zelltod eine Rolle spielt, wurde ein Viability Assay durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass einige Zellen bereits durch die Transfektion zugrunde gingen, die Frameshift Mutationen aber im Vergleich mit dem WT und den anderen Mutanten hinsichtlich ihres Überlebens keine Unterschiede aufwiesen. Somit ist der Eindruck, dass sich bei den Frameshift Mutationen Zellfragmente im konfokalen Mikroskop zeigen, wohl eher nicht auf eine tatsächliche Zerstörung der Zellen, sondern auf einen visuellen Eindruck aufgrund der unterschiedlich starken Anfärbung des Zytoplasmas zurückzuführen ist.

5.2.5 Limitationen der semiquantitativen Abschätzung der TSH-Menge

Die TSH-Menge ließ sich aus bereits erwähnten Gründen nicht anhand von antikörperbasierten Nachweisverfahren oder durch Massenspektrometrie bestimmen. Deshalb wurde beschlossen, die Menge des WT-TSH zunächst mit Hilfe eines ELISAs zu bestimmen. Dann sollten mikroskopische Bilder von WT und den Varianten bezüglich ihrer Transfektionsrate verglichen werden und somit Rückschluss auf die produzierte Menge der anderen Mutanten geschlossen werden. Dabei wurden die Bilder des konfokalen Mikroskops zum einen visuell verglichen, zum anderen durch Messung der Intensität von AmCyan im Zellkern bestätigt. Die Auswahl der Zellen für diese Messung wurde verblindet von einer technischen Assistentin nach der Mäander Methode durchgeführt. Bei der Messung zeigte sich, dass sich die Transfektionsraten von WT und Mutanten nicht signifikant unterschieden. Die Menge des produzierten TSH der Mutanten wurde daraufhin mit der Menge des produzierten und im ELISA gemessenen TSH des WT gleichgesetzt. Dass dabei von der Transfektionsrate direkt auf die produzierte Menge des hTSH geschlossen wurde, ist sicherlich eine der größten Limitationen dieser Arbeit. Dennoch ist dies unserer Meinung nach erlaubt, da dies mit den momentan zur Verfügung stehenden Methoden, die beste Annäherung zur Messung des TSH ist. In der funktionellen Charakterisierung zeigte sich letztlich eine geringe Aktivierung des Rezeptors durch mutiertes TSH im Gegensatz zum WT-TSH. Dies ist möglicherweise auf eine geringere Produktion von TSH, auf eine verminderte biologische Aktivität der Mutanten und/oder auf eine reduzierte Affinität des veränderten Proteins zum Rezeptor zurückzuführen. Auch ein verfrühter Zerfall

des Proteins nach initial uneingeschränkter Produktionsrate wäre möglich. Zudem wäre durch eine Strukturänderung eine unzureichende Heterodimerisierung der beiden Untereinheiten denkbar. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Ausbeute des hergestellten mutierten Proteins mengenmäßig dem des WT entspricht, die Mutationen jedoch zu einer veränderten Tertiär- bzw. Quartärstruktur führen. Diese könnten wiederum durch die veränderte Aminosäureabfolge, aufgelöste Disulfidbrückenbindungen oder andersartige Glykosylierungsmuster mit veränderten elektrischen Ladungen bedingt sein. All diese Mechanismen können prinzipiell zu einer geringeren Affinität des Glycoprotein hormons zum Rezeptor oder zu einer verminderten Aktivierung am Rezeptor führen, welche sich in der geringeren Signaltransduktion widerspiegelt (2, 86, 120).

5.2.6 Unterschiedliche Ergebnisse der cAMP-Akkumulation

Die absolute cAMP-Akkumulation bei der funktionellen Charakterisierung unterscheidet sich signifikant in FTC133-Zellen, die den TSHR stabil transfiziert hatten von der in HEK293-Zellen, welche den TSHR transient transfiziert hatten. Die Messwerte aus den HEK293-Zellen zeigen wesentlich höhere Absolutwerte hinsichtlich der cAMP-Akkumulation. Eine mögliche Ursache hierfür ist das Alter der FTC133-Zellen. Sie wurden bei -180°C in Stickstoff gelagert und für diese Versuche aufgetaut. Ursprünglich entstammen die Zellen jedoch Versuchen aus dem Jahr 2000. Es ist möglich, dass die FTC-133 Zellen trotz Haltung unter Antibiotikaselektion mit der Zeit die Expression des TSHR verloren haben. Das könnte dann die geringeren Werte in der funktionellen Charakterisierung erklären.

5.2.7 Limitationen der Reporterassays

Um den Beitrag der Alteration weiterer Signalwege zu überprüfen, wurde zusätzlich zum Gs-Signalweg auch der Gq/11 (gemessen über den NFAT-Reporter) und der MAPK-Signalweg überprüft, welcher letztlich in mehreren Signalwegen (Gs-, Gq- und Gi) endet.

Der MAPK-Signalweg wurde mit Hilfe des SRE Reporterassays überprüft. WT und Mutanten zeigen eine Aktivierung, die geringer ist als die Aktivierung durch die Positivkontrolle (bTSH). Interessanterweise gibt es aber keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und Mutanten hinsichtlich der Signalisierung. Mit diesem

Assay ist es jedoch nicht möglich, den Effekt auf die einzelnen Signalwege zu bestimmen, die der MAPK-Signalweg umfasst. Somit könnte man lediglich spekulieren, dass die Mutante **C105Vfs114X** zu einer überproportionalen Aktivierung des Gi-Signalweges führt und somit für den Phänotyp zumindest mitverantwortlich sein könnte.

Um den Gq/11 Signalweg zu testen, wurde ein sogenannter NFAT-Reporterassay verwendet. Die Positivkontrolle (bTSH) führte in seiner höchsten Konzentration (10 mU/ml) zu einer Aktivierung des Rezeptors, sodass davon ausgegangen werden kann, dass der Assay prinzipiell funktioniert hat. WT und Mutanten zeigten keine signifikante Aktivierung am TSHR. Dies ist am ehesten auf eine zu geringe Konzentration des rekombinant hergestellten hTSH zurückzuführen, welches eine 10-fach geringere Affinität am TSHR hat als bTSH. Es ist jedoch interessant, dass der WT eine Tendenz zeigte, den TSHR zu aktivieren, wohingegen die Mutanten tendenziell eher Messwerte unterhalb der Basalwerte anzeigten. Da für den Gq/11 Signalweg keine konstitutive Aktivität bekannt ist, wäre in diesem Fall auch nicht von einem invers-agonistischen Effekt auszugehen. Man könnte nur spekulieren, dass die Mutante zu einer kompletten Blockade dieses Signalweges führt und somit ebenfalls mitursächlich für den Phänotyp sein könnte. Um diese Hypothese zu bestärken beziehungsweise zu entkräften, wurde zusätzlich ein weiterer Assay durchgeführt, der den Gq/11 Signalweg beurteilen sollte. Für den sogenannten IP-One ELISA wurden FTC133 Zellen verwendet, welche den TSHR bereits stabil transfiziert hatten. Hier ließ sich jedoch keine Aktivierung des Signalweges beobachten, was aber eher ein Problem der Assaydurchführung war. Es ist anzunehmen, dass ebenfalls nicht ausreichend hochkonzentriertes hTSH generiert werden konnte, um mit Hilfe des Assays einen Effekt am Rezeptor zu bewirken.

5.3 Einfluss der unterschiedlichen Glykosylierungsmuster

Wie bereits beschrieben, können unterschiedliche Glykosylierungsmuster der verwendeten Zellreihen ursächlich für eine verminderte Aktivierung des TSHR und des folgenden Signalweges sein. Prinzipiell spielt die Glykosylierung bei der regelrechten Faltung eines Proteins, bei der Heterodimerisierung, der Sekretion, der metabolischen Clearance, sowie der Plasma-Halbwertszeit und der biologischen Aktivität des Proteins eine Rolle (70, 71). Für das TSH ist bekannt, dass die gemeinsame α -Untereinheit zwei N-Glykosylierungen aufweist, die β -Untereinheit hingegen eine

(121). N-Glykosylierung bedeutet, dass an die Seitenkette der Aminosäure Asparagin eine Glykosylgruppe kovalent gebunden wird. Die Biosynthese der N-Glykosylierung geschieht zunächst im ER und wird anschließend im Golgi-Apparat modifiziert. An die Aminogruppe des glykosylierten Asparagins wird zunächst das Oligosaccharid N-Acetylglucosamin (GlcNAc) in β -Konfiguration gebunden. An dieses binden dann ein weiteres GlcNAc-Molekül sowie drei Zuckermoleküle (Mannosen). Dies ist die Grundstruktur der N-Glykosylierung. Durch Modifikation dieser Grundstruktur entstehen drei Haupttypen: Der *High-Mannose-Typ*, der *Complex-Typ* und der *Hybrid-Typ*. Der High-Mannose-Typ weist dabei neben den beiden GlcNAc-Molekülen nur Mannose-Moleküle auf. Der Complex-Typ verfügt hingegen zusätzlich über Galactose und Sialinsäuren. Der Hybrid-Typ ist eine Zwischenform und weist Galactose, jedoch keine Sialinsäuren auf (117, 122). Diese Modifikation der Glykosylierung unterscheidet sich von Zelltyp zu Zelltyp. Grossmann et al. stellten 1997 erstmals erfolgreich rekombinantes hTSH in Insektenzellen her (71). Dabei zeigte sich eine wesentlich höhere *in vitro* Aktivität, als bei hTSH, welches in CHO-Zellen hergestellt wurde. Dies konnte die Arbeitsgruppe jedoch nicht auf die *in vivo* Situation übertragen. Sie schlossen deshalb daraus, dass dies wohl am ehesten auf unterschiedliche Glykosylierungsmuster der Zellreihen zurückzuführen sei. So fanden sie heraus, dass Insektenzellen nicht in der Lage sind, Kohlenhydrateinheiten zu Oligosacchariden vom Complex-Typ mit Sialinsäuren zu prozessieren, insbesondere, wenn ein sehr später Polyhedrin Promoter bei der transienten Transfektion verwendet wurde. Somit weist das hTSH aus Insektenzellen vor allem Glykosylierungen vom High-Mannose-Typ auf. Humanes TSH, welches in CHO-Zellen generiert wurde, endet hingegen vor allem mit Oligosacchariden vom Complex-Typ. Dass sich die *in vivo* Aktivität des Insektenzellen-TSH so von der *in vitro* Aktivität unterschied, führte die Arbeitsgruppe auf einen verfrühten Abbau des Glycoproteins durch den Mannose-Rezeptor in der Leber zurück (71). Gleichzeitig postulierten sie, dass die geringe *in vitro* Signaltransduktion des hTSH aus CHO-Zellen hauptsächlich auf die Sialinreste zurückzuführen seien. Somit scheint die Sialylierung der Proteine aus CHO-Zellen zum einen einen negativen Effekt auf die *in vitro* Aktivität des hTSH zu haben, gleichzeitig aber auch protektiv in Bezug auf die Clearance zu wirken (71). Aufgrund der zu geringen Ausbeute des hTSH aus CHO-Zellen und dem Problem, dass sich hTSH aus Insektenzellen noch nicht einmal

für den WT messen ließ, haben wir uns für die Produktion in HEK293-Zellen entschieden.

Die Arbeitsgruppe um Croset et al. beschäftigte sich 2012 mit unterschiedlicher Glykosylierung in HEK- und CHO-Zellen (120). Dabei untersuchten sie 12 verschiedene Proteine, die rekombinant in CHO- und HEK-Zellen hergestellt wurden. Für die Herstellung in CHO-Zellen wurde eine stabile Zelllinie verwendet. Bei den 12 untersuchten Proteinen, wurde das TSH nicht mit abgedeckt, sodass die Ergebnisse nur zum groben Vergleich herangezogen werden können. Die rekombinant hergestellten Proteine wurden dann aufgereinigt und per Western Blot, Massenspektrometrie und isoelektrischer Fokussierung analysiert. Unterschieden sich die Glykosylierungsmuster, wurden die Proteine mit deglykosylierenden Enzymen behandelt und daraufhin noch einmal analysiert. In den Experimenten zeigten sich signifikante Unterschiede im Hinblick auf das Glykosylierungsmuster zwischen Proteinen, die in HEK-Zellen und denen, die in CHO-Zellen hergestellt worden waren. Die Anzahl der Glykosylierungsstellen unterschied sich so erheblich, dass sie sogar mit Hilfe des wenig sensitiven Western Blot Verfahrens (SDS-PAGE) nachweisbar war. Im Western Blot unterschieden sich die Proteine hinsichtlich ihres Molekulargewichts und somit hinsichtlich der Höhe der Proteinbanden. Zum anderen waren einige Banden diffuser, was wiederum für eine heterogene Massenverteilung spricht (120). Zusätzlich konnte die Arbeitsgruppe signifikante Unterschiede hinsichtlich des Gehalts der Sialinsäuren nachweisen. Das Fehlen dieser Sialinsäuren führt wiederum zu einer geringeren Halbwertszeit *in vivo*, da die Proteine an einen Rezeptor in der Leber binden, der diese abbaut (123). Die Arbeitsgruppe zeigte somit, dass es auch innerhalb von Säuger-Zell-Expressionssystemen signifikante Unterschiede in der Glykosylierung gibt. Welche Auswirkungen diese Unterschiede auf die biologische Aktivität, die Halbwertszeit, die Stabilität der Proteine und die Proteininteraktionen hat, muss in weiteren Experimenten untersucht werden. Dass die unterschiedlichen Glykosylierungsmuster aber prinzipiell einen Einfluss auf Protein-Protein-Interaktionen haben können, haben bereits Baenzinger und Green 1988 gezeigt (70). Dass dies auch in dieser Arbeit vor allem in Bezug auf die eingesetzten Assays und die funktionelle Charakterisierung eine Rolle spielt, ist denkbar. Beispielsweise könnte dadurch die generell relativ geringe Signalaktivierung im funktionellen Assay erklärt werden. Da sich jedoch zwischen WT und Mutanten ein signifikanter Unterschied im

Hinblick auf die Signalaktivierung zeigte, ist es unwahrscheinlich, dass die Glykosylierung auch für diesen Unterschied verantwortlich ist. Auch ist es möglich, dass die unterschiedlichen Glykosylierungsmuster einen Einfluss auf die Ergebnisse des eingesetzten ELISAs haben. Somit ist nicht auszuschließen, dass der Messwert im ELISA nicht der wirklich hergestellten Menge eines bioaktiven TSH entspricht. Die Tatsache, dass sich die Mutanten mit Hilfe der eingesetzten Methoden nicht messen ließen, ist jedoch wahrscheinlicher auf eine gestörte Antikörpererkennung/-bindung zurückzuführen. Da keine der Varianten die bekannte Glykosylierungsstelle (Position: 23-25 bzw. mit Signalpeptid: 43-45) einschließt, ist nicht davon auszugehen, dass das veränderte Glykosylierungsmuster allein ursächlich für die Unterschiede zwischen WT und Mutanten ist (2). Da sie jedoch nahe des Cysteins an Position 19 ist, welches einen Interaktionspartner der Disulfidbrückenbindung darstellt, ist nicht auszuschließen, dass die veränderte Glykosylierung einen Einfluss auf die Formation des Proteins hat. Beispielsweise könnten die unterschiedlichen Glykosylierungsmuster zu unterschiedlichen elektrischen Ladungen führen, die dann aufgrund der Nähe zum Cystein 19 die Tertiär-/Quartärstruktur verändern und somit mitverantwortlich für die geringere Signalaktivierung sein könnten (121).

Da Croset und Kollegen zeigen konnten, dass es Unterschiede der Glykosylierung zwischen Proteinen gibt, die in HEK- und CHO Zellen produziert wurden, ist auch davon auszugehen, dass es ebenfalls Unterschiede zu humanen Zellen hinsichtlich der Glykosylierung gibt und somit die *in vitro* Situation die *in vivo* Situation nicht gänzlich abbildet (120). Für die Protein-Funktions-Experimente in dieser Arbeit ist dieser Effekt zu vernachlässigen, da es primär um die Unterschiede zwischen WT und Mutanten geht. Ähnlich wie bei den Messungen im ELISA ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Signalaktivierung sich in der *in vivo* Situation unterscheiden würde. Beispielsweise könnte sie je nach Menge der Sialinsäuren und einem daraus möglicherweise resultierenden schnelleren Abbau des Proteins noch geringer ausfallen. Dies wäre dann aber auch wieder für WT und Mutanten anzunehmen, sodass es für die Fragestellung in dieser Arbeit nur eine untergeordnete Rolle spielt.

5.4 Diskussion der Hypothesen im Hinblick auf die Funktionalität der Variante C105Vfs114X

Funktionelle Charakterisierung der C105Vfs114X Mutation

Für den TSHR ist bekannt, dass er durch Bindung von TSH unterschiedliche Signalwege aktivieren kann (92-94, 124). Aufgrund der erhobenen Daten kann man davon ausgehen, dass die hergestellten Mutanten und insbesondere die Mutation **C105Vfs114X** zu einer verringerten Aktivierung des Gs/Adenylatzyklase-Signalweges führen. Gleichzeitig zeigte keine der Mutanten eine Gs/Adenylatzyklase-Signalaktivierung unterhalb der Basalaktivität, was einen zunächst vermuteten invers-agonistischen Effekt ausschließt (60). Leider war es mit den angewandten Methoden nicht möglich, eine ausreichende Menge an TSH zu produzieren, um die Auswirkung der Mutation auf den Gq/11-Signalweg klar beurteilen zu können (60). Somit lässt sich nicht abschließend klären, ob Gq/11 für den schweren Phänotyp mitverantwortlich sein könnte (60). Die Ergebnisse des MAPK-Signalweg, welcher letztlich die Endstrecke verschiedener Signalwege (u.a. Gs und Gi) darstellt, zeigen keine Unterschiede zwischen Mutanten und WT. Anhand des angewendeten Assays lässt sich jedoch nicht untersuchen, ob dies für alle oder nur für einzelne Signalwege gilt. Da der durchgeführte cAMP-Assay zeigen konnte, dass die Gs/Adenylatzyklase-Signalisierung der Mutationen im Vergleich zum WT geringer ist, es jedoch keine Veränderungen im MAPK-Assay gab, könnte man spekulieren, dass die Mutante zu einer selektiven Funktionalität und somit beispielsweise zu einer höheren Gi Signalisierung verglichen mit dem WT führt (60). Selektive Funktionalität bzw. „biased signaling“ ist vor allem für G-Protein gekoppelte Rezeptoren beschrieben, die mehrere Signalwege aktivieren können (125). Sie bezeichnet die ligandenabhängige Selektivität für einen bestimmten Signalweg im Bezug auf ein endogenes Hormon bzw. Peptid an demselben Rezeptor (126, 127). Untersuchungen von Riccetti und Kollegen unterstützen diese Hypothese. Sie führten Studien am CG und LH durch und konnten eine selektive Funktionalität am gemeinsamen LHCG-Rezeptor (LHCGR) zeigen (128). Die beiden Hormonvarianten zeigten Unterschiede hinsichtlich ihrer Potenz, Effizienz und Kinetik am LHCGR und unterscheiden sich signifikant hinsichtlich der Länge und Komposition ihres C-Terminus (60, 128). Dieser Mechanismus könnte also auch in diesem Fall eine Rolle spielen und zumindest mitverantwortlich für den schweren Phänotyp sein.

Zusätzlich sprechen die Daten des MAPK-Assays dafür, dass das mutierte TSH mit einer großen Wahrscheinlichkeit an den TSHR bindet. Eine Untereinheit alleine würde den MAPK-Signalweg mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht induzieren (60). Eine fehlerhafte Heterodimerisierung beziehungsweise eine ausbleibende Bindung an den TSHR als Ursache des Phänotyps ist somit eher nicht anzunehmen. Des Weiteren zeigten Chen und Kollegen in Deletionsstudien der entsprechenden Disulfidbrückenbindung im CG, dass die Disulfidbrückenbindung nicht essentiell für die Heterodimerisierung, die Bindung an den Rezeptor und die folgende Signalisierung ist (129). Eine fehlerhafte Heterodimerisierung bzw. eine ausbleibende Bindung an den TSHR als Ursache des Phänotyps ist somit eher nicht anzunehmen.

Verkürzter C-Terminus und veränderte Aminosäuresequenz

Mit der Konstruktion der unterschiedlichen Varianten sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob der durch die Mutation **C105Vfs114X** bedingte verkürzte C-Terminus, die veränderte Aminosäuresequenz beziehungsweise eine dadurch resultierende gestörte Disulfidbrückenbindung für den schweren Phänotyp verantwortlich sein können.

Wäre der verkürzte C-Terminus oder die der Mutation folgende veränderte Aminosäuresequenz Ursache der schweren Hypothyreose, wäre zu erwarten gewesen, dass nur die beiden Frameshift Mutationen zu einer geringeren Aktivierung vor allem des Gs/Adenylatzyklase Signalweges am Rezeptor führen. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass alle generierten Varianten zu einer signifikant geringeren Signalaktivierung verglichen mit dem WT führen, es innerhalb der Mutanten aber keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Rezeptoraktivierung gibt (60). Somit lassen sich die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Medeiros-Neto, dass der verkürzte C-Terminus nicht Ursache des schweren Phänotyps ist, bestätigen (21). Ebenso sprechen die Ergebnisse der funktionellen Charakterisierung dagegen, dass die veränderte Aminosäuresequenz allein ursächlich ist. In diesem Fall hätte man wiederum erwartet, dass nur die Frameshift Mutationen Unterschiede zum WT aufweisen. Da dies jedoch nicht der Fall war und auch die Ergebnisse von Medeiros-Neto et al. dagegensprechen, wurde diese Hypothese nicht weiterverfolgt (21, 60).

Disulfidbrückenbindungen

Für alle konstruierten Mutanten gilt, dass die Disulfidbrückenbindung (Cys19-Cys105) in der β -Untereinheit gestört ist. Bei der Mutation **C105Vfs114X** wird das Cystein an Position 105 durch Valin ersetzt. Das Cystein an Position 19 verliert somit seinen Interaktionspartner und könnte deshalb eine falsch-positive Bindung zu einem anderen Cystein eingehen (60). Wäre dies der Fall, wäre eine geringe Signalisierung am TSHR nur bei den Varianten zu erwarten, bei denen das Cystein an Position 19 noch erhalten ist. Die Experimente zeigten jedoch, dass sowohl die Einfach-Mutation C19V, als auch die Doppel-Mutation C19V/C105V ähnliche Effekte hinsichtlich der Gs/Adenylatzyklase-Signalisierung am Rezeptor zeigen (60). Es ist somit davon auszugehen, dass das freie Cystein nicht für die funktionalen Veränderungen verantwortlich ist (60). Zusätzlich zeigte auch die Dreifach-Mutation C19V/C105Vfs114X keine Unterschiede im Hinblick auf die Signalisierung verglichen mit der Einfach- bzw. Doppel-Mutation (60).

Zusammenfassend lässt sich spekulieren, dass die Mutation zu einer Veränderung 3D-Struktur des Proteins führt. Diese Veränderung ist möglicherweise durch die fehlende Disulfidbrückenbindung bedingt und führt eventuell letztlich am TSHR zu einer veränderten Signalisierung im Vergleich zum WT. Im Rahmen der veränderten Signalisierung spielt möglicherweise eine funktionelle Selektivität der Mutanten eine Rolle, die zu einer verminderten Aktivierung des Gs-/Adenylatzyklase-Signalweges und zu einer vermehrten Aktivierung des Gi Signalwegs führen könnte. Dies könnte dann wiederum zumindest in Teilen den schweren Phänotyp erklären. Um diese Hypothese zu bestätigen oder zu verwerfen, bedarf es jedoch weiterführender Experimente mit weiteren Konstrukten bei denen die Disulfidbrückenbindung intakt ist. Beispielsweise könnte man durch ortsgerichtete Mutagenese das Valin dem WT entsprechend wieder durch ein Cystein ersetzen. Die darauffolgenden Aminosäuren und der vorzeitige Stopp würden jedoch der Patienten Mutation **C105Vfs114X** entsprechend erhalten bleiben. Würde sich dann eine Wiederherstellung der Signalisierungseigenschaften im Vergleich zur **C105Vfs114X** Mutationen zeigen, würde dies darauf hinweisen, dass die gestörte/fehlende Disulfidbrückenbindung zu einem veränderten Protein führt, das dann wiederum zu einer veränderten Signalisierung am Rezeptor führt. Außerdem ist es in weiteren Experimenten essentiell, eine ausreichende Menge an TSH herzustellen, um auch mögliche

Änderungen im Gq/11-Singalweg beurteilen zu können und somit mehr Aufschluss hinsichtlich einer möglichen funktionellen Selektivität zu erhalten.

5.5 Übertragbarkeit der *in vitro* Ergebnisse auf die *in vivo* Situation

Auch die Übertragbarkeit der *in vitro* auf die *in vivo* Situation muss weitergehend untersucht werden. Abgesehen von der Mutation **C105Vfs114X** ist keines der Konstrukte, die für diese Arbeit verwendet wurden, in der Natur bisher beschrieben. Daher lässt sich für diese Mutanten nicht sicher sagen, ob die *in vitro* Situation in dieser Arbeit auch die *in vivo* Situation beim Menschen abbildet und einen ähnlich schweren Phänotyp hervorrufen würde. Für eine Annäherung an diese Frage könnte man jedoch weitere beschriebene Mutationen im *TSHB* Gen funktionell charakterisieren. Andere bereits publizierte Mutationen im *TSHB* Gen beschreiben einen wesentlich milderen Phänotyp (36, 39-42). Keine dieser Mutationen wurde bisher allerdings funktionell charakterisiert. So wäre es bei weiterführenden Experimenten ebenfalls denkbar, die anderen bereits publizierten Mutationen in der β -Untereinheit, die zu einem milderen Phänotyp führen, mit robusten Methoden vergleichend funktionell zu charakterisieren. Da es sich beim TSHR um einen membranständigen Rezeptor handelt, ist auch nicht auszuschließen, dass der Zellverbund eine Rolle bei der Funktion spielt. So wäre es ebenfalls denkbar, in weiterführenden Experimenten die Versuche an Schilddrüsen-Organoiden durchzuführen anstatt in der Zellkultur mit einzelnen Zellen. Nicht zuletzt auch deswegen, weil sich tierexperimentelle Untersuchungen für diese Fragestellungen als ungeeignet herausgestellt haben. Die *TSHB*-Knockout Maus zeigt beispielsweise keine Schilddrüsenhypoplasie, wie sie bei Menschen mit TSH-Mangel in der Regel jedoch zu beobachten ist. Deswegen ist die Übertragbarkeit auf die *in vivo* Situation bei Experimenten an Mäusen eingeschränkt und könnte möglicherweise durch Organoide besser abgebildet werden.

5.6 Auswirkungen der freien α -Untereinheit

Mehrere Autoren, die die Mutationen in der β -Untereinheit des TSH beschrieben haben, berichteten auch, dass ein erhöhter Anteil an freier α -Untereinheit bei den Patienten messbar war (21, 30, 37, 130). Die Arbeitsgruppe um Matzuk et al. fand bereits 1988 heraus, dass die freie α -Untereinheit ausschlaggebend für die Sekretion der β -Untereinheit ist und deren Degradierung intrazellulär verhindert (23). Somit ist

es durchaus vorstellbar, dass der Anteil der freien α -Untereinheit bei Patienten mit der Mutation **C105Vfs114X** kompensatorisch steigt, um die die Sekretion der β -Untereinheit zu steigern und den Abbau des möglicherweise ohnehin eingeschränkten Peptids zu verhindern (21). Zudem konnte die Arbeitsgruppe von Grossmann et al. 1996 zeigen, dass sich das Verhältnis 3:1 von α -Untereinheit DNA zu β -Untereinheit DNA zu einer erhöhten Transfektionsrate als ein 1:1 Verhältnis führte (106). Dies ließ sich jedoch nur für die Produktion von hTSH in Säugerzell-Expressionssystem zeigen. Für die Produktion in Insektenzellen bewährte sich ein 1:1 Verhältnis von α -Untereinheit DNA zu β -Untereinheit DNA (71).

Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die freie α -Untereinheit der Glycoprotein hormone unter bestimmten Bedingungen Probleme bereiten kann. Beispielsweise berichteten Blithe und Kollegen, dass die Heterodimerisierung der freien α -Untereinheit mit der β -Untereinheit des humanen CG eingeschränkt ist (131). Sie gaben als wahrscheinlichste Ursache dafür eine veränderte N-Glykosylierung an, konnten aber eine veränderte O-Glykosylierung, wie sie bereits von Parsons et al. und Cole et al. diskutiert wurde, nicht ausschließen (132, 133).

Desweiteren produzieren HEK293-Zellen, wie sie in dieser Arbeit ebenfalls verwendet wurden, endogen freie α -Untereinheiten, die dann möglicherweise ebenfalls ein verändertes Glykosylierungsmuster aufweisen, was wiederum einen Einfluss auf die Heterodimerisierung des TSH haben könnte (134). Die maximale Expression und letztlich Produktion von TSH wäre somit eingeschränkt. Zudem wäre es denkbar, dass die endogen produzierten freien α -Untereinheiten aufgrund ihrer veränderten Glykosylierung nicht in der Lage sind, die produzierten TSH Moleküle vor der Degradierung zu schützen, wie es bei der Produktion von freien α -Untereinheiten durch transiente Transfektion von Matzuk et al. berichtet wurde (23).

Auf der anderen Seite könnte ein Überschuss an freien α -Untereinheiten bedingt durch die endogene Produktion einen Einfluss auf die Messung des TSH haben. Beinhaltet der Assay mindestens einen Antikörper, der gegen die α -Untereinheit des TSH gerichtet ist, könnte es sein, dass der Antikörper an die freien α -Untereinheiten andockt und die Antikörper „verbraucht“ sind, bevor sie an die α -Untereinheit des TSH andocken können. Es wäre dann möglich, dass der Assay einen viel niedrigeren TSH-Messwert aufweist, als die Menge an TSH β tatsächlich ist. Da auch in dieser Arbeit

HEK293-Zellen verwendet wurden, ist zu beachten, dass der TSH-Messwert des WT möglicherweise unterschätzt ist.

5.7 Vergleich mit der Arbeit von Medeiros-Neto et al. 1996

Die Arbeitsgruppe um Medeiros-Neto untersuchte die Mutation **C105Vfs114X** bereits 1996 molekularbiologisch. Alle anderen Arbeitsgruppen, die diese Mutation publizierten, beschränkten sich auf die Schilderung des Phänotyps und den Nachweis der Mutation. Medeiros-Neto et al. generierten 1996 neben dem WT-TSH und der Mutante **C105Vfs114X**, zwei weitere Mutanten (21). Einer der Mutanten endete durch Einbringen eines Stoppcodons nach dem Tyrosinrest an Position 112 (Y112). Eine weitere Mutante endete nach dem Cysteinrest an Position 105 (C105). Dabei bestimmten sie zum einen die biologische Aktivität, zum anderen die immunologische Aktivität des WT und der Mutanten. Diese setzten sie dann ins Verhältnis zueinander. Sie wiesen nach, dass die beiden Varianten mit dem vorzeitigen Stopp (Y112 und C105) eine erhöhte biologische zu immunologischer Aktivität im Vergleich zu WT hätten. Für die Mutante **C105Vfs114X** verhielt es sich invers. Sie zeigte eine verringerte biologische/immunologische Aktivität. Daraus schlossen sie, dass der vorzeitige Stopp nicht die Ursache der verminderten biologischen Aktivität der **C105Vfs114X** Mutation sein konnte (21). Auch in dieser Arbeit ließ sich nachweisen, dass der verkürzte C-Terminus zumindest nicht allein verantwortlich für den schweren Phänotyp ist. Jedoch sind die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Medeiros-Neto dennoch kritisch zu betrachten. Dass die beiden Mutanten Y112 und C105 jeweils eine erhöhte biologische Aktivität im Vergleich zum WT zeigen, ist nicht konform mit unseren Ergebnissen. In dieser Arbeit zeigten alle Mutanten eine geringere Signaltransduktion am Rezeptor. Medeiros-Neto und Kollegen zeigten bei den Ergebnissen der Verhältnisse der biologischen/immunologischen Aktivität weder eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve noch relative Expressionslevel des WT-TSH und der Mutanten. Somit wäre es vorstellbar, dass die Ergebnisse auf falschen Quantifizierungen der TSH-Mengen beruhen. Sie geben an, die Transfektionseffizienz des WT und der Mutanten durch Kotransfektion eines Konstrukts bestehend aus einem Herpes Thymidinkinase Promoter, der dem Growth Hormone (GH) Gen fusioniert war, bestimmt zu haben. Durch die jeweilige Menge des ausgeschütteten Growth Hormone wurde die Transfektionseffizienz abgeschätzt. Bis zum Zeitpunkt der Experimente gab

es keine Publikation, dass diese Methode auch in HEK293-Zellen, welche Medeiros-Neto verwendeten, erfolgreich etabliert werden konnte. Zudem berichtete die Arbeitsgruppe um Selden et al. 1986, dass es durchaus denkbar wäre, dass das ausgeschüttete hGH durch autokrine Prozesse mit den Antikörpern des Assays interagieren könnte und somit nicht die tatsächlichen Messwerte abbildet (135). Daher ist die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Methode durch den visuellen Vergleich zum Nachweis der Transfektionseffizienz verlässlicher. Nicht zuletzt, da die Daten zur Überwachung der Transfektionseffizienz von Medeiros-Neto nicht publiziert vorliegen. Hinzu kommt, dass Medeiros-Neto et al. zunächst einen cAMP-Assay mit unterschiedlichen Verdünnungen durchgeführt haben und diese Verdünnungen anschließend mit einem Chemilumineszenz Assay gemessen haben. Sie beschreiben dann, dass sie anhand einer Standardkurve des WT-TSH durch beide Verfahren auf die immunologische und biologische Aktivität geschlossen hätten. Dieser Rückschluss entspricht nicht sicher der realen Situation und war auch eines der Probleme, welche in dieser Arbeit kritisch diskutiert wurden. Hinzu kommt, dass auch Medeiros-Neto und Kollegen HEK293-Zellen verwendeten, die endogen freie α -Untereinheiten produzieren. Dass somit die immunologische Aktivität je nach verwendetem Antikörper überschätzt oder auch unterschätzt wurde, ist somit nicht auszuschließen.

6 Fazit und Ausblick

Seit über 20 Jahren beschäftigt die Mutation **C105Vfs114X** im *TSHB* Gen die Schilddrüsenforschung, da sie unerwartet zu einer schweren Hypothyreose bei Neugeborenen führen kann. Die molekularbiologische Ursache für diesen schwer ausgeprägten Phänotyp konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Auch in dieser Arbeit ist dies unter Einsatz verschiedener aktuell verfügbarer Methoden und Ressourcen nicht gelungen. Jedoch konnte erstmals ein invers-agonistischer Effekt des veränderten hTSH auf den Rezeptor in dieser Arbeit ausgeschlossen werden und es wurde bestätigt, dass ein verkürzter C-Terminus nicht die Ursache sein kann. Weiterführende Experimente, die zusätzliche Erkenntnisse zum Mechanismus der Mutation liefern könnten und die in der Diskussion bereits beschrieben wurden, konnten aufgrund des zeitlichen Rahmens der Dissertation nicht durchgeführt werden. Prinzipiell sind Untersuchungen, die G-Protein gekoppelte Rezeptoren umfassen, sehr komplex. Das liegt zum einen daran, dass sie unterschiedliche Signalwege aktivieren, aber auch am Aufbau einiger Liganden, die wie das TSH aus zwei Untereinheiten bestehen. Aufgrund dieses komplexen Zusammenspiels ist es beispielsweise bis heute nicht gelungen, eine Kristallstruktur für TSH/TSHR zu entwickeln. Da G-Protein gekoppelte Rezeptoren beim Menschen jedoch zahlreich vorkommen und Veränderungen der Signalisierung zu schweren Krankheitsbildern führen können, ist weitere Forschung auf diesem Gebiet fundamental.

Um einen Teil dazu beizutragen, wäre es in zukünftigen Projekten sehr interessant, zusätzliche Mutationen (inklusive anderer beim Menschen vorkommender Mutationen im *TSHB*-Gen) zu untersuchen, um weitere Erkenntnisse zum molekularbiologischen Mechanismus dieser Mutation zu erlangen. Zusätzlich sollte ein besonderes Augenmerk auf Mutationen, die eine intakte Disulfidbrückenbindung zwischen dem Cystein 19 und dem Cystein 105 aufweisen, zum Vergleich herangezogen werden, um einen möglichen Effekt belegen beziehungsweise ausschließen zu können. Zellbiologische Experimente unterliegen vielen Limitationen, die einen Rückschluss auf die *in vivo* Situation beim Menschen nur eingeschränkt ermöglichen. Da aber, wie bereits erwähnt, auch tierexperimentelle Untersuchungen die *in vivo* Situation beim Menschen nur bedingt abbilden können, ist es vielversprechender, den zellbiologischen Versuchsaufbau und die eingesetzten Methoden zu optimieren. So wäre es im Falle von weiterführenden Experimenten zur Mutation **C105Vfs114X**

notwendig, eine stabile Zelllinie zu entwickeln, die sowohl eine möglichst große Produktion von hTSH gewährleistet, jedoch mögliche Einflüsse hinsichtlich der unterschiedlichen Glykosylierungsmuster sowie endogenen Produktion von freien α -Untereinheiten minimiert. Könnte man die Produktion von TSH und die Aufbereitung des TSH so optimieren, dass sie sich anhand der Massenspektrometrie messen ließe, wäre dies mit Sicherheit die verlässlichste Methode der TSH-Bestimmung. Sie wäre unabhängig von Antikörpern, die häufig zu unterschiedlichen Messwerten des hTSH-WT führen. Zudem scheinen die Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden, Probleme zu haben, das mutierte TSH zu binden. Somit sollte versucht werden, in Zukunft die Messungen mit exakteren Methoden wie beispielsweise der Massenspektrometrie durchzuführen. Auch neuere Methoden wie beispielsweise *Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture* (SILAC) könnten eingesetzt werden, um bessere Aussagen zur Zellsignalisierung, posttranslationalen Modifikationen, sowie Protein-Protein-Interaktionen machen zu können und somit letztlich den zugrundeliegenden Mechanismus aufklären zu können. Ebenfalls denkbar wäre eine Kombination mit Methoden zur besseren Visualisierung, wie beispielsweise des *Live Cell Imaging* mit Hilfe von hochauflösenden Mikroskopen. Die Aufklärung des Mechanismus der Mutation **C105Vfs114X** ist trotz der Seltenheit der Erkrankung auch aus übergeordnetem Interesse sinnvoll. Das komplette Verständnis von Pathomechanismen seltener Erkrankungen kann auch wichtige Erkenntnisse für häufigere und andere Erkrankungen liefern.

So könnte man in diesem Fall nicht nur Patienten und deren Eltern bei eingeschränkter Entwicklung der Kinder eine Erklärung anbieten, sondern die Erkenntnisse könnten auch hinweisend für geeignetere konservative Therapien für Patienten mit einer Hyperthyreose, also einer Schilddrüsenüberfunktion geben, die oft noch durch eine Thyreoidektomie behandelt wird. Würde man den Mechanismus der Mutation vollständig verstehen, wäre es denkbar, sogenannte kleine Moleküle (small molecules) weiterzuentwickeln, die diesen Mechanismus exakt imitieren. Somit könnten diese einer Hyperthyreose entgegenwirken, indem sie die Wirkung stimulierender TSH-Antikörper inhibieren und gleichzeitig die häufig schweren Nebenwirkungen der Thyreostatika vermieden werden.

Neben der weiteren Untersuchung des molekularbiologischen Mechanismus der Mutation **C105Vfs114X** ist es auch wichtig, generell ein Bewusstsein für seltene

Erkrankungen zu schaffen. Registerstudien seltener Erkrankungen können zu diesem Bewusstsein ebenso wie zur Verbesserung der Diagnosestellung und Behandlung wesentlich beitragen. Durch Datenbanken ist heute eine strukturierte Datenerfassung oder Auswertung möglich. Dies kann den Austausch von Wissen zwischen Ärzten und Ärztinnen auf der ganzen Welt erleichtern und letztlich eine gezieltere Diagnostik und bessere sowie individuellere Behandlungsmöglichkeiten nach sich ziehen. Im Falle der untersuchten Mutation könnte eine solche Datenbank es Ärzten mit wenig Erfahrung im Umgang mit kongenitalen Hypothyreosen helfen, die Symptome als klinische Zeichen einer Hypothyreose in der Neugeborenenperiode zu erkennen und diagnostische Schritte sowie eine frühzeitige Substitution mit L-Thyroxin einzuleiten, um den beschriebenen schwerwiegenden Phänotyp abzuwenden. Auch die Einführung der zusätzlichen Messung von T4/ft4 im Rahmen des Neugeborenen Screenings wäre in einem wirtschaftlich gut aufgestellten Land wie Deutschland wünschenswert, um eine schwere Retardierung der betroffenen Kinder und die damit verbundenen Leiden für Patienten und Eltern zu verhindern.

7 Anhang

7.1 Primersequenzen

Tabelle 7.1: Übersicht über verwendete Primersequenzen

Name	Sequenz (5' → 3')
hTSH_A_F	AGAGAAGACTTGATCAAAATGGACT
hTSH_A_R	TCTGGTACCTTACGATTTGTGGTA
hTSH_B_F	AGAGGATCCAAAATGACCGCTTT
hTSH_B_R	TCTAAGCTTAGACTGAAAAGCCCACT
hTSH_MutC105Vfs_F	AGAGGATCCAAAATGACTGCCTTGT
hTSH_MutC105Vfs_R	GCTAAGCTTACCAGATCAAAGAGCGGA
hThyrostimulin_B_F	CGAGGATCCAAAATGAAGCTGGCGT
hThyrostimulin_B_R	TCTAAGCTTAAATCGTTTCGCACTCT
pFastDual-BamHI	TAAAATGATAACCATCTCGC
PFastDual-BbsI	CCTTTAATTCAACCCAACAC
hTSH_fs_V105C_Mut_F	GAAGCCATCAAGACAAACTACTGCCCAAACCTCAGAAG TCTTATC
hTSH_fs_V105C_Mut_R	GATAAGACTTCTGAGGTTTGGGCAGTAGTTTGTCTTGA TGGCTTC
TSH-beta-mut_WT_V 39C_F	GAGAGAGTGTGCTTATTGCCTAACCATCAACACC
TSH-beta-mut_WT_V 39C_R	GGTGTTGATGGTTAGGCAATAAGCACACTCTCTC
TSHB_C105Cfs_F	CCATCAAGACAAACTACTGTCCAAACCTC
TSHB_C105Vfs_R	GTAGTTTGTCTTGATGGCTTCATGTATGC
TSHB_C105V_F	CCATCAAGACAAACTACGTTACCAAACCTC
TSHB_C105V_R	GTAGTTTGTCTTGATGGCTTCATGTATGC
TSHB_C19V_F	GGAGAGAGTGTGCTTATGTCCTAACCATC
TSHB_C19V_R	GACATAAGCACACTCTCTCCTTTTCGATG
TSHB_C19V_C105V_F	GGAGAGAGTGTGCTTATGTCCTAACCATC
TSHB_C19V_C105V_R	GACTTCTGAGGTTTGGTAACGTAGTTTGTGTC
TSHB_C19V_C105Vfs_F	GGAGAGAGTGTGCTTATGTCCTAACCATC
TSHB_C19V_C105Vfs_R	GACTTCTGAGGTTTGGTACGTAGTTTGTGTC
TSHB_C105Vfs_mod_F	CCTCAGAAGTCTTATCTGGTATGGATTTTCTGTCGTGA GCAAG
TSHB_C105Vfs_mod_R	CTTGCTCACGACAGAAAATCCATACCAGATAAGACTTC TGAGG
TSHB_C19V_C105Vfs_mod_F	CCTCAGAAGTCTTATCTGGTATGGATTTTCTGTCGTGA GCAAG
TSHB_C19V_C105Vfs_mod_R	CTTGCTCACGACAGAAAATCCATACCAGATAAGACTTC TGAGG
Lin_TSHB_F	ACCAAACCTCAGAAGTCTTATCTGG
Lin_TSHB_R	ATAAGCACACTCTCTCCTTTTCGATG

7.2 Plasmide und Vektorkarten

Plasmide

Tabelle 7.2: Übersicht über verwendete Plasmide

Vektor	Gen
pcDNA3	hTSH-alpha
pcDNA3	hTSH-beta
pcDNA3	hTSH-C105Vfs
AmCyan-P2A-mCherry	hTSH-beta
AmCyan-P2A-mCherry	hTSH-C105Vfs
AmCyan-P2A-mCherry	hTSH-C105V
AmCyan-P2A-mCherry	hTSH-C19V
AmCyan-P2A-mCherry	hTSH-C19V,C105V
AmCyan-P2A-mCherry	hTSH-C19V,C105Vfs
pFastBacDual	hTSH-alpha
pFastBacDual	hTSH-beta
pFastBacDual	hTSH-C105Vfs
pFastBacDual	hTS-alpha
pFastBacDual	hTS-beta

Die Plasmide in dem AmCyan-P2A-mCherry Vektor wurden uns freundlicherweise von unseren Kooperationspartnern, der Arbeitsgruppe um Adolfo Rivero-Müller angefertigt und zur Verfügung gestellt (60, 99).

Vektorkarten

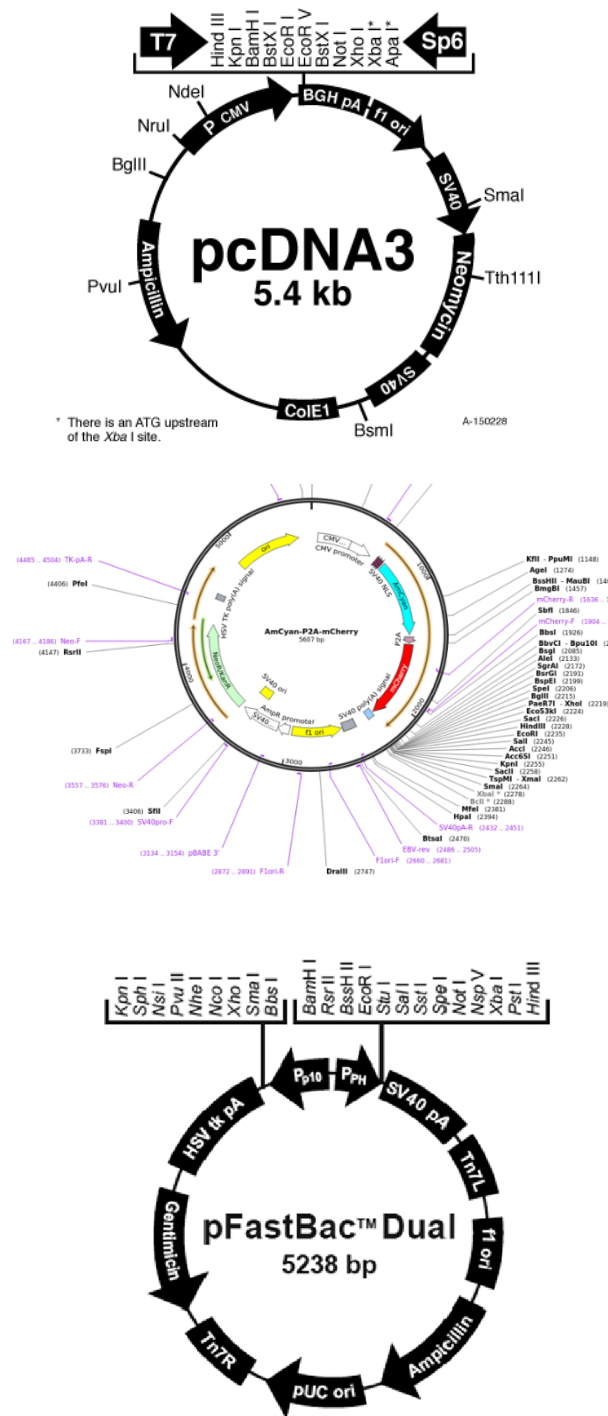


Abbildung 7.1: Übersicht über die verwendeten Vektoren. hTSH und die Mutante C105Vfs114X wurde zunächst in den pcDNA3 Vektor (oben) kloniert. Später zur Proteinquantifizierung wurden hTSH-WT und alle Mutanten in den AmCyan-P2A-mCherry Vektor (mittig) kloniert. Für Experimente in Insektenzellen wurde der pFastBacDual Vektor (unten) verwendet.

7.3 Sequenzen der verwendeten Gene

CGA (homo sapiens); NM_000735; 350 bp (CDS)

CCATGGATTACTACAGAAAATATGCAGCTATCTTTCTGGTCACATTGTTCGGTGTTCCTGCATGTTCTCCATTCCGCTCCTGATGTGCAGGATTGCCAGAATGCACGCTACAGGAAAACCCATTCTTCTCCAGCCGGGTGCCCAATACTTCAGTGCATGGGCTGCTGCTTCTCTAGAGCATATCCCCTCCACTAAGGTCCAAGAAGACGATGTTGGTCCAAAAGAACGTCACCTCAGAGTCCACTTGCTGTGTAGCTAATCATATAACAGGGTCACAGTAATGGGGGGTTTCAAAGTGGAGAACCACACGGCGTGCCACTGCAGTACTTGTTATTATCACAAATCT TAA

TSHB (homo sapiens); NM_000549; 416 bp (CDS)

ATGACTGCTCTCTTTCTGATGTCCATGCTTTTTGGCCTTACATGTGGGCAAGCGATGTCTTTTTGTATTCCAACCTGAGTATACAATGCACATCGAAAGGAGAGAGTGTGCTTATTGCCTAACCATCAACACACCATCTGTGCTGGATATTGTATGACACGGGATATCAATGGCAAACCTGTTTCTTCCCAAATATGCTGTGCCAGGATGTTTGCACATATAGAGACTTCATCTACAGGACTGTAGAAATACCAGGATGCCACTCCATGTTGCTCCCTATTTTTCTATCCTGTTGCTTTAAGCTGTAAGTGTGGCAAGTGAATACTGACTATAGTACTGCATACATGAAGCCATCAAGACAACTACTGTACCAAACCTCAGAAGTCTTATCTGGTAGGATTTTCTGTCTAA

GPHA2 (homo sapiens); NM_130769; 390 bp (CDS)

ATGCCTATGGCGTCCCCTCAAACCCTGGTCCTCTATCTGCTGGTCCTGGCAGTCACTGAAGCCTGGGCCAGGAGGCAGTCATCCCAGGCTGCCACTTGACCCCTTCAATGTGACAGTGCGAAGTGACCGCCAAGGCACCTGCCAGGGCTCCCACGTGGCACAGGCCTGTGTGGGCCACTGTGAGTCCAGCGCCTTCCCTTCTCGGTAATCTGTGCTGGTGGCCAGTGGTTACCGACACAACATCACCTCCGTCTCTCAGTGTGCACCATCAGTGGCCTGAAGAAGGTCAAAGTACAGCTGCAGTGTGTGGGGAGCCGGAGGGAGGAGCTCGAGATCTTCACGGCCAGGGCCTGCCAGTGTGACATGTGTCGCCTCTCTCGCTACTAG

GPHB5 (homo sapiens); NM_145171; 393 bp (CDS)

ATGAAGCTGGCATTCTCTTCTTGGCCCCATGGCCCTCCTCCTTCTGGCTGGCTATGGCTGTGTCCTCGGTGCCTCCAGTGGGAACCTGCGCACCTTTGTGGGCTGTGCCGTGAGGGAGTTTACTTTCTGGCCAAGAAGCCAGGCTGCAGGGCCTTCGGATCACCACGGATGCCTGCTGGGGTTCGCTGTGAGACCTGGGAGAAACCCATTCTGGAACCCCCCTATATTGAAGCCATCATCGAGTCTGTACCTACAACGAGACCAAACAGGTGACTGTCAAGCTGCCAACTGTGCCCGGGAGTCGACCCCTTCTACACCTATCCCGTGGCCATCCGCTGTGACTGCGGAGCCTGCTCCACTGCCACCACGGAGTGTGAGACCATCTGAGGCCGCTAG

7.4 Fragebogen

Pat.	Mutation	Alter bei Diagnose	T4/FT4 bei Diagnose	Hypothyreose bei Geschwistern/ Eltern	Entwicklungsalter bei Diagnose	Art des Entwicklungstests	IQ	Entwicklung	Schule
1	C105Vfs114X	15 Monate	n.d.	nein	3 Monate	Klinisch	n.d.	Schwere mentale Retardierung	Sonderschule
2	C105Vfs114X	9 Monate	ft4: 0,2 ng/dl	Nein	3 Monate	Klinisch	n.d.	Moderate mentale Retardierung (erkennt mit 9 Jahren Buchstaben und Zahlen)	Sonderschule
3	C105Vfs114X	1 Mo, 25 Tage	T4: < 1 µg/dl ft4: < 0,1 ng/dl	Nein	1 Monat	<u>Vineland Scale</u> Anpassungsfähiges Verhalten: moderat niedrig; Alltags-Fähigkeiten: normal; Sozialisation: normal Motorische Fähigkeiten: normal <u>Gessel</u> Anpassungsfähiges Verhalten: 92; Grobmotorik: 96 Feinmotorik: 92 Sprache: 84 Psychosozial: 92	91	Keine Retardierung	Noch keine
4	C105Vfs114X	3 Monate 13 Tage	T4: > 1 µg/dl T3: 21 ng/ml	Nein	Neugeboren	DSMIV (mit 12,3 Jahren) Leichte mentale Retardierung	n.d.	Leichte mentale Retardierung	Sonderschule
5	C105Vfs114X	3 Monate 6 Tage	T4: < 1 µg/dl ft4: < 1 ng/dl	Nein	Neugeboren	Wechsler Intelligenztest für Kinder (mit 11 Jahren) Verbal: IQ 55 Per Verarbeitungsgeschwindigkeit: 61 Ablenkung: 67 Global: 59	59	Schwere mentale Retardierung	Sonderschule

Abbildung 7.2: Verwendete Fragebogen. Dieser Fragebogen wurde an alle Autoren verschickt, die einen Fall mit der Mutation C105Vfs114X publiziert hatten, um genauere Angaben zu dem Zeitpunkt der Diganose, den Symptomen und dem Outcome zu erhalten. Nur einer der Autoren hat den Fragebogen jedoch ausgefüllt zurückgeschickt.

8 Literaturverzeichnis

1. Gruters A, Biebermann H, Krude H. Neonatal thyroid disorders. *Hormone research*. 2003;59 Suppl 1:24-9.
2. Kleinau G, Kalveram L, Kohrle J, Szkudlinski M, Schomburg L, Biebermann H, Gruters-Kieslich A. Minireview: Insights Into the Structural and Molecular Consequences of the TSH-beta Mutation C105Vfs114X. *Molecular endocrinology*. 2016;30(9):954-64.
3. Iddah MA, Macharia BN. Autoimmune thyroid disorders. *ISRN Endocrinol*. 2013;2013:509764.
4. Grasberger H, Refetoff S. Genetic causes of congenital hypothyroidism due to dyshormonogenesis. *Current opinion in pediatrics*. 2011;23(4):421-8.
5. Brown RS, Bellisario RL, Botero D, Fournier L, Abrams CA, Cowger ML, David R, Fort P, Richman RA. Incidence of transient congenital hypothyroidism due to maternal thyrotropin receptor-blocking antibodies in over one million babies. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1996;81(3):1147-51.
6. Nishiyama S, Mikeda T, Okada T, Nakamura K, Kotani T, Hishinuma A. Transient hypothyroidism or persistent hyperthyrotropinemia in neonates born to mothers with excessive iodine intake. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2004;14(12):1077-83.
7. Klein AH, Meltzer S, Kenny FM. Improved prognosis in congenital hypothyroidism treated before age three months. *The Journal of pediatrics*. 1972;81(5):912-5.
8. Gruters A, Krude H. Detection and treatment of congenital hypothyroidism. *Nature reviews Endocrinology*. 2011;8(2):104-13.
9. Aleksander PE, Bruckner-Spieler M, Stoehr AM, Lankes E, Kuhnen P, Schnabel D, Ernert A, Stablein W, Craig ME, Blankenstein O, Gruters A, Krude H. Mean High-Dose l-Thyroxine Treatment Is Efficient and Safe to Achieve a Normal IQ in Young Adult Patients With Congenital Hypothyroidism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2018;103(4):1459-69.
10. Hanna CE, Krainz PL, Skeels MR, Miyahira RS, Sesser DE, LaFranchi SH. Detection of congenital hypopituitary hypothyroidism: ten-year experience in the Northwest Regional Screening Program. *The Journal of pediatrics*. 1986;109(6):959-64.
11. Kempers MJ, Lanting CI, van Heijst AF, van Trotsenburg AS, Wiedijk BM, de Vijlder JJ, Vulsma T. Neonatal screening for congenital hypothyroidism based on thyroxine, thyrotropin, and thyroxine-binding globulin measurement: potentials and pitfalls. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91(9):3370-6.
12. van Tijn DA, de Vijlder JJ, Verbeeten B, Jr., Verkerk PH, Vulsma T. Neonatal detection of congenital hypothyroidism of central origin. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(6):3350-9.
13. Tatsumi K, Miyai K, Notomi T, Kaibe K, Amino N, Mizuno Y, Kohno H. Cretinism with combined hormone deficiency caused by a mutation in the PIT1 gene. *Nature genetics*. 1992;1(1):56-8.

14. Netchine I, Sobrier ML, Krude H, Schnabel D, Maghnie M, Marcos E, Duriez B, Cacheux V, Moers A, Goossens M, Gruters A, Amselem S. Mutations in LHX3 result in a new syndrome revealed by combined pituitary hormone deficiency. *Nature genetics*. 2000;25(2):182-6.
15. Wu W, Cogan JD, Pfaffle RW, Dasen JS, Frisch H, O'Connell SM, Flynn SE, Brown MR, Mullis PE, Parks JS, Phillips JA, 3rd, Rosenfeld MG. Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nature genetics*. 1998;18(2):147-9.
16. Garcia M, Fernandez A, Moreno JC. Central hypothyroidism in children. *Endocrine development*. 2014;26:79-107.
17. Joustra SD, van Trotsenburg AS, Sun Y, Losekoot M, Bernard DJ, Biermasz NR, Oostdijk W, Wit JM. IGSF1 deficiency syndrome: A newly uncovered endocrinopathy. *Rare diseases*. 2013;1:e24883.
18. Sun Y, Bak B, Schoenmakers N, van Trotsenburg AS, Oostdijk W, Voshol P, Cambridge E, White JK, le Tissier P, Gharavy SN, Martinez-Barbera JP, Stokvis-Brantsma WH, Vulsma T, Kempers MJ, Persani L, Campi I, Bonomi M, Beck-Peccoz P, Zhu H, Davis TM, Hokken-Koelega AC, Del Blanco DG, Rangasami JJ, Ruivenkamp CA, Laros JF, Kriek M, Kant SG, Bosch CA, Biermasz NR, Appelman-Dijkstra NM, Corssmit EP, Hovens GC, Pereira AM, den Dunnen JT, Wade MG, Breuning MH, Hennekam RC, Chatterjee K, Dattani MT, Wit JM, Bernard DJ. Loss-of-function mutations in IGSF1 cause an X-linked syndrome of central hypothyroidism and testicular enlargement. *Nature genetics*. 2012;44(12):1375-81.
19. Koulouri O, Nicholas AK, Schoenmakers E, Mokrosinski J, Lane F, Cole T, Kirk J, Farooqi IS, Chatterjee VK, Gurnell M, Schoenmakers N. A Novel Thyrotropin-Releasing Hormone Receptor Missense Mutation (P81R) in Central Congenital Hypothyroidism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2016;101(3):847-51.
20. Schoenmakers N, Alatzoglou KS, Chatterjee VK, Dattani MT. Recent advances in central congenital hypothyroidism. *The Journal of endocrinology*. 2015;227(3):R51-71.
21. Medeiros-Neto G, Herodotou DT, Rajan S, Kommareddi S, de Lacerda L, Sandrini R, Boguszewski MC, Hollenberg AN, Radovick S, Wondisford FE. A circulating, biologically inactive thyrotropin caused by a mutation in the beta subunit gene. *The Journal of clinical investigation*. 1996;97(5):1250-6.
22. Klinke R, Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S. *Physiologie*: Georg Thieme Verlag; 2009.
23. Matzuk MM, Kornmeier CM, Whitfield GK, Kourides IA, Boime I. The glycoprotein alpha-subunit is critical for secretion and stability of the human thyrotropin beta-subunit. *Molecular endocrinology*. 1988;2(2):95-100.
24. Carvalho DP, Dupuy C. Thyroid hormone biosynthesis and release. *Molecular and cellular endocrinology*. 2017;458:6-15.
25. Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest*. 2012;122(9):3035-43.
26. Obregon MJ. Adipose tissues and thyroid hormones. *Front Physiol*. 2014;5:479.

27. Prezioso G, Giannini C, Chiarelli F. Effect of Thyroid Hormones on Neurons and Neurodevelopment. *Horm Res Paediatr.* 2018;90(2):73-81.
28. Bassett JH, Williams GR. Role of Thyroid Hormones in Skeletal Development and Bone Maintenance. *Endocr Rev.* 2016;37(2):135-87.
29. Szkudlinski MW, Fremont V, Ronin C, Weintraub BD. Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiological reviews.* 2002;82(2):473-502.
30. Fiddes JC, Goodman HM. The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones. *Journal of molecular and applied genetics.* 1981;1(1):3-18.
31. Wondisford FE, Usala SJ, DeCherney GS, Castren M, Radovick S, Gyves PW, Trempe JP, Kerfoot BP, Nikodem VM, Carter BJ, et al. Cloning of the human thyrotropin beta-subunit gene and transient expression of biologically active human thyrotropin after gene transfection. *Molecular endocrinology.* 1988;2(1):32-9.
32. Tatsumi K, Hayashizaki Y, Hiraoka Y, Miyai K, Matsubara K. The structure of the human thyrotropin beta-subunit gene. *Gene.* 1988;73(2):489-97.
33. Hayashizaki Y, Hiraoka Y, Endo Y, Miyai K, Matsubara K. Thyroid-stimulating hormone (TSH) deficiency caused by a single base substitution in the CAGYC region of the beta-subunit. *The EMBO journal.* 1989;8(8):2291-6.
34. Hayashizaki Y, Hiraoka Y, Tatsumi K, Hashimoto T, Furuyama J, Miyai K, Nishijo K, Matsuura M, Kohno H, Labbe A, et al. Deoxyribonucleic acid analyses of five families with familial inherited thyroid stimulating hormone deficiency. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 1990;71(4):792-6.
35. Mori R, Sawai T, Kinoshita E, Baba T, Matsumoto T, Yoshimoto M, Tsuji Y, Satake Y, Sawada K. Rapid detection of a point mutation in thyroid-stimulating hormone beta-subunit gene causing congenital isolated thyroid-stimulating hormone deficiency. *Jinrui idengaku zasshi The Japanese journal of human genetics.* 1991;36(4):313-6.
36. Dacou-Voutetakis C, Feltquate DM, Drakopoulou M, Kourides IA, Dracopoli NC. Familial hypothyroidism caused by a nonsense mutation in the thyroid-stimulating hormone beta-subunit gene. *American journal of human genetics.* 1990;46(5):988-93.
37. Bonomi M, Proverbio MC, Weber G, Chiumello G, Beck-Peccoz P, Persani L. Hyperplastic pituitary gland, high serum glycoprotein hormone alpha-subunit, and variable circulating thyrotropin (TSH) levels as hallmark of central hypothyroidism due to mutations of the TSH beta gene. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2001;86(4):1600-4.
38. Pohlenz J, Dumitrescu A, Aumann U, Koch G, Melchior R, Prawitt D, Refetoff S. Congenital secondary hypothyroidism caused by exon skipping due to a homozygous donor splice site mutation in the TSHbeta-subunit gene. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2002;87(1):336-9.
39. Sertedaki A, Papadimitriou A, Voutetakis A, Dracopoulou M, Maniati-Christidi M, Dacou-Voutetakis C. Low TSH congenital hypothyroidism: identification of a novel mutation of the TSH beta-subunit gene in one sporadic case (C85R) and of mutation

Q49stop in two siblings with congenital hypothyroidism. *Pediatric research*. 2002;52(6):935-41.

40. Morales AE, Shi JD, Wang CY, She JX, Muir A. Novel TSHbeta subunit gene mutation causing congenital central hypothyroidism in a newborn male. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM*. 2004;17(3):355-9.

41. Baquedano MS, Ciaccio M, Dujovne N, Herzovich V, Longueira Y, Warman DM, Rivarola MA, Belgorosky A. Two novel mutations of the TSH-beta subunit gene underlying congenital central hypothyroidism undetectable in neonatal TSH screening. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(9):E98-103.

42. Hermanns P, Couch R, Leonard N, Klotz C, Pohlenz J. A novel deletion in the thyrotropin Beta-subunit gene identified by array comparative genomic hybridization analysis causes central congenital hypothyroidism in a boy originating from Turkey. *Hormone research in paediatrics*. 2014;82(3):201-5.

43. Ozhan B, Boz Anlas O, Sarikepe B, Albuz B, Semerci Gunduz N. Congenital Central Hypothyroidism Caused by a Novel Thyroid-Stimulating Hormone-Beta Subunit Gene Mutation in Two Siblings. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2017;9(3):278-82.

44. Doeker BM, Pfaffle RW, Pohlenz J, Andler W. Congenital central hypothyroidism due to a homozygous mutation in the thyrotropin beta-subunit gene follows an autosomal recessive inheritance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1998;83(5):1762-5.

45. Heinrichs C, Parma J, Scherberg NH, Delange F, Van Vliet G, Duprez L, Bourdoux P, Bergmann P, Vassart G, Refetoff S. Congenital central isolated hypothyroidism caused by a homozygous mutation in the TSH-beta subunit gene. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2000;10(5):387-91.

46. Brumm H, Pfeufer A, Biebermann H, Schnabel D, Deiss D, Gruters A. Congenital central hypothyroidism due to homozygous thyrotropin beta 313 Delta T mutation is caused by a Founder effect. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002;87(10):4811-6.

47. McDermott MT, Haugen BR, Black JN, Wood WM, Gordon DF, Ridgway EC. Congenital isolated central hypothyroidism caused by a "hot spot" mutation in the thyrotropin-beta gene. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2002;12(12):1141-6.

48. Deladoey J, Vuissoz JM, Domene HM, Malik N, Gruneiro-Papendieck L, Chiesa A, Heinrich JJ, Mullis PE. Congenital secondary hypothyroidism due to a mutation C105Vfs114X thyrotropin-beta mutation: genetic study of five unrelated families from Switzerland and Argentina. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2003;13(6):553-9.

49. Felner EI, Dickson BA, White PC. Hypothyroidism in siblings due to a homozygous mutation of the TSH-beta subunit gene. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM*. 2004;17(4):669-72.

50. Domene HM, Gruneiro-Papendieck L, Chiesa A, Iorcansky S, Herzovich VC, Papazian R, Forclaz V, Prieto L, Sanso G, Scaglia P, Bre M, Chamoux A, Heinrich JJ. The C105fs114X is the prevalent thyrotropin beta-subunit gene mutation in

Argentinean patients with congenital central hypothyroidism. *Hormone research*. 2004;61(1):41-6.

51. Karges B, LeHeup B, Schoenle E, Castro-Correia C, Fontoura M, Pfaffle R, Andler W, Debatin KM, Karges W. Compound heterozygous and homozygous mutations of the TSHbeta gene as a cause of congenital central hypothyroidism in Europe. *Hormone research*. 2004;62(3):149-55.

52. Partsch CJ, Riepe FG, Krone N, Sippell WG, Pohlenz J. Initially elevated TSH and congenital central hypothyroidism due to a homozygous mutation of the TSH beta subunit gene: case report and review of the literature. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 2006;114(5):227-34.

53. Biebermann H, Liesenkotter KP, Emeis M, Oblanden M, Gruters A. Severe congenital hypothyroidism due to a homozygous mutation of the betaTSH gene. *Pediatric research*. 1999;46(2):170-3.

54. Ramos HE, Labedan I, Carre A, Castanet M, Guemas I, Tron E, Madhi F, Delacourt C, Maciel RM, Polak M. New cases of isolated congenital central hypothyroidism due to homozygous thyrotropin beta gene mutations: a pitfall to neonatal screening. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2010;20(6):639-45.

55. Nicholas AK, Jaleel S, Lyons G, Schoenmakers E, Dattani MT, Crowne E, Bernhard B, Kirk J, Roche EF, Chatterjee VK, Schoenmakers N. Molecular spectrum of TSHbeta subunit gene defects in central hypothyroidism in the UK and Ireland. *Clinical endocrinology*. 2017;86(3):410-8.

56. Drees JC, Stone JA, Reamer CR, Arboleda VE, Huang K, Hrynkow J, Greene DN, Petrie MS, Hoke C, Lorey TS, Dlott RS. Falsely undetectable TSH in a cohort of South Asian euthyroid patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(4):1171-9.

57. Pappa T, Johannesen J, Scherberg N, Torrent M, Dumitrescu A, Refetoff S. A TSHbeta Variant with Impaired Immunoreactivity but Intact Biological Activity and Its Clinical Implications. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2015;25(8):869-76.

58. Grant DB, Smith I, Fuggle PW, Tokar S, Chapple J. Congenital hypothyroidism detected by neonatal screening: relationship between biochemical severity and early clinical features. *Arch Dis Child*. 1992;67(1):87-90.

59. Gruters A. Congenital hypothyroidism. *Pediatr Ann*. 1992;21(1):15, 8-21, 4-8.

60. Kalveram L, Kleinau G, Szymanska K, Scheerer P, Rivero-Muller A, Gruters-Kieslich A, Biebermann H. The Pathogenic TSH beta-subunit Variant C105Vfs114X Causes a Modified Signaling Profile at TSHR. *Int J Mol Sci*. 2019;20(22).

61. Kapp K, Schrempp S, Lemberg MK, Dobberstein B. Post-targeting functions of signal peptides. *Madame Curie Bioscience Database [Internet]: Landes Bioscience*; 2013.

62. Rawlins ML, Roberts WL. Performance characteristics of six third-generation assays for thyroid-stimulating hormone. *Clin Chem*. 2004;50(12):2338-44.

63. Beckett G, MacKenzie F. Thyroid guidelines - are thyroid-stimulating hormone assays fit for purpose? *Annals of clinical biochemistry*. 2007;44(Pt 3):203-8.
64. Dussault JH, Morissette J, Letarte J, Guyda H, Laberge C. Modification of a screening program for neonatal hypothyroidism. *The Journal of pediatrics*. 1978;92(2):274-7.
65. Leger J, Olivieri A, Donaldson M, Torresani T, Krude H, van Vliet G, Polak M, Butler G, Espe Pes Slep Jspe Apeg Appes I, Congenital Hypothyroidism Consensus Conference G. European Society for Paediatric Endocrinology consensus guidelines on screening, diagnosis, and management of congenital hypothyroidism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(2):363-84.
66. Zwaveling-Soonawala N, van Trotsenburg AS, Verkerk PH. The severity of congenital hypothyroidism of central origin should not be underestimated. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015;100(2):E297-300.
67. Hearn MT, Gomme PT. Molecular architecture and biorecognition processes of the cystine knot protein superfamily: part I. The glycoprotein hormones. *Journal of molecular recognition : JMR*. 2000;13(5):223-78.
68. Jiang X, Dias JA, He X. Structural biology of glycoprotein hormones and their receptors: insights to signaling. *Molecular and cellular endocrinology*. 2014;382(1):424-51.
69. Laphorn AJ, Harris DC, Littlejohn A, Lustbader JW, Canfield RE, Machin KJ, Morgan FJ, Isaacs NW. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature*. 1994;369(6480):455-61.
70. Baenziger JU, Green ED. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim Biophys Acta*. 1988;947(2):287-306.
71. Grossmann M, Wong R, Teh NG, Tropea JE, East-Palmer J, Weintraub BD, Szkudlinski MW. Expression of biologically active human thyrotropin (hTSH) in a baculovirus system: effect of insect cell glycosylation on hTSH activity in vitro and in vivo. *Endocrinology*. 1997;138(1):92-100.
72. Okada SL, Ellsworth JL, Durnam DM, Haugen HS, Holloway JL, Kelley ML, Lewis KE, Ren H, Sheppard PO, Storey HM, Waggie KS, Wolf AC, Yao LY, Webster PJ. A glycoprotein hormone expressed in corticotrophs exhibits unique binding properties on thyroid-stimulating hormone receptor. *Molecular endocrinology*. 2006;20(2):414-25.
73. Nakabayashi K, Matsumi H, Bhalla A, Bae J, Mosselman S, Hsu SY, Hsueh AJ. Thyrostimulin, a heterodimer of two new human glycoprotein hormone subunits, activates the thyroid-stimulating hormone receptor. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(11):1445-52.
74. Rocco DA, Paluzzi JP. Functional role of the heterodimeric glycoprotein hormone, GPA2/GPB5, and its receptor, LGR1: An invertebrate perspective. *General and comparative endocrinology*. 2016;234:20-7.
75. Okajima Y, Nagasaki H, Suzuki C, Suga H, Ozaki N, Arima H, Hamada Y, Civelli O, Oiso Y. Biochemical roles of the oligosaccharide chains in thyrostimulin, a

heterodimeric hormone of glycoprotein hormone subunits alpha 2 (GPA2) and beta 5 (GPB5). *Regul Pept.* 2008;148(1-3):62-7.

76. Furuhashi M, Ando H, Bielinska M, Pixley MR, Shikone T, Hsueh AJ, Boime I. Mutagenesis of cysteine residues in the human gonadotropin alpha subunit. Roles of individual disulfide bonds in secretion, assembly, and biologic activity. *The Journal of biological chemistry.* 1994;269(41):25543-8.

77. Bedows E, Huth JR, Sukanuma N, Bartels CF, Boime I, Ruddon RW. Disulfide bond mutations affect the folding of the human chorionic gonadotropin-beta subunit in transfected Chinese hamster ovary cells. *The Journal of biological chemistry.* 1993;268(16):11655-62.

78. Themmen AP. An update of the pathophysiology of human gonadotrophin subunit and receptor gene mutations and polymorphisms. *Reproduction.* 2005;130(3):263-74.

79. Themmen APN, Huhtaniemi IT. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocrine reviews.* 2000;21(5):551-83.

80. Weiss J, Axelrod L, Whitcomb RW, Harris PE, Crowley WF, Jameson JL. Hypogonadism caused by a single amino acid substitution in the beta subunit of luteinizing hormone. *The New England journal of medicine.* 1992;326(3):179-83.

81. Basciani S, Watanabe M, Mariani S, Passeri M, Persichetti A, Fiore D, Scotto d'Abusco A, Caprio M, Lenzi A, Fabbri A, Gnassi L. Hypogonadism in a patient with two novel mutations of the luteinizing hormone beta-subunit gene expressed in a compound heterozygous form. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2012;97(9):3031-8.

82. Matthews CH, Borgato S, Beck-Peccoz P, Adams M, Tone Y, Gambino G, Casagrande S, Tedeschini G, Benedetti A, Chatterjee VK. Primary amenorrhoea and infertility due to a mutation in the beta-subunit of follicle-stimulating hormone. *Nature genetics.* 1993;5(1):83-6.

83. Layman LC, Lee EJ, Peak DB, Namnoum AB, Vu KV, van Lingen BL, Gray MR, McDonough PG, Reindollar RH, Jameson JL. Delayed puberty and hypogonadism caused by mutations in the follicle-stimulating hormone beta-subunit gene. *The New England journal of medicine.* 1997;337(9):607-11.

84. Lindstedt G, Nystrom E, Matthews C, Ernest I, Janson PO, Chatterjee K. Follitropin (FSH) deficiency in an infertile male due to FSHbeta gene mutation. A syndrome of normal puberty and virilization but underdeveloped testicles with azoospermia, low FSH but high lutropin and normal serum testosterone concentrations. *Clinical chemistry and laboratory medicine.* 1998;36(8):663-5.

85. Kleinau G, Krause G. Thyrotropin and homologous glycoprotein hormone receptors: structural and functional aspects of extracellular signaling mechanisms. *Endocrine reviews.* 2009;30(2):133-51.

86. Kleinau G, Neumann S, Gruters A, Krude H, Biebermann H. Novel Insights on Thyroid Stimulating Hormone Receptor Signal Transduction. *Endocrine reviews.* 2013.

87. Neumann S, Raaka BM, Gershengorn MC. Constitutively active thyrotropin and thyrotropin-releasing hormone receptors and their inverse agonists. *Methods in enzymology*. 2010;485:147-60.
88. Krause G, Kreuchwig A, Kleinau G. Extended and structurally supported insights into extracellular hormone binding, signal transduction and organization of the thyrotropin receptor. *PLoS One*. 2012;7(12):e52920.
89. Kleinau G, Hoyer I, Kreuchwig A, Haas AK, Rutz C, Furkert J, Worth CL, Krause G, Schulein R. From Molecular Details of the Interplay between Transmembrane Helices of the Thyrotropin Receptor to General Aspects of Signal Transduction in Family A G-protein-coupled Receptors (GPCRs). *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(29):25859-71.
90. Hurowitz EH, Melnyk JM, Chen YJ, Kouros-Mehr H, Simon MI, Shizuya H. Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein alpha, beta, and gamma subunit genes. *DNA Res*. 2000;7(2):111-20.
91. Lambright DG, Noel JP, Hamm HE, Sigler PB. Structural determinants for activation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature*. 1994;369(6482):621-8.
92. Allgeier A, Offermanns S, Van Sande J, Spicher K, Schultz G, Dumont JE. The human thyrotropin receptor activates G-proteins Gs and Gq/11. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(19):13733-5.
93. Kero J, Ahmed K, Wettschureck N, Tunaru S, Wintermantel T, Greiner E, Schutz G, Offermanns S. Thyrocyte-specific Gq/G11 deficiency impairs thyroid function and prevents goiter development. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(9):2399-407.
94. Biebermann H, Winkler F, Handke D, Gruters A, Krude H, Kleinau G. Molecular description of non-autoimmune hyperthyroidism at a neonate caused by a new thyrotropin receptor germline mutation. *Thyroid research*. 2011;4 Suppl 1:S8.
95. Davies TF, Ando T, Lin RY, Tomer Y, Latif R. Thyrotropin receptor-associated diseases: from adenomata to Graves disease. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(8):1972-83.
96. Chen CR, McLachlan SM, Rapoport B. Suppression of thyrotropin receptor constitutive activity by a monoclonal antibody with inverse agonist activity. *Endocrinology*. 2007;148(5):2375-82.
97. Chen CR, McLachlan SM, Rapoport B. A monoclonal antibody with thyrotropin (TSH) receptor inverse agonist and TSH antagonist activities binds to the receptor hinge region as well as to the leucine-rich domain. *Endocrinology*. 2009;150(7):3401-8.
98. Derwahl M, Kuemmel M, Goretzki P, Schatz H, Broecker M. Expression of the human TSH receptor in a human thyroid carcinoma cell line that lacks an endogenous TSH receptor: growth inhibition by cAMP. *Biochemical and biophysical research communications*. 1993;191(3):1131-8.
99. Potorac I, Rivero-Muller A, Trehan A, Kielbus M, Jozwiak K, Pralong F, Hafidi A, Thiry A, Menage JJ, Huhtaniemi I, Beckers A, Daly AF. A vital region for human

glycoprotein hormone trafficking revealed by an LHB mutation. *The Journal of endocrinology*. 2016;231(3):197-207.

100. Schorderet DF. [Polymerase chain reaction: basic principles]. *Schweiz Rundsch Med Prax*. 1994;83(20):588-94.

101. Kunkel TA. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(2):488-92.

102. Arber W, Linn S. DNA modification and restriction. *Annu Rev Biochem*. 1969;38:467-500.

103. Lehman IR. DNA ligase: structure, mechanism, and function. *Science*. 1974;186(4166):790-7.

104. Hanahan D, Jessee J, Bloom FR. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods in enzymology*. 1991;204:63-113.

105. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology*. 1992;24:104-8.

106. Grossmann M, Szkudlinski MW, Dias JA, Xia H, Wong R, Puett D, Weintraub BD. Site-directed mutagenesis of amino acids 33-44 of the common alpha-subunit reveals different structural requirements for heterodimer expression among the glycoprotein hormones and suggests that cyclic adenosine 3',5'-monophosphate production and growth promotion are potentially dissociable functions of human thyrotropin. *Molecular endocrinology*. 1996;10(6):769-79.

107. Yamazaki K, Sato K, Shizume K, Kanaji Y, Ito Y, Obara T, Nakagawa T, Koizumi T, Nishimura R. Potent thyrotropic activity of human chorionic gonadotropin variants in terms of ¹²⁵I incorporation and de novo synthesized thyroid hormone release in human thyroid follicles. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1995;80(2):473-9.

108. Szkudlinski MW, Teh NG, Grossmann M, Tropea JE, Weintraub BD. Engineering human glycoprotein hormone superactive analogues. *Nat Biotechnol*. 1996;14(10):1257-63.

109. Mueller S, Kleinau G, Jaeschke H, Paschke R, Krause G. Extended hormone binding site of the human thyroid stimulating hormone receptor: distinctive acidic residues in the hinge region are involved in bovine thyroid stimulating hormone binding and receptor activation. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(26):18048-55.

110. Vuissoz JM, Deladoey J, Buyukgebiz A, Cemeroglu P, Gex G, Gallati S, Mullis PE. New autosomal recessive mutation of the TSH-beta subunit gene causing central isolated hypothyroidism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001;86(9):4468-71.

111. Barbesino G, Sluss PM, Caturegli P. Central hypothyroidism in a patient with pituitary autoimmunity: evidence for TSH-independent thyroid hormone synthesis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(2):345-50.

112. Persani L. Clinical review: Central hypothyroidism: pathogenic, diagnostic, and therapeutic challenges. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(9):3068-78.

113. Auso E, Lavado-Autric R, Cuevas E, Del Rey FE, Morreale De Escobar G, Berbel P. A moderate and transient deficiency of maternal thyroid function at the beginning of fetal neocortico-genesis alters neuronal migration. *Endocrinology*. 2004;145(9):4037-47.
114. Morreale de Escobar G, Obregon MJ, Escobar del Rey F. Role of thyroid hormone during early brain development. *European journal of endocrinology*. 2004;151 Suppl 3:U25-37.
115. Haddow JE, Palomaki GE, Allan WC, Williams JR, Knight GJ, Gagnon J, O'Heir CE, Mitchell ML, Hermos RJ, Waisbren SE, Faix JD, Klein RZ. Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. *The New England journal of medicine*. 1999;341(8):549-55.
116. Szkudlinski MW, Grossmann M, Weintraub BD. Structure-function studies of human TSH: new advances in design of glycoprotein hormone analogs. *Trends Endocrinol Metab*. 1996;7(8):277-86.
117. Zabczynska M, Kozłowska K, Pochec E. Glycosylation in the Thyroid Gland: Vital Aspects of Glycoprotein Function in Thyrocyte Physiology and Thyroid Disorders. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9).
118. Kim JY, Kim YG, Lee GM. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;93(3):917-30.
119. Donadio S, Morelle W, Pascual A, Romi-Lebrun R, Michalski JC, Ronin C. Both core and terminal glycosylation alter epitope expression in thyrotropin and introduce discordances in hormone measurements. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2005;43(5):519-30.
120. Croset A, Delafosse L, Gaudry JP, Arod C, Glez L, Losberger C, Begue D, Krstanovic A, Robert F, Vilbois F, Chevalet L, Antonsson B. Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells. *Journal of biotechnology*. 2012;161(3):336-48.
121. Grossmann M, Szkudlinski MW, Tropea JE, Bishop LA, Thotakura NR, Schofield PR, Weintraub BD. Expression of human thyrotropin in cell lines with different glycosylation patterns combined with mutagenesis of specific glycosylation sites. Characterization of a novel role for the oligosaccharides in the in vitro and in vivo bioactivity. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(49):29378-85.
122. In: rd, Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY)2015.
123. Ashwell G, Harford J. Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu Rev Biochem*. 1982;51:531-54.
124. Laugwitz KL, Allgeier A, Offermanns S, Spicher K, Van Sande J, Dumont JE, Schultz G. The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(1):116-20.
125. Bock A, Merten N, Schrage R, Dallanoce C, Batz J, Klockner J, Schmitz J, Matera C, Simon K, Kebig A, Peters L, Muller A, Schrobang-Ley J, Trankle C, Hoffmann C, De Amici M, Holzgrabe U, Kostenis E, Mohr K. The allosteric vestibule of

a seven transmembrane helical receptor controls G-protein coupling. *Nat Commun.* 2012;3:1044.

126. Smith JS, Lefkowitz RJ, Rajagopal S. Biased signalling: from simple switches to allosteric microprocessors. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17(4):243-60.

127. Simmons MA. Functional selectivity, ligand-directed trafficking, conformation-specific agonism: what's in a name? *Mol Interv.* 2005;5(3):154-7.

128. Riccetti L, Yvinec R, Klett D, Gallay N, Combarous Y, Reiter E, Simoni M, Casarini L, Ayoub MA. Human Luteinizing Hormone and Chorionic Gonadotropin Display Biased Agonism at the LH and LH/CG Receptors. *Sci Rep.* 2017;7(1):940.

129. Chen F, Puett D. Delineation via site-directed mutagenesis of the carboxyl-terminal region of human choriogonadotropin beta required for subunit assembly and biological activity. *The Journal of biological chemistry.* 1991;266(11):6904-8.

130. Borck G, Topaloglu AK, Korsch E, Martine U, Wildhardt G, Onenli-Mungan N, Yuksel B, Aumann U, Koch G, Ozer G, Pfaffle R, Scherberg NH, Refetoff S, Pohlenz J. Four new cases of congenital secondary hypothyroidism due to a splice site mutation in the thyrotropin-beta gene: phenotypic variability and founder effect. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2004;89(8):4136-41.

131. Blithe DL. N-linked oligosaccharides on free alpha interfere with its ability to combine with human chorionic gonadotropin-beta subunit. *The Journal of biological chemistry.* 1990;265(35):21951-6.

132. Parsons TF, Pierce JG. Free alpha-like material from bovine pituitaries. Removal of its O-linked oligosaccharide permits combination with lutropin-beta. *The Journal of biological chemistry.* 1984;259(4):2662-6.

133. Cole LA, Perini F, Birken S, Ruddon RW. An oligosaccharide of the O-linked type distinguishes the free from the combined form of hCG alpha subunit. *Biochemical and biophysical research communications.* 1984;122(3):1260-7.

134. Rouillard AD, Gundersen GW, Fernandez NF, Wang Z, Monteiro CD, McDermott MG, Ma'ayan A. The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. *Database (Oxford).* 2016;2016.

135. Selden RF, Howie KB, Rowe ME, Goodman HM, Moore DD. Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression. *Mol Cell Biol.* 1986;6(9):3173-9.

9 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Laura Kalveram, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Klinische und molekularbiologische Effekte der Mutation C105Vfs114X im TSHB Gen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

10 Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Laura Kalveram hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Kleinau G*, **Kalveram L.***, Köhrle J., Szkudlinski M., Schomburg L., Biebermann H., Grüters-Kieslich A.; Insights Into the Structural and Molecular Consequences of the TSH- β Mutation C105Vfs114X; Mol Endocrinol.; 2016.

*geteilte Erstautorenschaft

Für diese Publikation führte ich zunächst eine ausführliche Literaturrecherche durch. Desweiteren erfolgte die Anfertigung von Abbildung 1 durch mich. Die Hypothesen wurden gemeinsam mit allen Co-Autoren entwickelt. Bei der Manuskripterstellung schrieb ich die Einleitung inklusive der bekannten Mutationen im TSHB und weiteren Mutationen, die zu einer zentralen Hypothyreose führen können. Ebenso die Beschreibung des Phänotyps sowie die Grundlage der Mutation (Lokalisierung, Deletion usw.) erfolgte durch mich. Mögliche Hypothesen, die zum Funktionsverlust der untersuchten Variante führen, wurden mit den Co-Autoren diskutiert und diese von mir und Dr. Gunnar Kleinau (basierend auf dessen Modell) verschriftlicht. Zudem untersuchten wir (Dr. Gunnar Kleinau und ich) die in dieser Arbeit untersuchte Mutation mit Mutationen in anderen Glycoproteinhormonen und verschriftlichten diesen Vergleich im Manuskript. Das Manuskript wurde dann von allen Co-Autoren kritisch begutachtet und wenn notwendig überarbeitet. Die Einreichung des Manuskripts erfolgte durch Dr. Gunnar Kleinau.

Publikation 2:

Kalveram L., Kleinau G, Szymańska K, Scheerer P, Rivero-Müller A, Grüters-Kieslich A, Biebermann H. The Pathogenic TSH β -subunit Variant C105Vfs114X Causes a Modified Signaling Profile at TSHR. Int J Mol Sci. 2019.

Für dieses Manuskript führte ich zunächst eine ausführliche Literaturrecherche durch. In Zusammenarbeit mit Frau Prof. Heike Biebermann und Prof. Annette Grüters-Kieslich plante ich die Experimente. Ich führte alle Experimente eigenständig durch, mit Ausnahme der Klonierung in den AmCyan-P2A-mCherry Expressionsvektor (diese erfolgte durch K. Szymańska und Dr. A Rivero-Müller). Nach der Durchführung der Experimente, führte ich eine statistische Analyse durch, aus welcher die Abbildungen 5 und 6 entstanden sind. Diese Ergebnisse diskutierte ich mit allen Co-Autoren. Die Erstellung des Manuskripts erfolgte durch mich, Prof. Heike Biebermann und Dr. Gunnar Kleinau. Es wurde danach von Prof. Annette Grüters-Kieslich, Dr. Patrick Scheerer, K. Szymańska und Dr. A Rivero-Müller kritisch überarbeitet. Die Erstellung der Abbildungen (mit Ausnahme der Abbildung 3, die durch Dr. Gunnar Kleinau erfolgte) und die Einreichung des Manuskripts erfolgte wiederum ebenfalls durch mich.

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

11 Lebenslauf

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

12 Publikationsliste

1. Kleinau G*, **Kalveram L.***, Köhrle J., Szkudlinski M., Schomburg L., Biebermann H., Grüters-Kieslich A.; *Insights Into the Structural and Molecular Consequences of the TSH- β Mutation C105Vfs114X*; Mol Endocrinol.; 2016.

* geteilte Erstautorenschaft

2. **Kalveram L**, Kleinau G, Szymańska K, Scheerer P, Rivero-Müller A, Grüters-Kieslich A, Biebermann H. *The Pathogenic TSH β -subunit Variant C105Vfs114X Causes a Modified Signaling Profile at TSHR*. Int J Mol Sci. 2019.

13 Danksagung

Zunächst danke ich von ganzem Herzen meiner Betreuerin Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich. Für die Bereitstellung des Themas, ihren hochwertigen Input, ihre Motivation, ihre Geduld aber auch für ihre unentwegte und grenzenlose Unterstützung innerhalb und außerhalb des Labors. Außerdem danke ich Prof. Dr. Heike Biebermann, die nicht nur jederzeit ein offenes Ohr für Fragen hatte, sondern auch durch ihr außerordentliches Wissen und ihre Art mich in schwierigen Situationen zu motivieren, maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Desweiteren danke ich Prof. Dr. Heiko Krude für die Aufnahme in sein Institut, der Möglichkeit dieser Dissertation, aber auch für seinen Input und seine kritischen Fragen. Beides hat mich stets sehr voran gebracht.

Ebenso danken möchte ich Dr. Gunnar Kleinau, der ebenfalls einen überaus wichtigen Beitrag zu diesem Projekt und den beiden Publikationen leistete und mich stets mit Modellen versorgte.

Dann danke ich dem ganzen Team der Experimentellen Pädiatrischen Endokrinologie. Insbesondere Sabine Jyrch, Çiğdem Çetindag und Sarah Paiszidior für das Anlernen und die Unterstützung bei meinen Experimenten und Fragen.

Dem Institut für Experimentelle Endokrinologie und insbesondere Prof. Dr. Lutz Schomburg, Dr. Waldemar Minich und Carola Geiler möchte ich für die Möglichkeit, sowie die Hilfe bei der Durchführung der Experimente mit Insektenzellen danken.

Deweiteren danke ich unseren Kooperationspartnern, der AG um Dr. Adolfo Rivero-Müller für die Generierung der Konstrukte sowie der AG um Prof. Dr. Mathias Selbach, für den aufwendigen Versuch der TSH-Quantifizierung.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken. Für ihre unendliche Unterstützung in allen Lebenslagen und ihren unerschütterlichen Glauben an mich.