Aus dem Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung an der Universität Hamburg (IHF) Abteilung klinische und angewandte Endokrinologie Direktor: Prof. Dr.med. H.M. Schulte

Epitope-Tagging des humanen TSH-Rezeptors

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

> Jörg Ruppert aus Würzburg

Hamburg, im Jahr 2000

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: **15. März 2000**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

Sprecher: Prof. Dr. med. H.-P. Leichtweiß

Referent: **Prof. Dr. med. H. M. Schulte**

Korreferent: Prof. Dr. med. L.-W. Braendle

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1 Ein	leitung	1
1.1	Der TSH-Rezeptor	1
1.2	Physiologie der Schilddrüse	2
1.3	Der TSH-Rezeptor in der Pathophysiologie von	
	Schilddrüsenerkrankungen	4
1.3.1	Funktionelle Schilddrüsenautonomie	4
1.3.2	Morbus Basedow	4
1.3.3	Endokrine Orbitopathie (EO), Thyroid-associated	
	Ophthalmopathy (TAO)	6
1.3.4	Familiäre Hyper- und Hypothyreosen	6
1.3.5	Differenzierte Schilddrüsen-Karzinome	6
1.3.6	Andere Schilddrüsenerkrankungen	7
1.4	"Epitope tagging"	7
1.5	Ziel der vorliegenden Arbeit	8
2 Ma	terial und Methoden	10
2.1	Verwendete Markerpeptide (epitope tags)	10
2.1.1	Das FLAG-Epitop	10
2.1.2	Das HA-Epitop	10
2.2	Methoden zur Bearbeitung von DNA	10
2.2.1	Ethanolfällung von DNA	11
2.2.2	Phenolextraktion von DNA	11
2.2.3	Konzentrationsbestimmung von DNA	11
2.2.4	Verdau von DNA mit bakteriellen Restriktionsenzymen	11
2.2.5	Phosphorylierung und Dephosphorylierung von	
	DNA-Molekülen	12
2.2.6	Ligation von DNA-Molekülen	12
2.2.7	Auftrennung von DNA auf analytischen oder	
	präparativen Agarosegelen	12
2.2.8	Elution von DNA aus Agarosegelen	13
2.2.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	13
2.2.10	Sequenzierung nach der Dideoxy-Methode	14
2.3	Umgang mit Plasmiden und bakteriellen Wirten	14
2.3.1	Verwendete Vektoren	14
2.3.1.1	pMOSblue	14
2.3.1.2	pcDL-SRa296	15

2.3.1.4pET-31b(+)152.3.2Verwendete Bakterienstämme162.3.2.1Escherichia coli XL1-blue162.3.2.2Escherichia coli BL21(DE3) und BL21(DE3)pLysS162.3.3Herstellung kompetenter bakterieller Wirte für die Transformation bakterieller Wirte mit Plasmid-DNA162.3.4Transformation bakterieller Wirte mit Plasmid-DNA172.3.5Kolonie-Screening mit PCR (PCR colony screening)172.3.6Präparation von DNA aus Bakterienzellen172.3.7Expression von Proteinen in Bakterien192.4.1Präparation von Proteinen in Bakterien192.4.2Reinigung von Hexahistidin-haltigem Protein durch Nickel-Agarose-Säulenchromatographie192.4.3Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit dem "Bio-Rad Protein Assay"202.4.4Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Assay212.4.5Deglykosylierung von Glykoproteinen212.4.8Immunpräzipitation222.5.1Eukaryote Zellen zur Expression der TSH-Rezeptorkonstrukte232.5.2.1Medien232.5.2.2Kultur232.5.2.3Lagerung in Flüssigstickstoff232.5.3.4Transfektion von eukaryoten Zellen242.5.3.1Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3.2Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3.4Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3.5Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode<	2.3.1.3	pSVneo	15
2.3.2Verwendete Bakterienstämme162.3.2.1Escherichia coli XL1-blue162.3.2.2Escherichia coli BL21(DE3) und BL21(DE3)pLysS162.3.3Herstellung kompetenter bakterieller Wirte für die Transformation bakterieller Wirte mit Plasmid-DNA162.3.4Transformation bakterieller Wirte mit Plasmid-DNA172.3.5Kolonie-Screening mit PCR (PCR colony screening)172.3.6Präparation von DNA aus Bakterienzellen172.3.7Expression von Proteinen in Bakterien182.4Methoden zum Umgang mit Proteinen us Zellkulturen192.4.1Präparation von Protein aus Zellkulturen192.4.2Reinigung von Hexahistidin-haltigem Protein durch Nickel-Agarose-Säulenchromatographie192.4.3Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit dem "Bio-Rad Protein Assay"202.4.4Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Assay202.4.5Deglykosylierung von Glykoproteinen212.4.6SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese212.4.7Western Blot232.5.1Eukaryote Zellen232.5.1Eukaryote Zellen232.5.2Zellkultur232.5.3Transfektion von eukaryoten Zellen242.5.3Lagerung in Flüssigstickstoff232.5.4Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3Lagerung in Flüssigstickstoff232.5.4Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3 <t< td=""><td>2.3.1.4</td><td>pET-31b(+)</td><td>15</td></t<>	2.3.1.4	pET-31b(+)	15
2.3.2.1Escherichia coli XL1-blue162.3.2.2Escherichia coli BL21(DE3) und BL21(DE3)pLysS162.3.3Herstellung kompetenter bakterieller Wirte für die Transformation mit Plasmid-DNA162.3.4Transformation bakterieller Wirte mit Plasmid-DNA172.3.5Kolonie-Screening mit PCR (PCR colony screening)172.3.6Präparation von DNA aus Bakterienzellen172.3.7Expression von Proteinen in Bakterien182.4Methoden zum Umgang mit Proteinen192.4.1Präparation von Protein aus Zellkulturen192.4.2Reinigung von Hexahistidin-haltigem Protein durch Nickel-Agarose-Säulenchromatographie192.4.3Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit dem "Bio-Rad Protein Assay"202.4.4Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Assay202.4.5Deglykosylierung von Glykoproteinen212.4.6SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese212.4.7Western Biot232.5.1Eukaryote Zellen zur Expression der TSH-Rezeptorkonstrukte232.5.1.2Hela-Zellen232.5.2.1Medien232.5.2.2Kultur232.5.3Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3Transfektion mittels Liposomen242.5.4Medion-Rezeptor-Assay252.5.5Methoden zur Messung von zellulären Funktionen252.5.6Metho	2.3.2	Verwendete Bakterienstämme	16
2.3.2.2Escherichia coli BL21(DE3) und BL21(DE3)pLysS162.3.3Herstellung kompetenter bakterieller Wirte für die Transformation mit Plasmid-DNA162.3.4Transformation bakterieller Wirte mit Plasmid-DNA172.3.5Kolonie-Screening mit PCR (PCR colony screening)172.3.6Präparation von DNA aus Bakterienzellen172.3.7Expression von Proteinen in Bakterien182.4Methoden zum Umgang mit Proteinen192.4.1Präparation von Protein aus Zellkulturen192.4.2Reinigung von Hexahistidin-haltigem Protein durch Nickel-Agarose-Säulenchromatographie192.4.3Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit dem "Bio-Rad Protein Assay"202.4.4Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Assay202.4.5Deglykosylierung von Glykoproteinen212.4.6SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese212.4.7Western Blot212.4.8Immunpräzipitation222.5.1Eukayote Zellen zur Expression der TSH-Rezeptorkonstrukte232.5.2.2Zellkultur232.5.2.3Lagerung in Flüssigstickstoff232.5.3Transfektion von eukaryoten Zellen242.5.3.1Transfektion mittels Liposomen242.5.3.2Transfektion mittels Liposomen242.5.3.4Transfektion mittels Liposomen242.5.3.2Transfektion mittels Liposomen242.5.3Transfektion mittels Liposomen242.	2.3.2.1	Escherichia coli XL1-blue	16
2.3.3Herstellung kompetenter bakterieller Wirte für die Transformation mit Plasmid-DNA162.3.4Transformation bakterieller Wirte mit Plasmid-DNA172.3.5Kolonie-Screening mit PCR (PCR colony screening)172.3.6Präparation von DNA aus Bakterienzellen172.3.7Expression von Proteinen in Bakterien182.4Methoden zum Umgang mit Proteinen192.4.1Präparation von Protein aus Zellkulturen192.4.2Reinigung von Hexahistidin-haltigem Protein durch Nickel-Agarose-Säulenchromatographie192.4.3Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit dem "Bio-Rad Protein Assay"202.4.4Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Assay202.4.5Deglykosylierung von Glykoproteinen212.4.6SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese212.4.7Western Blot212.4.8Immunpräzipitation222.5Methoden zum Umgang mit eukaryoten Zellen232.5.1Eukaryote Zellen zur Expression der TSH-Rezeptorkonstrukte232.5.2Zellkultur232.5.2.1Medien232.5.2.2Kultur232.5.2.3Lagerung in Flüssigstickstoff232.5.3Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3.1Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3.2Transfektion mittels Liposomen242.5.4Transiente und stabile Transfektion242.5.4Transiente und stabile	2.3.2.2	Escherichia coli BL21(DE3) und BL21(DE3)pLysS	16
Transformation mit Plasmid-DNA162.3.4Transformation bakterieller Wirte mit Plasmid-DNA172.3.5Kolonie-Screening mit PCR (PCR colony screening)172.3.6Präparation von DNA aus Bakterienzellen172.3.7Expression von Proteinen in Bakterien182.4Methoden zum Umgang mit Proteinen192.4.1Präparation von Protein aus Zellkulturen192.4.2Reinigung von Hexahistidin-haltigem Protein durch Nickel-Agarose-Säulenchromatographie192.4.3Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit dem "Bio-Rad Protein Assay"202.4.4Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Assay202.4.5Deglykosylierung von Glykoproteinen212.4.6SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese212.4.7Western Blot212.4.8Immunpräzipitation222.5.1Eukaryote Zellen zur Expression der TSH-Rezeptorkonstrukte232.5.2.1Medien232.5.2.2Kultur232.5.2.3Lagerung in Flüssigstickstoff232.5.3.1Transfektion von eukaryoten Zellen242.5.3.2Transfektion von eukaryoten Zellen242.5.3.3Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.4Transiente und stabile Transfektion242.5.3.2Transfektion mittels Liposomen242.5.4Methoden zur Messung von zellulären Funktionen252.5.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay (cAMP-Bioas	2.3.3	Herstellung kompetenter bakterieller Wirte für die	
2.3.4Transformation bakterieller Wirte mit Plasmid-DNA172.3.5Kolonie-Screening mit PCR (PCR colony screening)172.3.6Präparation von DNA aus Bakterienzellen172.3.7Expression von Proteinen in Bakterien182.4Methoden zum Umgang mit Proteinen192.4.1Präparation von Protein aus Zellkulturen192.4.2Reinigung von Hexahistidin-haltigem Protein durch Nickel-Agarose-Säulenchromatographie192.4.3Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit dem "Bio-Rad Protein Assay"202.4.4Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Assay202.4.5Deglykosylierung von Glykoproteinen212.4.6SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese212.4.7Western Blot212.4.8Immunpräzipitation222.5.1Methoden zum Umgang mit eukaryoten Zellen232.5.1.2Hela-Zellen232.5.1.4Cos-7-Zellen232.5.2Zellkultur232.5.2.3Lagerung in Flüssigstickstoff232.5.2.4Kultur232.5.3Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.4Transfektion mittels Liposomen242.5.4Transfektion mittels Liposomen242.5.4Transfektion intels Liposomen242.5.4Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay (cAMP-Bioassay)26		Transformation mit Plasmid-DNA	16
2.3.5Kolonie-Screening mit PCR (PCR colony screening)172.3.6Präparation von DNA aus Bakterienzellen172.3.7Expression von Proteinen in Bakterien182.4Methoden zum Umgang mit Proteinen192.4.1Präparation von Protein aus Zellkulturen192.4.2Reinigung von Hexahistidin-haltigem Protein durch Nickel-Agarose-Säulenchromatographie192.4.3Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit dem "Bio-Rad Protein Assay"202.4.4Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Assay202.4.5Deglykosylierung von Glykoproteinen212.4.6SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese212.4.7Western Blot212.4.8Immunpräzipitation222.5Methoden zum Umgang mit eukaryoten Zellen232.5.1Eukaryote Zellen zur Expression der TSH-Rezeptorkonstrukte232.5.2Zellkultur232.5.2.2Kultur232.5.2.3Lagerung in Flüssigstickstoff232.5.3Transfektion von eukaryoten Zellen242.5.3.1Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3.2Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.4Transfektion mittels Liposomen242.5.4Transfektion mittels Liposomen242.5.3Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay252.6.1Radio-Rezeptor-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay26	2.3.4	Transformation bakterieller Wirte mit Plasmid-DNA	17
2.3.6Präparation von DNA aus Bakterienzellen172.3.7Expression von Proteinen in Bakterien182.4Methoden zum Umgang mit Proteinen192.4.1Präparation von Protein aus Zellkulturen192.4.2Reinigung von Hexahistidin-haltigem Protein durch Nickel-Agarose-Säulenchromatographie192.4.3Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit dem "Bio-Rad Protein Assay"202.4.4Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Assay202.4.5Deglykosylierung von Glykoproteinen212.4.6SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese212.4.7Western Blot212.4.8Immunpräzipitation222.5Methoden zum Umgang mit eukaryoten Zellen232.5.1Eukaryote Zellen zur Expression der TSH-Rezeptorkonstrukte232.5.2Zellkultur232.5.2.1Medien232.5.2.2Kultur232.5.3.1Transfektion von eukaryoten Zellen242.5.3.1Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3.2Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.4Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.4Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.4Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3.1Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.4Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.4Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode24	2.3.5	Kolonie-Screening mit PCR (PCR colony screening)	17
2.3.7Expression von Proteinen in Bakterien182.4Methoden zum Umgang mit Proteinen192.4.1Präparation von Protein aus Zellkulturen192.4.2Reinigung von Hexahistidin-haltigem Protein durch Nickel-Agarose-Säulenchromatographie192.4.3Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit dem "Bio-Rad Protein Assay"202.4.4Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Assay202.4.5Deglykosylierung von Glykoproteinen212.4.6SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese212.4.7Western Blot212.4.8Immunpräzipitation222.5Methoden zum Umgang mit eukaryoten Zellen232.5.1Eukaryote Zellen zur Expression der TSH-Rezeptorkonstrukte232.5.2.1Medien232.5.2.2Kultur232.5.2.3Lagerung in Flüssigstickstoff232.5.3.1Transfektion von eukaryoten Zellen242.5.3.2Transfektion wittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3.1Transfektion mittels Liposomen242.5.4Transiente und stabile Transfektion242.5.4Radio-Rezeptor-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay252.6.2Koylo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay252.6.2Koylo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay252.6.2Koylo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay <td>2.3.6</td> <td>Präparation von DNA aus Bakterienzellen</td> <td>17</td>	2.3.6	Präparation von DNA aus Bakterienzellen	17
2.4Methoden zum Umgang mit Proteinen192.4.1Präparation von Protein aus Zellkulturen192.4.2Reinigung von Hexahistidin-haltigem Protein durch Nickel-Agarose-Säulenchromatographie192.4.3Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit dem "Bio-Rad Protein Assay"202.4.4Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Assay202.4.5Deglykosylierung von Glykoproteinen212.4.6SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese212.4.7Western Blot212.4.8Immunpräzipitation222.5Methoden zum Umgang mit eukaryoten Zellen232.5.1Eukaryote Zellen zur Expression der TSH-Rezeptorkonstrukte232.5.2Zellkultur232.5.2.1Medien232.5.2.2Kultur232.5.3Transfektion von eukaryoten Zellen242.5.3.1Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3.2Transfektion mittels Liposomen242.5.4Transiente und stabile Transfektion242.5.4Radio-Rezeptor-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay26	2.3.7	Expression von Proteinen in Bakterien	18
2.4.1Präparation von Protein aus Zellkulturen192.4.2Reinigung von Hexahistidin-haltigem Protein durch Nickel-Agarose-Säulenchromatographie192.4.3Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit dem "Bio-Rad Protein Assay"202.4.4Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Assay202.4.5Deglykosylierung von Glykoproteinen212.4.6SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese212.4.7Western Blot212.4.8Immunpräzipitation222.5Methoden zum Umgang mit eukaryoten Zellen232.5.1Eukaryote Zellen zur Expression der TSH-Rezeptorkonstrukte232.5.2Zellkultur232.5.2Zellkultur232.5.2Zellkultur232.5.3Transfektion von eukaryoten Zellen232.5.4Medien232.5.5.3Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3.1Transfektion mittels Liposomen242.5.4Transiente und stabile Transfektion242.6Methoden zur Messung von zellulären Funktionen252.6.1Radio-Rezeptor-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay26	2.4	Methoden zum Umgang mit Proteinen	19
2.4.2Reinigung von Hexahistidin-haltigem Protein durch Nickel-Agarose-Säulenchromatographie192.4.3Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit dem "Bio-Rad Protein Assay"202.4.4Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Assay202.4.5Deglykosylierung von Glykoproteinen212.4.6SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese212.4.7Western Blot212.4.8Immunpräzipitation222.5Methoden zum Umgang mit eukaryoten Zellen232.5.1Eukaryote Zellen zur Expression der TSH-Rezeptorkonstrukte232.5.2Zellkultur232.5.2Zellkultur232.5.3Transfektion von eukaryoten Zellen232.5.3Transfektion won eukaryoten Zellen232.5.4Medien232.5.2Zellkultur232.5.3Transfektion won eukaryoten Zellen242.5.3Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3Transfektion mittels Liposomen242.5.4Transiente und stabile Transfektion242.5.4Radio-Rezeptor-Assay252.6.1Radio-Rezeptor-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay (cAMP-Bioassay)26	2.4.1	Präparation von Protein aus Zellkulturen	19
Nickel-Agarose-Säulenchromatographie192.4.3Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit dem "Bio-Rad Protein Assay"202.4.4Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Assay202.4.5Deglykosylierung von Glykoproteinen212.4.6SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese212.4.7Western Blot212.4.8Immunpräzipitation222.5Methoden zum Umgang mit eukaryoten Zellen232.5.1Eukaryote Zellen zur Expression der TSH-Rezeptorkonstrukte232.5.1.1Cos-7-Zellen232.5.2Zellkultur232.5.2Zellkultur232.5.2Kultur232.5.3Transfektion von eukaryoten Zellen232.5.4Transfektion wittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3Transfektion mittels Liposomen242.5.4Transiente und stabile Transfektion242.5.4Radio-Rezeptor-Assay252.6.1Radio-Rezeptor-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay (cAMP-Bioassay)26	2.4.2	Reinigung von Hexahistidin-haltigem Protein durch	
2.4.3Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit dem "Bio-Rad Protein Assay"202.4.4Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Assay202.4.5Deglykosylierung von Glykoproteinen212.4.6SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese212.4.7Western Blot212.4.8Immunpräzipitation222.5Methoden zum Umgang mit eukaryoten Zellen232.5.1Eukaryote Zellen zur Expression der TSH-Rezeptorkonstrukte232.5.1.1Cos-7-Zellen232.5.2Zellkultur232.5.2Zellkultur232.5.3Transfektion won eukaryoten Zellen232.5.3Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3Transfektion mittels Liposomen242.5.4Transiente und stabile Transfektion242.5.4Transiente und stabile Transfektion252.6.1Radio-Rezeptor-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay (cAMP-Bioassay)26		Nickel-Agarose-Säulenchromatographie	19
"Bio-Rad Protein Assay"202.4.4Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Assay202.4.5Deglykosylierung von Glykoproteinen212.4.6SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese212.4.7Western Blot212.4.8Immunpräzipitation222.5Methoden zum Umgang mit eukaryoten Zellen232.5.1Eukaryote Zellen zur Expression der TSH-Rezeptorkonstrukte232.5.2Zellkultur232.5.2Zellkultur232.5.2Zellkultur232.5.3Ingerung in Flüssigstickstoff232.5.4Transfektion von eukaryoten Zellen242.5.3Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.4Transinete und stabile Transfektion242.5.4Radio-Rezeptor-Assay252.6.1Radio-Rezeptor-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay (cAMP-Bioassay)26	2.4.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit dem	
2.4.4Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Assay202.4.5Deglykosylierung von Glykoproteinen212.4.6SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese212.4.7Western Blot212.4.8Immunpräzipitation222.5Methoden zum Umgang mit eukaryoten Zellen232.5.1Eukaryote Zellen zur Expression der TSH-Rezeptorkonstrukte232.5.1.1Cos-7-Zellen232.5.2Zellkultur232.5.2Zellkultur232.5.2Zellkultur232.5.3Lagerung in Flüssigstickstoff232.5.3Transfektion wittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3Transfektion mittels Liposomen242.5.4Transiente und stabile Transfektion242.5.4Radio-Rezeptor-Assay252.6.1Radio-Rezeptor-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay (cAMP-Bioassay)262.7Herstellung von Antiseren27		"Bio-Rad Protein Assay"	20
BCA-Assay202.4.5Deglykosylierung von Glykoproteinen212.4.6SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese212.4.7Western Blot212.4.8Immunpräzipitation222.5Methoden zum Umgang mit eukaryoten Zellen232.5.1Eukaryote Zellen zur Expression der TSH-Rezeptorkonstrukte232.5.1.1Cos-7-Zellen232.5.2Zellkultur232.5.2Zellkultur232.5.2Kultur232.5.3Lagerung in Flüssigstickstoff232.5.3Transfektion von eukaryoten Zellen242.5.3Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.4Transiente und stabile Transfektion242.5.4Radio-Rezeptor-Assay252.6.1Radio-Rezeptor-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay (cAMP-Bioassay)262.7Herstellung von Antiseren27	2.4.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels	
2.4.5Deglykosylierung von Glykoproteinen212.4.6SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese212.4.7Western Blot212.4.8Immunpräzipitation222.5Methoden zum Umgang mit eukaryoten Zellen232.5.1Eukaryote Zellen zur Expression der TSH-Rezeptorkonstrukte232.5.1.1Cos-7-Zellen232.5.2Zellkultur232.5.2Zellkultur232.5.2Zellkultur232.5.2.1Medien232.5.2.2Kultur232.5.3Transfektion von eukaryoten Zellen232.5.3Transfektion von eukaryoten Zellen242.5.3.1Transfektion wittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3.2Transfektion mittels Liposomen242.5.4Transiente und stabile Transfektion242.5.4Radio-Rezeptor-Assay252.6.1Radio-Rezeptor-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay (cAMP-Bioassay)262.7Herstellung von Antiseren27		BCA-Assay	20
2.4.6SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese212.4.7Western Blot212.4.8Immunpräzipitation222.5Methoden zum Umgang mit eukaryoten Zellen232.5.1Eukaryote Zellen zur Expression der TSH-Rezeptorkonstrukte232.5.1.1Cos-7-Zellen232.5.2Zellkultur232.5.2Zellkultur232.5.2Zellkultur232.5.2Kultur232.5.3Lagerung in Flüssigstickstoff232.5.3Transfektion von eukaryoten Zellen242.5.3.1Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3.2Transfektion mittels Liposomen242.5.4Transiente und stabile Transfektion242.5.4Radio-Rezeptor-Assay252.6.1Radio-Rezeptor-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay (cAMP-Bioassay)262.7Herstellung von Antiseren27	2.4.5	Deglykosylierung von Glykoproteinen	21
2.4.7Western Blot212.4.8Immunpräzipitation222.5Methoden zum Umgang mit eukaryoten Zellen232.5.1Eukaryote Zellen zur Expression der TSH-Rezeptorkonstrukte232.5.1.1Cos-7-Zellen232.5.1.2Hela-Zellen232.5.2Zellkultur232.5.2.1Medien232.5.2.2Kultur232.5.2.3Lagerung in Flüssigstickstoff232.5.3.1Transfektion von eukaryoten Zellen242.5.3.2Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.4Transfektion mittels Liposomen242.5.4Transfektion mittels Liposomen242.5.4Transfektion mittels Liposomen242.5.4Radio-Rezeptor-Assay252.6.1Radio-Rezeptor-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay (cAMP-Bioassay)262.7Herstellung von Antiseren27	2.4.6	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	21
2.4.8Immunpräzipitation222.5Methoden zum Umgang mit eukaryoten Zellen232.5.1Eukaryote Zellen zur Expression der TSH-Rezeptorkonstrukte232.5.1.1Cos-7-Zellen232.5.1.2Hela-Zellen232.5.2Zellkultur232.5.2.1Medien232.5.2.2Kultur232.5.2.3Lagerung in Flüssigstickstoff232.5.3.1Transfektion von eukaryoten Zellen242.5.3.2Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3.2Transfektion mittels Liposomen242.5.4Methoden zur Messung von zellulären Funktionen252.6.1Radio-Rezeptor-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay (cAMP-Bioassay)262.7Herstellung von Antiseren27	2.4.7	Western Blot	21
2.5Methoden zum Umgang mit eukaryoten Zellen232.5.1Eukaryote Zellen zur Expression der TSH-Rezeptorkonstrukte232.5.1.1Cos-7-Zellen232.5.1.2Hela-Zellen232.5.2Zellkultur232.5.2.1Medien232.5.2.2Kultur232.5.2.3Lagerung in Flüssigstickstoff232.5.3.1Transfektion von eukaryoten Zellen242.5.3.2Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.4Transiente und stabile Transfektion242.5.4Radio-Rezeptor-Assay252.6.1Radio-Rezeptor-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay (cAMP-Bioassay)262.7Herstellung von Antiseren27	2.4.8	Immunpräzipitation	22
2.5.1Eukaryote Zellen zur Expression der TSH-Rezeptorkonstrukte232.5.1.1Cos-7-Zellen232.5.1.2Hela-Zellen232.5.2Zellkultur232.5.2.1Medien232.5.2.2Kultur232.5.2.3Lagerung in Flüssigstickstoff232.5.3Transfektion von eukaryoten Zellen242.5.3.1Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.4Transfektion mittels Liposomen242.5.4Transiente und stabile Transfektion242.6Methoden zur Messung von zellulären Funktionen252.6.1Radio-Rezeptor-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay (cAMP-Bioassay)262.7Herstellung von Antiseren27	2.5	Methoden zum Umgang mit eukaryoten Zellen	23
TSH-Rezeptorkonstrukte232.5.1.1Cos-7-Zellen232.5.1.2Hela-Zellen232.5.2Zellkultur232.5.2.1Medien232.5.2.2Kultur232.5.2.3Lagerung in Flüssigstickstoff232.5.3Transfektion von eukaryoten Zellen242.5.3.1Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.4Transfektion mittels Liposomen242.5.4Transiente und stabile Transfektion242.6.1Radio-Rezeptor-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay (cAMP-Bioassay)262.7Herstellung von Antiseren27	2.5.1	Eukaryote Zellen zur Expression der	
2.5.1.1Cos-7-Zellen232.5.1.2Hela-Zellen232.5.2Zellkultur232.5.2.1Medien232.5.2.2Kultur232.5.2.3Lagerung in Flüssigstickstoff232.5.3Transfektion von eukaryoten Zellen242.5.3.1Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3.2Transfektion mittels Liposomen242.5.4Transiente und stabile Transfektion242.6Methoden zur Messung von zellulären Funktionen252.6.1Radio-Rezeptor-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay (cAMP-Bioassay)262.7Herstellung von Antiseren27		TSH-Rezeptorkonstrukte	23
2.5.1.2Hela-Zellen232.5.2Zellkultur232.5.2.1Medien232.5.2.2Kultur232.5.2.3Lagerung in Flüssigstickstoff232.5.3Transfektion von eukaryoten Zellen242.5.3.1Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3.2Transfektion mittels Liposomen242.5.4Transiente und stabile Transfektion242.6Methoden zur Messung von zellulären Funktionen252.6.1Radio-Rezeptor-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay (cAMP-Bioassay)262.7Herstellung von Antiseren27	2.5.1.1	Cos-7-Zellen	23
2.5.2Zellkultur232.5.2.1Medien232.5.2.2Kultur232.5.2.3Lagerung in Flüssigstickstoff232.5.3Transfektion von eukaryoten Zellen242.5.3.1Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3.2Transfektion mittels Liposomen242.5.4Transiente und stabile Transfektion242.6Methoden zur Messung von zellulären Funktionen252.6.1Radio-Rezeptor-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay (cAMP-Bioassay)262.7Herstellung von Antiseren27	2.5.1.2	Hela-Zellen	23
2.5.2.1Medien232.5.2.2Kultur232.5.2.3Lagerung in Flüssigstickstoff232.5.3Transfektion von eukaryoten Zellen242.5.3.1Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3.2Transfektion mittels Liposomen242.5.4Transiente und stabile Transfektion242.6Methoden zur Messung von zellulären Funktionen252.6.1Radio-Rezeptor-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay (cAMP-Bioassay)262.7Herstellung von Antiseren27	2.5.2	Zellkultur	23
2.5.2.2Kultur232.5.2.3Lagerung in Flüssigstickstoff232.5.3Transfektion von eukaryoten Zellen242.5.3.1Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3.2Transfektion mittels Liposomen242.5.4Transiente und stabile Transfektion242.6Methoden zur Messung von zellulären Funktionen252.6.1Radio-Rezeptor-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay (cAMP-Bioassay)262.7Herstellung von Antiseren27	2.5.2.1	Medien	23
2.5.2.3Lagerung in Flüssigstickstoff232.5.3Transfektion von eukaryoten Zellen242.5.3.1Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3.2Transfektion mittels Liposomen242.5.4Transiente und stabile Transfektion242.6Methoden zur Messung von zellulären Funktionen252.6.1Radio-Rezeptor-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay (cAMP-Bioassay)262.7Herstellung von Antiseren27	2.5.2.2	Kultur	23
2.5.3Transfektion von eukaryoten Zellen242.5.3.1Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3.2Transfektion mittels Liposomen242.5.4Transiente und stabile Transfektion242.6Methoden zur Messung von zellulären Funktionen252.6.1Radio-Rezeptor-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay (cAMP-Bioassay)262.7Herstellung von Antiseren27	2.5.2.3	Lagerung in Flüssigstickstoff	23
2.5.3.1Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode242.5.3.2Transfektion mittels Liposomen242.5.4Transiente und stabile Transfektion242.6Methoden zur Messung von zellulären Funktionen252.6.1Radio-Rezeptor-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay (cAMP-Bioassay)262.7Herstellung von Antiseren27	2.5.3	Transfektion von eukaryoten Zellen	24
2.5.3.2Transfektion mittels Liposomen242.5.4Transiente und stabile Transfektion242.6Methoden zur Messung von zellulären Funktionen252.6.1Radio-Rezeptor-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay (cAMP-Bioassay)262.7Herstellung von Antiseren27	2.5.3.1	Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode	24
2.5.4Transiente und stabile Transfektion242.6Methoden zur Messung von zellulären Funktionen252.6.1Radio-Rezeptor-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay (cAMP-Bioassay)262.7Herstellung von Antiseren27	2.5.3.2	Transfektion mittels Liposomen	24
2.6Methoden zur Messung von zellulären Funktionen252.6.1Radio-Rezeptor-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay (cAMP-Bioassay)262.7Herstellung von Antiseren27	2.5.4	Transiente und stabile Transfektion	24
2.6.1Radio-Rezeptor-Assay252.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay (cAMP-Bioassay)262.7Herstellung von Antiseren27	2.6	Methoden zur Messung von zellulären Funktionen	25
2.6.2Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay (cAMP-Bioassay)262.7Herstellung von Antiseren27	2.6.1	Radio-Rezeptor-Assay	25
(cAMP-Bioassay)262.7Herstellung von Antiseren27	2.6.2	Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay	
2.7 Herstellung von Antiseren 27		(cAMP-Bioassay)	26
	2.7	Herstellung von Antiseren	27

3 Erç	rgebnisse 28			
3.1	Einführung der für die Markerpeptide FLAG und HA kodierenden DNA-Nukleotidsequenzen in eine	00		
	I SH-Rezeptor-cDNA mittels PCR	28		
3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion	28		
3.1.2	Wiederherstellung des vollständigen Leserasters			
	einer FLAG/HA-TSH-Rezeptor-cDNA	32		
3.2	Transiente Expression von FLAG-TSHR und HA-TSHR	33		
321	Transiente Transfektion von Cos-7-Zellen	33		
222	TSH Bindung von transient in Cos 7 Zellen	55		
3.2.2	avprimierten TSH Bezenterkenstrukten	24		
0.0.0		54		
3.2.3	Signaltransduktion von TSH-Rezeptorkonstrukten	05		
0.0.4		35		
3.2.4	Immunologischer Nachweis und Strukturaufklarung			
	von markierten TSH-Rezeptoren	37		
3.3	Stabile Expression von FLAG-TSHR und HA-TSHR			
	in Hela-Zellen	39		
3.3.1	Transfektion und Selektion stabil transfizierter Hela-Klone	39		
3.3.2	TSH-Bindung von stabil transfizierten			
	TSH-Rezeptorkonstrukten	40		
3.3.3	Signaltransduktion von stabil transfizierten	-		
	TSH-Rezeptorkonstrukten	42		
334	Immunologischer Nachweis und Strukturaufklärung von			
0.011	stabil transfizierten, markierten TSH-Rezeptoren	44		
3341	Western Blot Detektion von FLAG-/HA-TSHR-Protein			
0.0111	in Hela-Zell-I vsaten	44		
3342	Finfluss unterschiedlicher Denaturierungsverfahren auf			
0.0.4.2	die Darstellung des TSH-Rezentorproteins			
	im Wostorn Blot	17		
2242	Immunpräzinitation von markierten TSH Dezenter	47		
3.3.4.3	nninunprazipitation von markierten 15n-Rezeptor-	50		
0044	proteinen mit anti-FLAG- und anti-HA-Antikorper	50		
3.3.4.4	Deglykosyllerung des ISH-Rezeptorproteins	53		
3.4	Kotransfektion von FLAG- und HA-TSHR in Cos-7-Zellen	56		
3.5	Herstellung von Antiseren gegen Fusionsproteine mit			
	konkatemerisierten FLAG- und HA-Epitopen	59		
3.5.1	Herstellung von doppelsträngigen DNA-Kassetten			
	mit Leserastern für das FLAG- bzw. das HA-Epitop	60		
3.5.2	Herstellung von Konkatemeren der DNA-Kassetten	61		
3.5.3	Ligation von konkatemeren DNA-Kassetten in den			
	Expressionsvektor pET-31b(+)	62		

3.5.4	Expression der Fusionsproteine in kompetenten	
	Escherichia coli Bakterienzellen	63
3.5.4.1	Test-Expression von Fusionsprotein und Untersuchung	
	der Immunreaktivität mit anti-FLAG- bzw.	
	anti-HA-Antikörpern	63
3.5.4.2	Zeitverlauf der Expression von Fusionsprotein	64
3.5.5	Gewinnung reiner Fusionsproteine	66
3.5.5.1	Trennung von löslicher und unlöslicher Proteinfraktion	66
3.5.5.2	Nickel-Agarose-Chromatographie der FLAG-7mer-	
	und HA-5mer-Fusionsproteine	68
3.5.5.3	Expression und Aufreinigung von Milligramm-Mengen	
	der FLAG-7mer- und HA-5mer-Fusionsproteine	69
3.5.6	Herstellung von Ratten-Immunseren gegen das FLAG-7mer-	
	und das HA-5mer-Fusionsprotein	71
3.5.6.1	Immunisierung von Ratten mit den Fusionsproteinen	
	FLAG-7mer und HA-5mer	71
3.5.6.2	Western Blot mit Präimmunseren	71
3.5.6.3	Western Blot mit Immunseren	72
3.5.7	Detektion von FLAG- und HA-TSH-Rezeptor mit	
	Ratten-Immunseren	73
4 Dis	skussion	75
4 Dis 4.1	kussion Einführung der für die Epitope FLAG und HA kodierenden	75
4 Dis 4.1	kussion Einführung der für die Epitope FLAG und HA kodierenden DNA-Nukleotidsequenzen in eine TSH-Rezeptor-cDNA	75
4 Dis 4.1	kussion Einführung der für die Epitope FLAG und HA kodierenden DNA-Nukleotidsequenzen in eine TSH-Rezeptor-cDNA mittels PCR	75 75
4 Dis 4.1	Exercises Einführung der für die Epitope FLAG und HA kodierenden DNA-Nukleotidsequenzen in eine TSH-Rezeptor-cDNA mittels PCR	75 75 76
 4 Dis 4.1 4.2 4.2 4.2 	Einführung der für die Epitope FLAG und HA kodierenden DNA-Nukleotidsequenzen in eine TSH-Rezeptor-cDNA mittels PCR TSH-Bindung der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte Bedeutung der weseptlichen TSH-Rezeptordomänen	75 75 76
 4 Dis 4.1 4.2 4.2.1 	Einführung der für die Epitope FLAG und HA kodierenden DNA-Nukleotidsequenzen in eine TSH-Rezeptor-cDNA mittels PCR TSH-Bindung der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte Bedeutung der wesentlichen TSH-Rezeptordomänen für die TSH-Bindung	75 75 76 76
 4 Dis 4.1 4.2 4.2.1 4.2.2 	Einführung der für die Epitope FLAG und HA kodierenden DNA-Nukleotidsequenzen in eine TSH-Rezeptor-cDNA mittels PCR TSH-Bindung der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte Bedeutung der wesentlichen TSH-Rezeptordomänen für die TSH-Bindung	75 75 76 76
 4 Dis 4.1 4.2 4.2.1 4.2.2 	Einführung der für die Epitope FLAG und HA kodierenden DNA-Nukleotidsequenzen in eine TSH-Rezeptor-cDNA mittels PCR TSH-Bindung der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte Bedeutung der wesentlichen TSH-Rezeptordomänen für die TSH-Bindung TSH-Bindung der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor	75 75 76 76 77
 4 Dis 4.1 4.2 4.2.1 4.2.2 	 Einführung der für die Epitope FLAG und HA kodierenden DNA-Nukleotidsequenzen in eine TSH-Rezeptor-cDNA mittels PCR TSH-Bindung der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte Bedeutung der wesentlichen TSH-Rezeptordomänen für die TSH-Bindung TSH-Bindung der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor 	75 76 76 77
 4 Dis 4.1 4.2 4.2.1 4.2.2 4.3 	 Einführung der für die Epitope FLAG und HA kodierenden DNA-Nukleotidsequenzen in eine TSH-Rezeptor-cDNA mittels PCR TSH-Bindung der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte Bedeutung der wesentlichen TSH-Rezeptordomänen für die TSH-Bindung TSH-Bindung der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor 	75 76 76 77 78
 4 Dis 4.1 4.2 4.2.1 4.2.2 4.3 4.3.1 	 Einführung der für die Epitope FLAG und HA kodierenden DNA-Nukleotidsequenzen in eine TSH-Rezeptor-cDNA mittels PCR TSH-Bindung der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte Bedeutung der wesentlichen TSH-Rezeptordomänen für die TSH-Bindung TSH-Bindung der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor Signaltransduktion der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren 	75 76 76 77 78 78
 4 Dis 4.1 4.2 4.2.1 4.2.2 4.3 4.3.1 4.3.2 	 Einführung der für die Epitope FLAG und HA kodierenden DNA-Nukleotidsequenzen in eine TSH-Rezeptor-cDNA mittels PCR TSH-Bindung der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte Bedeutung der wesentlichen TSH-Rezeptordomänen für die TSH-Bindung TSH-Bindung der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor Signaltransduktion der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren TSH-Rezeptor und cAMP-Signalkaskade 	75 76 76 77 78 78 78 78
 4 Dis 4.1 4.2 4.2.1 4.2.2 4.3 4.3.1 4.3.2 4.3.3 4.3.3 	 Einführung der für die Epitope FLAG und HA kodierenden DNA-Nukleotidsequenzen in eine TSH-Rezeptor-cDNA mittels PCR TSH-Bindung der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte Bedeutung der wesentlichen TSH-Rezeptordomänen für die TSH-Bindung TSH-Bindung der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor Signaltransduktion der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren TSH-Rezeptor und cAMP-Signalkaskade Signalübertragung über intrazelluläre Rezeptoranteile 	75 76 76 77 78 78 78 78 79
 4 Dis 4.1 4.2 4.2.1 4.2.2 4.3 4.3.1 4.3.2 4.3.3 4.3.4 	 Einführung der für die Epitope FLAG und HA kodierenden DNA-Nukleotidsequenzen in eine TSH-Rezeptor-cDNA mittels PCR TSH-Bindung der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte Bedeutung der wesentlichen TSH-Rezeptordomänen für die TSH-Bindung TSH-Bindung der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor Signaltransduktion der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren TSH-Rezeptor und cAMP-Signalkaskade Signalübertragung über intrazelluläre Rezeptoranteile Ligandenunabhängige Aktivierung der cAMP-Signalkaskade 	75 76 76 77 78 78 78 78 78 79 80
 4 Dis 4.1 4.2 4.2.1 4.2.2 4.3 4.3.1 4.3.2 4.3.3 4.3.4 4.4 	 Einführung der für die Epitope FLAG und HA kodierenden DNA-Nukleotidsequenzen in eine TSH-Rezeptor-cDNA mittels PCR TSH-Bindung der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte Bedeutung der wesentlichen TSH-Rezeptordomänen für die TSH-Bindung TSH-Bindung der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor Signaltransduktion der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren TSH-Rezeptor und cAMP-Signalkaskade Signalübertragung über intrazelluläre Rezeptoranteile Ligandenunabhängige Aktivierung der cAMP-Signalkaskade Immunologischer Nachweis und Strukturaufklärung der 	75 76 76 77 78 78 78 78 79 80
 4 Dis 4.1 4.2 4.2.1 4.2.2 4.3 4.3.1 4.3.2 4.3.3 4.3.4 4.4 	 Einführung der für die Epitope FLAG und HA kodierenden DNA-Nukleotidsequenzen in eine TSH-Rezeptor-cDNA mittels PCR TSH-Bindung der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte Bedeutung der wesentlichen TSH-Rezeptordomänen für die TSH-Bindung TSH-Bindung der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor Signaltransduktion der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren TSH-Rezeptor und cAMP-Signalkaskade Signalübertragung über intrazelluläre Rezeptoranteile Ligandenunabhängige Aktivierung der cAMP-Signalkaskade Immunologischer Nachweis und Strukturaufklärung der markierten TSH-Rezeptoren 	75 76 76 77 78 78 78 78 78 78 80 80
 4 Dis 4.1 4.2 4.2.1 4.2.2 4.3 4.3.1 4.3.2 4.3.3 4.3.4 4.4 4.4.1 	 Einführung der für die Epitope FLAG und HA kodierenden DNA-Nukleotidsequenzen in eine TSH-Rezeptor-cDNA mittels PCR TSH-Bindung der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte Bedeutung der wesentlichen TSH-Rezeptordomänen für die TSH-Bindung TSH-Bindung der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor Signaltransduktion der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren TSH-Rezeptor und cAMP-Signalkaskade Signalübertragung über intrazelluläre Rezeptoranteile Ligandenunabhängige Aktivierung der cAMP-Signalkaskade Immunologischer Nachweis und Strukturaufklärung der markierten TSH-Rezeptoren Expressionsprodukte zwischen 95 kDa und 120 kDa 	75 76 76 77 78 78 78 78 79 80 81 82
 4 Dis 4.1 4.2 4.2.1 4.2.2 4.3 4.3.1 4.3.2 4.3.3 4.3.4 4.4 4.4.1 4.4.2 	 Einführung der für die Epitope FLAG und HA kodierenden DNA-Nukleotidsequenzen in eine TSH-Rezeptor-cDNA mittels PCR TSH-Bindung der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte Bedeutung der wesentlichen TSH-Rezeptordomänen für die TSH-Bindung TSH-Bindung der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor Signaltransduktion der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren TSH-Rezeptor und cAMP-Signalkaskade Signalübertragung über intrazelluläre Rezeptoranteile Ligandenunabhängige Aktivierung der cAMP-Signalkaskade Immunologischer Nachweis und Strukturaufklärung der markierten TSH-Rezeptoren Expressionsprodukte zwischen 95 kDa und 120 kDa Hochmolekulare Expressionsprodukte 	75 76 76 77 78 78 78 78 79 80 81 82 83

4.5	.5 Herstellung von Antiseren gegen Fusionsproteine mit konkatemerisierten FLAG- und HA-Epitopen		
5	Zusammenfassung	92	
6	Literaturverzeichnis	94	
7	Abkürzungen	103	
8	Anhang	105	
8.1	Tabellen	105	
8.2	Materialauflistung	112	
8.2	1 Geräte und Verbrauchsmaterial	112	
8.2	2 Chemikalien	112	
8.2	3 Häufig gebrauchte Reaktions- und Elektrophoresepuffer	114	
8.2	4 Enzyme	115	
8.2	5 Vorgefertigte "Kits"	116	
8.2	6 Antikörper	116	
8.2	7 Vektoren	116	
8.2	8 Bakterienstämme und Kulturbedarf	117	
8.2	9 Eukaryote Zellen und Kulturbedarf	117	
8.2	10 Radio-Rezeptor-Assay	117	
8.2	11 cAMP-RIA	118	
9	Danksagung	119	
10	Lebenslauf	120	

1 Einleitung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht das TSH-Rezeptorprotein, das in Physiologie und Pathologie der Schilddrüse eine entscheidende Rolle spielt: im gesunden Organismus bindet der Rezeptor das Hypophysenhormon TSH und regt die Schilddrüse zu einer adäquaten Freisetzung von Schilddrüsenhormon an. Bei einer häufigen Ursache der Hyperthyreose, der Immunthyreopathie Morbus Basedow, vermitteln gegen das TSH-Rezeptormolekül gerichtete Autoantikörper das Erscheinungsbild der Erkrankung. Auch bei einer Reihe von anderen Erkrankungen, die mit hyper-, eu- oder hypothyreoten Stoffwechsellagen und Vergrößerungen der Schilddrüse einhergehen können, wurden Veränderungen der TSH-Rezeptorphysiologie beschrieben oder vermutet.

Während die Primärstruktur des Rezeptors auf DNA- und Proteinebene bereits weitgehend aufgeklärt ist, sind Modelle zur Sekundär- und Tertiärstruktur des Moleküls sowie strukturelle Aspekte der TSH-Bindung und Signalvermittlung bisher nicht ausreichend experimentell belegt. Eine nähere molekularbiologische Charakterisierung des Rezeptormoleküls sowie die Entwicklung von empfindlichen und aussagekräftigen Methoden zur Diagnostik lassen auf ein besseres Verständnis dieser Erkrankungen hoffen, auf dessen Grundlage neue diagnostische und therapeutische Optionen greifbar würden.

1.1 Der TSH-Rezeptor

Der TSH-Rezeptor vermittelt die Wirkung des hypophysären Glykoproteinhormons Thyrotropin (TSH) auf die Schilddrüsenzelle. Er wird aufgrund von Sequenzhomologien zu einer umfangreichen Familie von Rezeptorproteinen gezählt, deren Wirkung intrazellulär über sogenannte G-Proteine vermittelt wird. Gemeinsames Strukturmerkmal dieser Rezeptorfamilie ist ihr zweiteiliger Aufbau: von einer aminoterminalen, hydrophilen, extrazellulären Domäne lässt sich eine carboxyterminale Transmembrandomäne mit sieben die Zellmembran durchmessenden, aus α -Helices gebildeten Schleifen abgrenzen (Übersicht bei *Strader et al. 1994*). Zu dieser Familie gehören funktionell so weit auseinanderliegende Vertreter wie z.B. der β -adrenerge Rezeptor und andererseits auch die kürzlich entdeckten, für den Eintritt von HI-Viren in mononukleäre Zellen wichtigen Chemokinrezeptoren. Die Zahl der bisher charakterisierten G-Proteingekoppelten Rezeptoren übersteigt bereits 300 (*Baldwin 1994*).

Das in den thyrotropen Zellen der Adenohypophyse gebildete Hormon Thyrotropin (TSH) ist ein dimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 28 kDa. Seine α -Untereinheit ist identisch mit der der beiden anderen hypophysären Glykoproteinhormone Follitropin (FSH) und Lutropin (LH) sowie mit der des zu LH homologen plazentaren Choriongonadotropins (CG). Ihre Spezifität erhalten die Glykoproteinhormone durch ihre jeweilige β -Untereinheit. (Ryan et al. 1988)

Innerhalb der genannten Rezeptorfamilie bildet der TSH-Rezeptor mit den beiden anderen Glykoproteinhormon-Rezeptoren FSH-Rezeptor (*Minegishi et al. 1991*) und LH/CG-Rezeptor (*Minegishi et al. 1990*) eine Untergruppe. Dem hohen Molekulargewicht ihrer Liganden (28 - 38 kDa) entsprechend besitzen diese Rezeptoren eine deutlich größere extrazelluläre Bindungsdomäne als die anderen Vertreter der Molekülfamilie.

Die Primärstruktur des humanen TSH-Rezeptors wurde mit der Klonierung und Sequenzierung seiner cDNA aufgedeckt (*Libert et al. 1989*, *Frazier et al. 1990*, *Misrahi et al. 1990*, *Nagayama et al. 1990*). Die cDNA kodiert für ein Protein aus 764 Aminosäuren. Die ersten 21 Aminosäuren weisen Charakteristika eines Signalpeptids auf. Das menschliche TSH-Rezeptor-Gen umfasst mehr als 60 Kilobasen (*Gross et al. 1991*) auf Chromosom 14q31 (*Libert et al. 1990b*) und besteht aus zehn Exons. Exon 1 bis Exon 9 kodieren für praktisch die gesamte extrazelluläre Domäne, während die Sequenzinformation für den letzten Abschnitt der extrazellulären Domäne, die gesamte Transmembrandomäne sowie den intrazellulären C-Terminus des Rezeptors in Exon 10 zusammengefasst sind (*Gross et al. 1991*). Diese genomische Organisation legt die Vermutung nahe, dass der TSH-Rezeptor und die anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sich aus einem "Ur-Rezeptor" (Exon 10) entwickelt haben.

Die N-terminale, extrazelluläre Domäne des TSH-Rezeptormoleküls ist mit 394 Aminosäureresten sehr ausgedehnt, sie besitzt eine hohe Homologie zu den N-Termini der verwandten LH/CG- und FSH-Rezeptoren. Die extrazelluläre Domäne weist sechs putative N-Glykosylierungsstellen auf, deren korrekte Glykosylierung für die Interaktion von TSH und Rezeptor eine wichtige Rolle spielt (*Russo et al. 1991a*). Die hochaffine Bindung von TSH an den TSH-Rezeptor wird überwiegend von der N-terminalen Domäne und nur zu einem geringen Teil von den extrazellulären Schleifen der Transmembrandomäne vermittelt. Bemerkenswerterweise ist außer TSH auch LH/CG in der Lage, den TSH-Rezeptor zu aktivieren. Dies könnte erklären, warum in der Schwangerschaft, in der große Mengen CG im Organismus zirkulieren, eine Suppression von TSH bis hin zu manifesten Hyperthyreosen beobachtet wird. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei Patienten mit CG-bildenden Tumoren gemacht (Übersicht bei *Yoshimura et al. 1995*).

Die durch die extrazelluläre TSH-Bindung hervorgerufene Änderung der Rezeptorkonformation wird über die C-terminale Transmembrandomäne in das Zellinnere übertragen. Dieses Signal aktiviert ein mit dem Rezeptor assoziiertes G-Protein, dessen Bindungsstellen an den intrazellulären Schleifen der Transmembrandomäne lokalisiert sind.

1.2 Physiologie der Schilddrüse

Die Schilddrüse enthält kugelige Follikel, deren Zellen die beiden Schilddrüsenhormone Thyroxin (T_4) und Trijodthyronin (T_3) bilden. Das physiologisch wirksame Hormon ist T_3 , welches zu 80-90% in der Körper-Peripherie durch 5'-Dejodierung aus T_4 gebildet wird, 10-20% stammen direkt aus der Schilddrüse. Durch eine konkurrierende, periphere 5-Dejodierung von T4 entsteht außer T3 auch das strukturisomere reverse T3 (rT_3), welches als Hormon unwirksam ist. Der größte Teil der zirkulierenden Schilddrüsenhormone ist an Transportproteine (in absteigender Bedeutung: Thyroxin-bindendes Globulin/TBG, Transthyretin/TTR und Albumin) gebunden. Nur ein winziger Anteil (etwa ein Tausendstel) liegt als freies Hormon vor und ist damit wirksam. (Übersicht bei *Pfannenstiel et al. 1997*).

Die Schilddrüsenhormone sind in eine Vielzahl von Stoffwechselvorgängen eingebunden. Fehlen sie, z.B. bei angeborener Schilddrüsenaplasie, kommt es neben Wachstums- und Entwicklungsstörungen zu gravierenden neurologischen Defekten (Kretinismus). Beim Erwachsenen hat ein Mangel an T_4 bzw. T_3 schwere bis lebensbedrohliche Stoffwechselstörungen zur Folge.

Zur Synthese der jodhaltigen Schilddrüsenhormone T_4 und T_3 extrahieren die follikulären Thyreozyten über einen Na⁺/I⁻Symport aktiv Jodid (I⁻) aus dem Blutstrom. An der apikalen Membran gelangt das Jodid aus der Zelle in das Follikellumen. Eine membranständige Peroxidase (thyreoidale Peroxidase, TPO) vermittelt dort die Bildung von Wasserstoffperoxyd (H₂O₂), unter dessen Mitwirkung das Jodid zu atomarem Jod (I₂) oxidiert und an Tyrosinreste des follikulären Proteins Thyreoglobulin (Tg) konjugiert wird. Es entstehen Monojodo- (MJT) und Dijodo-Tyrosine (DJT), die dann an Thyreoglobulin gebunden zu Tetrajodthyronyl- (zwei Moleküle DJT) und Trijodthyronyl (ein Molekül DJT und ein Molekül MJT) gekoppelt werden. Die an Tg gebundenen Hormonvorstufen werden in dieser Form in den Schilddrüsenfollikeln gespeichert. Zur Hormonfreisetzung werden hormonbeladene Thyreoglobulinmoleküle mittels Pinozytose in das Zellinnere aufgenommen. In Lysosomen werden die Thyronylreste als Schilddrüsenhormone Thyroxin (T₄) und Trijodthyronin (T₃) aus ihrer Bindung an Thyreoglobulin hydrolysiert und über die basale Membran in den Blutstrom abgegeben. (*Kohn et al. 1995*)

Die Spiegel der freien Schilddrüsenhormone im Blut werden in einem Feedback-Regelkreis in engen Grenzen reguliert: eine Absenkung der Konzentration wird im Hypothalamus registriert und führt dort zur Freisetzung von TSH-Releasing-Hormon (TRH). Dieses gelangt über einen portalen Kreislauf zur Hypophyse, wo es die Freisetzung des hypophysären Hormons Thyrotropin (Thyroidea-stimulierendes Hormon, TSH) bewirkt.

Die überwiegende Zahl der zur Hormonsynthese und -freisetzung benötigten Stoffwechselvorgänge wird von TSH reguliert. In die verschiedenen Regulationsvorgänge sind sowohl die cAMP-Signalkaskade als auch der Signalweg über Phosphoinositol involviert. Über die Bildung von cAMP stimuliert TSH die Jodaufnahme in Thyrozyten; der Jodefflux am apikalen, follikelwärtigen Zellpol wird wahrscheinlich durch die Bildung von Phosphoinositol stimuliert. Die Iodination von Thyreoglobulin ist hauptsächlich vom Jodangebot abhängig. Die Synthese der dazu notwendigen Thyroperoxidase (TPO) und deren enzymatische Aktivität werden aber über die Bildung von cAMP von TSH kontrolliert, ebenso die Sekretion von Thyreoglobulin in das Follikellumen. Auch die Abgabe von Schilddrüsenhormon in das zirkulierende Blut wird von TSH stimuliert. Unabhängig von seinem Einfluss auf die Schilddrüsenfunktion übt TSH vor allem über die Bildung von cAMP einen proliferativen Effekt auf die Thyreozyten aus (*Vassart et al. 1992*).

1.3 Der TSH-Rezeptor in der Pathophysiologie von Schilddrüsenerkrankungen

Unter den endokrinologischen Erkrankungen zählen Schilddrüsenerkrankungen neben dem Diabetes mellitus sicher zu den häufigsten. Bei einer Anzahl dieser Schilddrüsenerkrankungen wurden Veränderungen am TSH-Rezeptor beobachtet, darunter klinisch so bedeutende Entitäten wie die funktionelle Schilddrüsenautonomie und die Immunthyreopathie Morbus Basedow.

1.3.1 Funktionelle Schilddrüsenautonomie

Bei der funktionellen Schilddrüsenautonomie haben sich Thyreozyten aus dem hypothalamo-hypophysär-thyreoidalen Regelkreis entzogen, sie sind ohne äußeren Stimulus konstitutiv aktiv (*Hüfner et al. 1996*). Die autonome Produktion von Schilddrüsenhormon führt zunächst zu einer Suppression von TSH und damit der regulierbaren Thyreozyten bei euthyreoter Schilddrüsenfunktionslage (latente Hyperthyreose). Durch die weitere Zunahme autonomer Areale oder eine exzessive Jodzufuhr wird sich häufig im Verlauf eine Hyperthyreose manifestieren.

Bei der uni- oder multifokalen Autonomie liegen einer oder mehrere singuläre Knoten autonomer Zellen vor. Bei der multifokalen Autonomie sind autonome Zellverbände über die gesamte Schilddrüse verteilt. Verschiedene Autoren haben in einer unterschiedlich hohen Anzahl von Knoten somatische Mutationen am TSH-Rezeptor gefunden. Die höchsten Prävalenzen werden in Studien beschrieben, in denen das gesamte Exon 10 des Rezeptors untersucht wurde (bis zu 80%) (Übersicht bei *Russo et al. 1997, Paschke et al. 1996, Tonacchera et al. 1996*). Die Tatsache, dass teilweise identische Keimbahn-Mutationen bei familiären Formen der Hyperthyreose entdeckt wurden, macht es sehr wahrscheinlich, dass diese Mutationen tatsächlich die Ursache und nicht ein Epiphänomen des autonomen Wachstums und der Funktion dieser Zellverbände sind. In einem kleinen Teil von Adenomen wurden aktivierende Mutationen in G-Proteinen, also weiter distal in der Signalkaskade, nachgewiesen.

Es überrascht die große Anzahl verschiedener Mutationen, die zu einer Aktivierung des TSH-Rezeptors führen: mehr als zehn Varianten wurden bereits beschrieben (*Tonacchera et al. 1996*). Die beobachtete Vielzahl von aktivierenden Mutationen liegt mit großer Wahrscheinlichkeit in der besonderen Eigenschaft des TSH-Rezeptors begründet, bereits ohne Ligandenbindung eine konstitutionelle Aktivierung der Rezeptor-Signalkaskade auszulösen. Es ist deshalb durchaus vorstellbar, dass minimale Änderungen in der Rezeptor-Primärstruktur an einer Vielzahl von Stellen eine solche konstitutionelle Aktivierung des Rezeptors begünstigen.

1.3.2 Morbus Basedow

Eine herausragende Bedeutung in der Pathologie von Schilddrüsenerkrankungen besitzt der TSH-Rezeptor bei der Immunthyreopathie Morbus Basedow (*Tonacchera et al. 1996*, *Paschke et al. 1996*). Im Serum von Erkrankten können Antikörper gegen den TSH-Rezeptor nachgewiesen werden, die für das Erscheinungsbild der Erkrankung verantwortlich gemacht werden. Zumeist handelt es sich bei den Immunglobulinen um

stimulierende Antikörper (TSAb, thyroid stimulating antibodies), die die funktionellen und proliferativen Effekte von TSH auf Thyreozyten imitieren. Durch die Förderung von Hormonsynthese und -exkretion entsteht eine hyperthyreote Stoffwechsellage. Der Einfluss dieser Antikörper auf die Proliferation der Thyreozyten wird für das klinische Bild einer diffusen Struma verantwortlich gemacht. Das Auftreten dieser Antikörper ist umso erstaunlicher, als der TSH-Rezeptor sich in vielen Versuchen zur Herstellung von TSH-Rezeptor-Antikörpern in verschiedenen Organismen als außerordentlich gering immunogen erwies. Obwohl die nachgewiesenen TSH-Rezeptor-Autoantikörper inzwischen weithin als im Mittelpunkt des Krankheitsgeschehens stehend anerkannt werden, sind entscheidende Aspekte der Ätiologie und Pathogenese dieser Erkrankung bisher nicht ausreichend erklärt.

Der Morbus Basedow ist eine häufige Erkrankung: die funktionelle Schilddrüsenautonomie und der Morbus Basedow bedingen zu etwa gleichen Häufigkeitsanteilen praktisch 99% der klinischen Hyperthyreosen in einem Jodmangelgebiet wie Deutschland (*Grußendorf 1996*). Eine genetische Disposition für die Erkrankung besitzen Träger der HLA-Antigene HLA-B8 und -DR3. Genetische Veränderungen am TSH-Rezeptor konnten bisher nicht als Ursache einer Induktion von Autoimmunität dingfest gemacht werden. Bei einem Teil der Basedow-Patienten wurden Veränderungen der TSH-Rezeptor-Primärstruktur gefunden (Asp36His, Pro52Thr), die sich jedoch als auch in bis zu 12% der Normalbevölkerung vorkommende Polymorphismen herausstellten (*Tonacchera et al. 1996*). Als ätiologische Faktoren werden weiterhin erhöhte Jodaufnahme, Yersinien- und virale Infekte (Kreuzantigenität von TSH-Rezeptor und Yersinienantigenen) und psychische Faktoren (Stress) diskutiert (nach *Weetman et al. 1994*).

Die beim Morbus Basedow gegen den TSH-Rezeptor gebildeten Antikörper müssen nicht notwendigerweise die Schilddrüse stimulieren. Eine Untergruppe der zumeist heterogenen Antikörperpopulation besitzt die Schilddrüsenfunktion hemmende Eigenschaften (TSBAb, thyroid stimulation blocking antibodies; Nomenklatur der TSH-Rezeptor-Autoantikörper bei *Rees-Smith et al. 1988*). TSAb und TSBAb können von erkrankten Müttern diaplazentar auf Föten übertragen werden, sie können beim Neugeborenen zu passageren Hyper- bzw. Hypothyreosen führen.

Zur Messung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern wird in der klinischen Routine ein Assay benutzt, bei dem Autoantikörper im Patientenserum mit TSH um die Bindung an TSH-Rezeptorpräparationen kompetieren (TRAK-Assay). Die in diesem Assay gemessenen Faktoren werden auch als TBII (TSH binding inhibition immunoglobulines) bezeichnet. Das Messergebnis erlaubt keine Differenzierung von stimulierenden oder blockierenden Antikörpern, da beide Subpopulationen TSH von der Rezeptorbindung verdrängen können und es andererseits auch Antikörper gibt, die mit diesem Assay nicht erfasst werden, da sie nicht mit TSH am Rezeptor kompetieren, sondern an einem anderen Epitop des Rezeptors binden. Dies könnte ein Grund für die Beobachtung sein, dass die im TRAK-Assay gemessenen Antikörper-Titer keine Aussage bezüglich Schwere, Prognose und Rezidivwahrscheinlichkeit des Morbus Basedow erlauben (prospektive Studie von *Schleusener et al. 1989*). In aufwendigeren Tests wird deshalb zusätzlich ermittelt, ob das Patientenserum die TSH-Rezeptor-Signalkaskade aktivieren kann (z.B. cAMP-Bioassay).

1.3.3 Endokrine Orbitopathie (EO), Thyroid-associated Ophthalmopathy (TAO)

Die endokrine Orbitopathie ist eine Autoimmunerkrankung, die in ca. 90% der Fälle von einer Schilddrüsendysfunktion begleitet wird. Meist ist dies der Morbus Basedow, der in bis zu 90% orbitale Veränderungen aufweist (*Paschke et al. 1986*); sie kann jedoch auch bei der Hashimoto-Thyreoditis und der primären idiopathischen Hypothyreose auftreten (*Kahaly 1996*).

Die Pathogenese der Erkrankung ist bis heute unklar. In 90% der Fälle lassen sich im Serum der Patienten TSH-Rezeptor-Autoantikörper nachweisen, so dass sich die Frage nach der Rolle des TSH-Rezeptors in der Pathogenese dieser Erkrankung stellt. Eine Reihe von Autoren haben mittels reverser Transkription und anschließender PCR (RT-PCR) TSH-Rezeptor-RNA in retroorbitalem Gewebe und anderen extrathyreoidalen Geweben nachweisen können (*Paschke et al. 1995*). Durch den immunologischen Nachweis von TSH-Rezeptorprotein in diesen Geweben wird die Rolle des TSH-Rezeptors als gemeinsames Autoantigen beim Morbus Basedow und der endokrinen Orbitopathie zusehends wahrscheinlicher (*Spitzweg et al. 1997*, *Stadlmayr et al. 1997*, *Bahn et al. 1998*).

1.3.4 Familiäre Hyper- und Hypothyreosen

Erbkrankheiten werden durch Keimbahnmutationen übertragen. Im Unterschied zu somatischen Mutationen, bei denen die Mutation nur in erkrankten Zellen gefunden wird (z.B. in autonomen Adenomen), befindet sich das vererbte mutierte Allel in allen Körperzellen. Das mutierte Allel kann ererbt oder durch Neumutation entstanden sein.

Verschiedene aktivierende Keimbahnmutationen in Familien mit erblicher Hyperthyreose wurden beschrieben. Die Schilddrüse der Patienten ist konstitutionell aktiviert und kann diffus vergrößert sein.

Bisher wurden zwei Mutationen im TSH-Rezeptor identifiziert, die eine verminderte oder vollständig eingebüßte Empfindlichkeit für TSH besitzen. Bei dieser seltenen Erkrankung können die Patienten euthyreot mit erhöhten basalen TSH-Spiegeln sein oder eine manifeste Hypothyreose aufweisen. (Übersicht bei *Tonacchera et al. 1996* und *Paschke et al. 1996*).

1.3.5 Differenzierte Schilddrüsen-Karzinome

Malignome der Schilddrüse sind selten mit einer Inzidenz von 1-5/100000 Einwohner und Jahr. Frauen sind 2-3x häufiger betroffen als Männer. Etwa 90% aller bösartigen Schilddrüsentumoren sind differenzierte Karzinome vom follikulären oder papillären Typ, diese Tumoren haben bei Behandlung eine relativ gute Prognose (*Goretzki et al. 1996*). Nur bei einem geringen Anteil dieser differenzierten Karzinome sind bisher Mutationen am TSH-Rezeptor gefunden worden (*Russo et al. 1995*, von herausragender Bedeutung in der Karzinomentwicklung scheinen andere Onkogene zu sein (Übersicht bei Farid et al. 1994).

1.3.6 Andere Schilddrüsenerkrankungen

Die chronische Thyreoiditis Hashimoto ist eine häufige Ursache der primären Hypothyreose. Bei dieser Autoimmunerkrankung stehen Antikörper gegen die thyreoidalen Antigene Thyreoperoxidase (TPO) und Thyreoglobulin (Tg) im Vordergrund. Im Serum einer kleinen Zahl von Patienten lassen sich jedoch blockierende TSH-Rezeptor-Autoantikörper (TSBAb) nachweisen, die bei diesen Patienten für die Unterfunktion der Schilddrüse mitverantwortlich gemacht werden (*Chiovato et al. 1990*).

Die häufigste Schilddrüsenerkrankung in Jodmangelgebieten wie Deutschland ist die euthyreote Struma. Neben den mechanischen und kosmetischen Problemen dieser Erkrankung wird sie kompliziert durch ihre Neigung, im Verlauf zunehmend autonome Areale mit der Tendenz zur hyperthyreoten Stoffwechselentgleisung hervorzubringen. Das Schilddrüsenwachstum kann zum Teil durch die erhöhte TSH-Sensitivität der Schilddrüse bei Jodmangel erklärt werden (*Bray 1968*). Die Patienten besitzen einen normalen TSH-Rezeptor, stimulierende TSH-Rezeptor-Autoantikörper spielen bei dieser Erkrankung keine Rolle (*Vitti et al. 1994*).

1.4 "Epitope tagging"

Antikörper binden an spezifische Erkennungsstrukturen auf Antigenen, sogenannte Epitope. Ein Antigen kann mehrere Epitope enthalten und Antikörper verschiedener Klonalität binden, oder bestimmte Epitope sind auf verschiedenen Antigenen vorhanden und vermitteln eine Kreuzreaktivität von monoklonalen Antikörpern. Die Strukturen, die einem Epitop zu Grunde liegen, können sich aus der Aufeinanderfolge von Aminosäuren in einer Peptidkette ergeben (lineare Epitope) oder durch im Molekül räumlich benachbarte Elemente - Aminosäuren oder Zuckerreste verschiedener Peptidketten - gebildet werden (konformationelle Epitope).

Mit Hilfe von Antikörpern ist es möglich, viele Eigenschaften eines Proteins zu studieren, so dessen Struktur, Funktion, Transport und viele weitere Merkmale. Die benötigten Antikörper können zum Beispiel durch Immunisierung von Mäusen mit Präparationen des Proteins gewonnen werden.

Die Herstellung von Antiseren ist jedoch komplex. Das Antigen steht häufig nicht in ausreichender Menge und Reinheit für die Immunisierung zur Verfügung. Häufig müssen einzelne Gewebeproben unter größter Sorgfalt gesammelt und bis zum Erreichen einer ausreichenden Menge aufwendig gelagert werden, um eine Autolyse zu verhindern. Extraktion und Aufreinigung stellen bei besonders seltenen oder fragilen Proteinen Probleme dar. Zusätzlich können bei diesen Prozessen wesentliche Eigenschaften der Proteine verändert werden. Die Immunisierung erfordert den Einsatz von Tieren, was durch deren individuelle Eigenschaften die Reproduzierbarkeit verschlechtert. Weitere Probleme treten bei der Gewinnung und Aufarbeitung der Seren auf, deren Standardisierung für den Routineeinsatz sehr aufwendig ist. Mit molekularbiologischen Techniken ist es möglich, über eine Manipulation der einem Protein zugrundeliegenden DNA-Sequenz kleine lineare Epitope an beliebigen Stellen in dessen Peptidkette einzubauen. Mit diesem "Epitope tag" (zu deutsch etwa Epitop-Markierung) kann das Protein nun mit Hilfe von sorgfältig erzeugten, allgemein verfügbaren und gut standardisierten Antikörpern untersucht werden (Übersicht bei *Shiio et al. 1995*, siehe auch im Literaturverzeichnis Epitope Tagging: Basic Laboratory Methods.). Idealerweise hat das Markerpeptid keinen oder nur einen minimalen Einfluss auf die zu untersuchenden Eigenschaften eines Proteins, die mit allen zur Verfügung stehenden immunologischen Methoden studiert werden können: Western Blot, Immunpräzipitation, Affinitätsreinigung, Immunfluoreszenz u.a. Einen bedeutenden Vorteil stellt die Epitopenmarkierung für die Untersuchung von neu entdeckten Genprodukten dar, da ausgehend von deren DNA-Sequenz bereits eine proteinbiochemische Analyse in Angriff genommen werden kann.

Ein prinzipieller Nachteil des Epitope-tagging ist der Umstand, dass das modifizierte cDNA-Konstrukt zuerst in einem geeigneten Expressionssystem transkribiert und translatiert werden muss, bevor das Protein mit dem Markerpeptid zur Verfügung steht. Dies kann in Bakterien, Hefen, Insektenzellen oder Säugetierzellen geschehen. Bei der Bewertung der Ergebnisse ist dann zu beachten, dass insbesondere posttranslationell erworbene Eigenschaften des Proteins umso weniger mit denen des nativen Proteins übereinstimmen müssen, je unähnlicher das gewählte Expressionssystem dem physiologischen Ort der Produktion ist.

1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit

Zur Zeit der Durchführung dieser Arbeit standen zuverlässige Antiseren zur Detektion des TSH-Rezeptormoleküls nicht allgemein zur Verfügung. Mehrere Versuche am Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung, mit rekombinanten TSH-Rezeptormolekülen als Immunogen Antiseren in verschiedenen Organismen zur erzeugen, führten nicht zum gewünschten Erfolg. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb der TSH-Rezeptor mit Hilfe der modernen Methode des "Epitope tagging" (Epitop-Markierung) einer Untersuchung mittels kommerziell erhältlicher Antiseren gegen die verwendeten Markerpeptide zugeführt werden.

Es wurden zwei verschiedene Markerpetide, FLAG (synthetisches Peptid) und HA (Influenza-Hämagglutinin), eingesetzt. Die Nukleotidsequenzen dieser Markerpeptide sollten in das 3'-Ende eines offenen Leserasters der TSH-Rezeptor-cDNA inseriert werden, diese Stelle entspricht auf Proteinebene dem unmittelbaren C-Terminus des Rezeptormoleküls.

Die modifizierten Rezeptorkonstrukte sollten in geeignete eukaryote Expressionssysteme (Cos-7-Zellen, Hela-Zellen) transfiziert und dort exprimiert werden. An transfizierten Zellen sollten dann mittels etablierter Verfahren (Radio-Rezeptor-Assay, cAMP-Bioassay) die Hormonbindungs- und Signalübertragungs-Eigenschaften der modifizierten TSH-Rezeptorproteine untersucht werden. Der proteinbiochemische Nachweis der modifizierten TSH-Rezeptorproteine und weitere strukturelle Untersuchungen sollten

mit Hilfe kommerzieller Antiseren gegen die verwendeten Markerpeptide aus Proteinpräparationen der transfizierten Zellen erfolgen. In einem weiteren Schritt sollte begonnen werden, die für Untersuchungen mittels Markerpeptiden benötigten Werkzeuge (Antikörper, Peptide) selbst herzustellen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Markerpeptide (epitope tags)

2.1.1 Das FLAG-Epitop

Das FLAG-Markerpeptid (*Hopp et al. 1988*) besteht aus acht Aminosäuren (AspTyrLysAspAspAspAspLys). Die beiden ladungstragenden Aminosäuren Asparaginsäure (Asp, sauer, pK_s=4,4) und Lysin (Lys, basisch, pK_s=10,0) und die aromatische Aminosäure Tyrosin (Tyr, pK_s=10,0) vermitteln dem Peptid ein Höchstmaß an Hydrophilie. Zur Synthese des Peptids wurde die kodierende DNA-Sequenz GACTACAAAGACGATGACGACAAA verwendet.

Das FLAG-Epitop wurde schon in einer Vielzahl von Anwendungen zur Markierung und Aufreinigung von Expressionsprodukten eingesetzt (siehe im Literaturverzeichnis: IBI FLAG Epitope). In dieser Arbeit wurde das FLAG-Markerpeptid mit einem kommerziell erwerblichem, aus Kaninchenseren gewonnenem, aufgereinigtem polyklonalem anti-FLAG-IgG-Serum detektiert (Santa Cruz Biotechnology Inc., Katalog-Nr. sc-807).

2.1.2 Das HA-Epitop

Das HA-Markerpeptid umfasst ein Epitop aus dem Hämagglutinin-Protein des Influenza-Virus (HA, Hämagglutinin) (*Green et al. 1982*). Es setzt sich aus neun Aminosäuren zusammen (TyrProTyrAspValProAspTyrAla), die wie das FLAG-Peptid eine hohe Hydrophilie vermitteln. Zur Expression dieses Peptids wurde die kodierende DNA-Sequenz TACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCC verwendet.

Zur Detektion des HA-Epitops wurde zunächst ein gegen das ursprüngliche HA-Motiv gerichteter monoklonaler Maus-anti-HA-Antikörper (Klon 12CA5, Boehringer Mannheim) eingesetzt. Mit diesem Antikörper ließen sich jedoch trotz Vorgehen nach Herstellervorschrift und mehrfacher methodischer Variation keine spezifischen Signale detektieren (Daten nicht gezeigt).

Daraufhin wurde mit Erfolg ein gegen ein aus 12 Aminosäuren bestehendes Peptid (CysTyrProTyrAspValProAspTyrAlaSerLeu) gerichtetes polyklonales Kaninchen-anti-HA-Antiserum (Berkeley Antibody Company BAbCO) verwendet.

2.2 Methoden zur Bearbeitung von DNA

Die zur Bearbeitung von DNA verwendeten Methoden wurden, wo nicht anders vermerkt, den einschlägigen Kapiteln im Laborhandbuch von Sambrook et al. entnommen (*Sambrook et al. 1989*). Die Proben wurden zumeist in Eppendorf-Gefäßen bearbeitet, zur Zentrifugation wurde eine Tischzentrifuge verwendet. Für Inkubationen über Raumtemperatur wurden Wasserbäder oder Heizblöcke verwendet, Reaktionen unter Raumtemperatur wurden in einer Kühlkammer im Wasserbad durchgeführt.

2.2.1 Ethanolfällung von DNA

Bei hoher Salzkonzentration und saurem pH bilden DNA-Moleküle in Ethanol unlösliche Komplexe. Einer in Puffer vorliegenden DNA-Lösung wurde Natriumacetat (pH 5,6) auf eine Endkonzentration von 0,3 M zugegeben. Das entstehende Volumen wurde mit der doppelten Menge Ethanol (96%) aufgefüllt (statt Ethanol im Verhältnis 2:1 wurde auch Isopropanol im Verhältnis 1:1 verwendet), 20 Minuten bei -20°C inkubiert und durch Zentrifugation pelletiert (15 Minuten, 14000 U/min., 4°C). Das Pellet wurde mit 70% igem Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in TE-Puffer oder Wasser resuspendiert.

2.2.2 Phenolextraktion von DNA

DNA-Lösungen können durch Extraktion mit Phenol von Proteinen und anderen organischen Verunreinigungen gereinigt werden. Die DNA-Lösung wurde im Verhältnis 1:1 mit equilibriertem Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1, pH>7.8) gut durchmischt. Die Phasen wurden anschließend durch Zentrifugation getrennt und die obere, wässrige Phase vorsichtig in ein neues Behältnis überführt. Dieser Vorgang wurde mit reinem Chloroform wiederholt. Bei Bedarf wurde anschließend eine Ethanolfällung durchgeführt.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Nukleinsäuren besitzen ein charakteristisches Absorptionsmaximum im ultravioletten Bereich (260 nm). Die optische Dichte (OD) von DNA-Lösungen bei 260 nm Wellenlänge wurde in einem Beckman-Spektrophotometer ermittelt. Eine OD von 1 bei 260 nm entspricht ca. 50 µg/ml Doppelstrang-DNA (dsDNA), 40 µg/ml Einzelstrang-DNA (ssDNA) oder RNA, und ca. 33 µg/ml für einzelsträngige Oligonukleotide. Eine Messung der OD bei 280 nm und Berechnung des Koeffizienten OD(260 nm)/OD(280 nm) ergibt bei reinen Proben Werte zwischen 1.8 und 2.0. Die Werte liegen niedriger bei Kontamination mit Protein oder Phenol.

2.2.4 Verdau von DNA mit bakteriellen Restriktionsenzymen

Restriktionsenzyme (v.a. bakterieller Herkunft) sind in der Lage, bestimmte Sequenzen in DNA-Doppelsträngen zu erkennen und diese dort in definierter Weise zu durchtrennen. Die Länge der erkannten Sequenzen variiert, sie liegt meist im Bereich von 6-8 Nukleotiden. Meist werden sog. palindrome Sequenzen (z.B. GGATCC, *Bam*HI) erkannt und asymmetrisch gespalten (hier z.B. nach dem ersten Nukleotid in 5'-3'-Leserichtung). Es entstehen sog. "sticky ends", d.h. überhängende Enden, an denen komplementäre Enden wieder "angeklebt" werden können (Ligation). Restriktionsenzyme wurden von verschiedenen einschlägigen Herstellern bezogen. DNA wurde nach Vorschrift des Herstellers mit dem gewünschten Enzym im mitgelieferten oder einem entsprechenden Enzympuffer angesetzt und über 1 bis 3 Stunden inkubiert und anschließend durch kurzes Erhitzen gestoppt.

2.2.5 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA-Molekülen

Zur Ligation von DNA-Strängen müssen die Fragmente einen Phosphatrest an ihrem 5'-Ende besitzen (bei doppelsträngiger DNA mindestens einer der beiden Stränge). Ligationsreaktionen, in denen verschiedene Fragmente aneinandergefügt werden sollen, lassen sich durch gezielte Phosphorylierung und Dephosphorylierung der Fragmente steuern. Zur Phosphorylierung wurde T4-Polynukleotid-Kinase, zur Dephosphorylierung eine alkalische Phosphatase verwendet. DNA-Fragmente wurden in einer geeigneten Konzentration (pico- bis nanomolar) nach Vorschrift des Herstellers mit dem Enzym und Puffer versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Als Phosphatlieferant diente 1 mM ATP.

2.2.6 Ligation von DNA-Molekülen

Mit Hilfe des Enzyms T4-DNA-Ligase lassen sich z.B. durch Restriktionsverdau gewonnene, doppelsträngige DNA-Fragmente wieder aneinanderfügen. Die Ligase benutzt dabei 5'-ständige Phosphatreste der DNA-Fragmente zur Wiederherstellung der Phosphatbrücken im Nukleinsäuregerüst.

Ligationen wurden nach Vorschrift des Hersteller im entsprechenden mitgelieferten Puffer durchgeführt. Zur Erleichterung der Kohäsion der Fragmente wurde die Reaktion über mehrere (bis zu 12) Stunden bei 16°C durchgeführt und anschließend gestoppt durch Erhitzen des Ansatzes für zehn Minuten auf 60°C.

2.2.7 Auftrennung von DNA auf analytischen oder präparativen Agarosegelen

Zur Auftrennung heterogener Nukleinsäuregemische aufgrund von Längenunterschieden wird die Agarose-Gelelektrophorese benutzt. Bei neutralem pH ist DNA durch die Phosphatgruppen im Phosphodesoxyribose-Rückgrat negativ geladen und wandert im elektrischen Feld zur Anode. Die Konzentration eines Gels aus Agarose beeinflusst die Trennschärfe. Durch Zugabe des fluoreszierenden Interkalators Ethidiumbromid, welcher sich proportional zur DNA-Menge zwischen den Basen einlagert, können die DNA-Banden sichtbar gemacht werden. Interkalierte Ethidiumbromid-Moleküle emittieren unter UV-Bestrahlung orangefarbiges Licht (590 nm).

Abhängig von den gewünschten Trenneigenschaften wurden 1%-5% (w/v) Agarosegele verwendet. Agarosepulver wurde zunächst in entsprechender Konzentration in Laufpuffer gelöst (Trisborat TBE oder Trisacetat TAE). Die vollständige Lösung der Agarose wurde durch Aufkochen in einem haushaltsüblichen Mikrowellen-Ofen erreicht. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 50°C wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration 1 μ g/ml) zugesetzt und das Gel in einer Gelschale mit Kamm zur Aussparung von Taschen gehärtet. Die aufzutrennende DNA-Lösung wurde im Verhältnis 1:10 mit Agarose-Gel-Ladepuffer versetzt. Nach Elektrophorese bei 50-120 V in einer Elektrophoresekammer mit Laufpuffer wurden die DNA-Banden unter UV-Beleuchtung (300 nm) visualisiert. Zur Längenabschätzung der DNA-Fragmente wurden diese zusammen mit DNA-Längenmarkern aufgetrennt.

Für analytische Gele wurde DNA in ng-Mengen aufgetragen. Für präparative Gele, aus denen einzelne DNA-Banden ausgeschnitten und DNA zurückgewonnen werden sollte, wurde entsprechend mehr DNA in breiten Taschen aufgetragen (µg-Mengen).

2.2.8 Elution von DNA aus Agarosegelen

Zur Rückgewinnung von DNA-Molekülen aus Agarose-Gelfragmenten wird die Agarosematrix thermisch und chemisch aufgelöst. Die DNA-Moleküle werden partikulär gebunden, pelletiert und in Puffer wieder aufgenommen. Es wurde ein kommerziell erhältliches Kit verwendet (QIAEX II gel extraction kit). DNA-Banden wurden im Agarosegel unter UV-Beleuchtung aufgesucht und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Gelfragmente wurden nach Vorschrift des Kit-Herstellers behandelt.

2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) wurde 1987 von Kary B. Mullis erfunden (*Mullis et al. 1987*), wofür er 1994 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurde. Die PCR ist eine hochempfindliche Technik zum Nachweis von DNA-Sequenzen in Proben, theoretisch ist die Erkennung und selektive, exponentielle Vermehrung eines einzelnen DNA-Moleküls mit der gesuchten Sequenz denkbar.

Der PCR liegt die zyklische Wiederholung folgender Reaktion zugrunde: Zunächst wird eine doppelsträngige Proben-DNA bei hoher Temperatur (95°C) in Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). Danach wird die Reaktionstemperatur soweit erniedrigt, dass kurze Oligonukleotide (engl. Primer), die die gesuchte Sequenz auf der 3'- und der 5'-Seite flankieren, an ihr Komplement in der Proben-DNA (engl. Template) binden können (Hybridisierung, engl. Annealing). Anschließend wird die Reaktionstemperatur auf das Temperaturoptimum einer thermostabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase erhöht (z.B. 72°C für die *Taq*-Polymerase), die die gebundenen Primer mit freien Deoxynukleotidtriphosphaten (dNTP) in 3'-Richtung komplementär zur vom Musterstrang vorgegebenen Sequenz verlängert (Synthese). Dieser Vorgang wird wiederholt. Nach einigen Zyklen liegt die von den beiden Primern flankierte Sequenz exponentiell vermehrt vor.

Die in dieser Arbeit eingesetzten PCR-Protokolle wurden zum Teil den speziellen Erfordernissen des Experiments angepasst und werden an der entsprechenden Textstelle erläutert. Ein übliches Pipettierschema lautete wie folgt:

100 ng	Primer I
100 ng	Primer II
0,1-1 μg	DNA (Template)
1,5 mM	MgCl ₂
0,2 mM	Nukleotid-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
0,5 U	DNA-Polymerase-Enzym (Taq oder Pfu)
5 µl	10x Polymerasepuffer
ad 50 μl	Wasser

Pipettierschema PCR

Die PCR wurde in 0,5 ml-Gefäßen in einem programmierbaren Heizblock (Thermocycler) durchgeführt. Zum Schutz vor Verdampfung wurden die Proben mit Mineralöl überschichtet.

2.2.10 Sequenzierung nach der Dideoxy-Methode

Zur Sequenzierung von DNA werden an einem einzelsträngigen DNA-Musterstrangausgehend von einem Primer in 5'-3'-Richtung durch eine Polymerase Komplementärstränge synthetisiert. Durch den zufälligen Einbau von in geringer Menge Reaktionsansatz enthaltenen Dideoxynukleotiden (ddN) im anstelle von Deoxynukleotiden (dN) kommt es zum Strangabbruch an dieser Stelle. Eine solche Reaktion wird zeitgleich mit ddA, ddC, ddG und ddT gestartet, so werden verschieden lange Komplementärstränge erzeugt, die über eine bestimmte Distanz vom Primer jeweils an allen in der Sequenz vorkommenden A-, C-, G- oder T-Basen abbrechen. Die Reaktionsansätze werden nebeneinander in ultrahochauflösenden Polyacrylamidgelen elektrophoretisch der Länge nach aufgetrennt, so dass DNA-Fragmente von einer Base Längendifferenz unterschieden werden können. In Kenntnis des im jeweiligen Reaktionsansatz vorhandenen Dideoxynukleotids kann so strickleiterartig die Sequenz aus dem Laufmuster der Komplementärfragmente erschlossen werden. Zur Darstellung des Laufmusters wird in die Komplementärstränge ein radioaktives Nukleotid eingebaut, welches einen Röntgenfilm belichtet.

Sequenzierungen wurden mit einem T7 Sequencing Kit nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Eingesetzt wurden ca. 2 - 5 µg Plasmid-DNA pro Ansatz. Als radioaktives Nukleotid wurde S³⁵-dATP eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte in 0,4 mm dünnen, denaturierenden Polyacrylamidgelen mit einem Acrylamidanteil von 6% in einer Hochspannungs-Elektrophorese-Apparatur. Die Gele wurden anschließend auf Whatman-Papier bei 70°C getrocknet und zur Sichtbarmachung des Laufmusters für 12 - 36 Stunden auf Röntgenfilm exponiert.

2.3 Umgang mit Plasmiden und bakteriellen Wirten

2.3.1 Verwendete Vektoren

2.3.1.1 pMOSblue

Zur Analyse von PCR-Produkten wurde der Vektor pMOSBlue (2887 bp) verwendet. Das linearisierte Plasmid besitzt an der Insertionsstelle 3'-T-Überhänge, die die Insertion von PCR-Produkten mit 3'-A-Überhängen (z.B. durch die *Taq*-Polymerase) favorisieren. Mit Hilfe einer im Vektor enthaltenen Ampicillin-Resistenz werden erfolgreich transformierte Bakterienkolonien selektioniert. Außerdem beinhaltet dieser Vektor einen Mechanismus zur Auffindung von Bakterienkolonien, die ein erfolgreich mit dem PCR-Produkt ligiertes Plasmid enthalten. Durch die Insertion eines Fragments (PCR-Produkt) wird im Vektor ein LacZ-Operon inaktiviert. Werden bestimmte Bakterienstämme mit dem Plasmid transformiert, so erscheinen Bakterienkolonien mit intaktem LacZ-Operon (ohne Insert) auf geeigneten Nährmedien durch Verstoffwechselung eines Galaktosederivats blau, während Kolonien mit Insert wegen des inaktivierten Operons keine Färbung aufweisen. (siehe im Literaturverzeichnis: pMOSBlue T-vector kit)

2.3.1.2 pcDL-SRα296

Zur transienten wie stabilen Transfektion der eukaryoten COS-7- bzw. Hela-Zellen wurde der Vektor pcDL-SR α 296 verwendet, da dieser Vektor besonders die Transskription und Translation eines in den Vektor eingesetzten Leserasters befördert. Der Vektor enthält einen hybriden Promoter, der aus Sequenzen des SV-40 (simian virus) early promoter und dem long terminal repeat (LTR) des humanen T-Zell Leukämievirus Typ 1 zusammengesetzt ist. (*Takebe et al. 1988*). Im Vergleich mit anderen eukaryoten Expressionssystemen konnte dieses System durch hohe Expression und die gleichmäßig gute Eignung für eine große Zahl häufig eingesetzter Zelltypen überzeugen (*Wenger et al. 1994*).

2.3.1.3 pSVneo

Der Vektor pSVneo vermittelt Resistenz gegen Antibiotika vom Typ des Neomycin. Dieser Vektor wurde bei der stabilen Transfektion von Hela-Zellen mit dem TSH-Rezeptor-Konstrukt in pcDL-SR α 296 kotransfiziert, um eine Selektion positiver Klone mit Geniticin durchführen zu können.

2.3.1.4 pET-31b(+)

Als Expressionsvektor für die FLAG- und HA-Peptide wurde der Vektor pET-31b(+) (Novagen) eingesetzt, der speziell für die bakterielle Expression rekombinanter Peptide und kleiner Proteine als Fusionsproteine konstruiert wurde (siehe im Literaturverzeichnis: pET System Manual).

Ein in den Vektor inseriertes Leseraster wird als Fusionsprotein exprimiert. Der N-Terminus des Fusionsproteins wird gebildet durch das hydrophobe Protein Ketosteroidisomerase (KSI), welches die Verpackung des Fusionsproteins in bakterielle Einschlusskörper (inclusion bodies) favorisiert und damit die Reinigung der rekombinanten Proteine erleichtert. Anschließend folgt die durch das inserierte DNA-Fragment vorgegebene Peptidsequenz. Den C-Terminus des Fusionsproteins bildet eine Hexahistidin-Sequenz (sog. "His-Tag"), die eine Affinitätsreinigung des Fusionsproteins durch Nickel-Agarose-Chromatographie ermöglicht. Eine Abspaltung des inserierten Anteils aus dem Fusionsproteins ist, soweit dieses kein Methionin enthält, durch eine chemische Lyse von Methioninresten stromauf- und -abwärts der Insertionsstelle möglich.

2.3.2 Verwendete Bakterienstämme

2.3.2.1 Escherichia coli XL1-blue

Der von Stratagene vertriebene *E.coli* XL1-blue Bakterienstamm wurde zur Propagierung von Plasmid-DNA benutzt. Der Stamm verfügt über die entsprechende genetische Ausstattung zur Durchführung einer blau/weiß-Selektion beim Einsatz entsprechender Vektoren (z.B. pMOS-blue, s.o.).

2.3.2.2 Escherichia coli BL21(DE3) und BL21(DE3)pLysS

Zur bakteriellen Expression von Fusionsproteinen im Vektor pET-31b(+) wurden *E.coli*-Stämme BL21(DE3) und BL21(DE3)pLysS eingesetzt. Diese Stämme enthalten das Gen für eine T7-RNA-Polymerase, die zur Transskription des Fusionsproteins benötigt wird. Die Expression dieser RNA-Polymerase kann wiederum durch das Galaktosederivat IPTG induziert werden, was eine kontrollierte Produktion von Fusionsprotein ermöglicht. Der Stamm BL21(DE3)pLysS exprimiert zusätzlich ein T7-Lysozym, welches in der Zelle eine basale Aktivität der T7-RNA-Polymerase unterdrückt. Durch diesen zusätzlichen Mechanismus kann die unerwünschte Expression der Ziel-DNA in Abwesenheit von IPTG praktisch vollständig verhindert werden.

2.3.3 Herstellung kompetenter bakterieller Wirte für die Transformation mit Plasmid-DNA

Zur Amplifikation von Plasmiden und zur Expression rekombinanter Proteine in Bakterien werden Stämme (überwiegend von *Escherichia coli*) verwandt, die durch Inkubation mit bestimmten Ionen zur effizienten Aufnahme von Plasmid-DNA befähigt werden. Diese Eigenschaft nennt man "Kompetenz". Entscheidend für den Erwerb ist die Anwesenheit von divalenten Kationen (hier Magnesium) und Membran-destabilisierenden Molekülen wie Polyethylenglykol und DMSO (verwendet wurde das Protokoll nach *Chung et al. 1989*).

Eine Einzelkolonie des gewünschten Stammes wurde über Nacht in 2 ml LB-Medium bei 37°C im Schüttelinkubator vermehrt. Am folgenden Tag wurde diese Kultur 1:100 in LB-Medium (200 ml) verdünnt und weiter im Schüttelinkubator kultiviert. Nach einigen Stunden erreichte die Kolonie die frühe Log-Phase ihres Wachstums, dieser Prozess wurde verfolgt durch Messung der Zelldichte in der Kultur, ermittelt als optische Dichte einer Probe bei 600 nm im Spektrophotometer. Bei Erreichen einer optische Dichte der Kultursuspension von 0.3 bis 0.4 wurden die Bakterienzellen pelletiert (10 ^Minuten bei 4°C). Das Zellpellet wurde in 1/10 des Ursprungsvolumen (z.B. 20 ml) eiskaltem TSS-Puffer (transformation and storage solution) resuspendiert. Die Suspension wurde dann zu 0,1 ml in eisgekühlte Eppendorf-Gefäße aliquotiert und sofort in Flüssigstickstoff (-196°C) schockgefroren, die Aliquots wurden bis zur Transformation bei -80°C gelagert.

2.3.4 Transformation bakterieller Wirte mit Plasmid-DNA

Unter Transformation versteht man eine Veränderung der genetischen Ausstattung von Bakterien durch Aufnahme von zirkulären DNA-Molekülen, sog. Plasmiden. Diese Plasmide werden unabhängig vom Bakteriengenom amplifiziert und auch transkribiert. Plasmide kommen in Bakterienzellen natürlich vor. Für molekularbiologische Zwecke werden Plasmide verwandt, die von natürlich vorkommenden Plasmiden abgeleitet sind und durch die Einführung neuer Eigenschaften vielfältige molekularbiologische Aufgaben wahrnehmen können. In Zusammenhang mit ihrer Eigenschaft, genetische Information in fremde Zellen einbringen zu können, um diese dort z.B. zu amplifizieren oder fremde Proteine herzustellen, werden sie als Vektoren bezeichnet.

Die Transformation wird mit sog. "kompetenten" Bakterienzellen durchgeführt (s.o.). Die Zellen wurden von -80°C Lagerungstemperatur langsam aufgetaut, dann wurde in geringer Menge (ng bis μ g) Plasmid-DNA zugegeben. Nach 30 Minuten weiterer Inkubation auf Eis wurde die Mischung für 30 Sekunden auf 42°C erhitzt Dieser "Hitzeschock" induziert die Expression von sog. "Hitzeschock-Proteinen" (heat-shockproteins), deren Anwesenheit die Bakterienzellen zur effizienten Aufnahme von extrazellulärer DNA befähigt. Nach dem Hitzeschock wurde der Bakteriensuspension 900 μ l LB-Medium zugegeben und die Zellen bei 37°C eine weitere Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agar ausplattiert und 4 Stunden bei 37°C im Inkubator belassen. Abhängig von der durch den Vektor vermittelten Resistenzeigenschaft wurde dem Agar zur Selektion erfolgreich transformierter Bakterienzellen ein Antibiotikum (z.B. Ampicillin) zugemischt.

2.3.5 Kolonie-Screening mit PCR (PCR colony screening)

Eine besonders einfache und elegante Methode zur Untersuchung einer großen Zahl von Bakterienkolonien auf das Vorhandensein und die Orientierung von inserierten DNA-Fragmenten bietet die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Durch geeignete Primeroligonukleotide lassen sich anhand der PCR-Produkte Aussagen zum Vorhandensein und der Orientierung von inserierten DNA-Sequenzen treffen (*Güssow et al. 1989*).

Zur Untersuchung bestimmte Kolonien wurden mit einer Pipettenspitze von der Agaroberfläche abgestreift. Auf einer zweiten Agarplatte wurde zur späteren Weiterbearbeitung durch einfaches Eintauchen der kontaminierten Pipettenspitze in den Agar eine "Kopie" der untersuchten Kolonie angelegt und inkubiert. Die Pipettenspitze wurde danach in ein Eppendorf-Gefäß mit einer kleinen Menge Wasser (100 μ l) getaucht und durchgespült. Kleine Mengen Plasmid-DNA wurden durch Erhitzen auf 95°C für 5 Minuten aus den Bakterienzellen freigesetzt. Ein Aliquot dieser Suspension wurde als Musterstrang-DNA in der PCR eingesetzt.

2.3.6 Präparation von DNA aus Bakterienzellen

Zur Analyse und Weiterverarbeitung muss Plasmid-DNA aus Bakterienzellen zurückgewonnen und gereinigt werden. Die Bakterienzellen werden dazu durch alkalische Lyse aufgebrochen und die Plasmid-DNA aufgrund ihrer besseren Löslichkeit in salzhaltigen, wässrigen Medien von Zellresten getrennt.

Die verwendete Methode zur Gewinnung kleinerer Mengen Plasmid-DNA basiert auf dem im Laborhandbuch (*Sambrook et al. 1989*) wiedergegebenen Protokoll. Die zur Anwendung kommende Modifikation beschleunigt das Verfahren (*LeGouill et al. 1994*).

Die über Nacht bei 37°C in 2 ml LB-Medium gewachsenen Bakterien wurden in Eppendorf-Röhrchen pelletiert und in 100 µl Miniprep-Lösung I resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte in alkalischem Milieu mit 200 µl Miniprep-Lösung II. Danach wurden 200 µl Chloroform und 150 µl Miniprep-Lösung III zugegeben. Bei der anschließenden Zentrifugation (5-10 Minuten, 14000 U/min. bei 4°C in einer Tischzentrifuge) trennte sich eine untere organische Phase von einer oberen wässrigen Phase mit der Plasmid-DNA. Ausgefallene bakterielle Proteine bildeten zusammen mit der genomischen DNA eine scharfe Interphase über der organischen Chloroformphase. Die wässrige Phase mit der Plasmid-DNA wurde vorsichtig in ein sauberes Eppendorf-Gefäß überführt. Die Verunreinigung durch bakterielle RNA konnte durch kurze Inkubation bei 37°C mit RNAse A beseitigt werden.

Wurden größere Mengen Plasmid-DNA benötigt, wäre prinzipiell die mehrfache Anwendung der beschriebenen Methode möglich. Zur Vereinfachung wurde jedoch hierzu ein kommerzielles Kit nach Vorschrift des Herstellers verwendet (JetStar-Kit, Genomed). Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte hier über Chromatographie-Säulen.

2.3.7 Expression von Proteinen in Bakterien

Die Herstellung in Bakterienzellen stellt die einfachste Methode zur Gewinnung rekombinanter Proteine dar. Bakterien besitzen den kompletten Syntheseapparat, die Synthese von Protein lässt sich mit geeigneten Promotersequenzen auch auf Fremdvektoren initiieren. Allerdings können Bakterien Proteine nur eingeschränkt posttranslationell modifizieren, so dass z.B. komplex gefaltete oder glykosylierte eukaryote Proteine nicht funktionell exprimiert werden können.

Zur Herstellung der Fusionsproteine mit den FLAG- bzw. HA-Peptiden wurden die Stämme *E.coli* BL21(DE3) und BL21(DE3)pLysS eingesetzt. Zunächst wurden Bakterienkolonien in Abwesenheit von IPTG vermehrt. Dazu wurde eine Kolonie von der Mutterplatte mit einer Pipettenspitze in 1 ml flüssiges LB-Medium mit Ampicillin überführt und über Nacht bei 37°C im Schüttel-Inkubator vermehrt. Am folgenden Tag wurden 100 μ l dieser Kolonie in 10 ml flüssigem LB-Medium mit Ampicillin verdünnt und für weitere 90 Minuten inkubiert. Durch Zugabe von 1 mM Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) wurde die Expression des Plasmid-Gens induziert und die Inkubation über mehrere Stunden fortgesetzt. Zur Gewinnung größerer Mengen Protein konnte der beschriebene Ansatz auf das gewünschte Maß skaliert werden.

Zur Analyse der nach Induktion exprimierten Proteine genügte es, ein Aliquot der Kultur zu entnehmen, die Bakterienzellen zu pelletieren, in SDS-PAGE-Ladepuffer (s. dort) zu denaturieren, mittels SDS-PAGE aufzutrennen und die Proteine im Gel mit Coomassie-Färbung sichtbar zu machen.

Zur quantitativen Gewinnung der bakteriell exprimierten rekombinanten Proteine wurden die Bakterienzellen nach Abschluss der Expressionsphase pelletiert und in einer geeigneten Menge Ultraschall-Puffer resuspendiert. In diese Suspension wurde mehrmals für wenige Sekunden (z.B. 2-3 x 20 Sek.) ein Ultraschallwellen-Applikator getaucht. Durch die Einwirkung des Puffers und der Schallwellen-Energie wurde die Zellwand der Bakterien zerstört und die zähe Bakterien-DNA fragmentiert. Die Mehrzahl der löslichen zellulären Proteine gingen im Puffer in Lösung, die unlöslichen wurden mit dem Detritus pelletiert. Diese unlösliche Fraktion wurde ebenfalls in einer geeigneten Menge Ultraschall-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden beide Fraktionen mittels SDS-PAGE elektrophoretisch analysiert.

2.4 Methoden zum Umgang mit Proteinen

2.4.1 Präparation von Protein aus Zellkulturen

Zur Präparation von Proteinlysaten wurden Zellkulturen bis 70-80% Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden einmal mit kaltem PBS gewaschen und sofort mit 1 ml kaltem Lysepuffer bedeckt. Nach 20 Minuten Inkubation auf Eis wurden die lysierten Zellfragmente vom Plastikboden abgeschabt und die Suspension vollständig in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Suspension wurde danach 10 Minuten bei 10000 U/min. und 4°C zentrifugiert (Tischzentrifuge), um Zelldetritus, denaturierte DNA und weitere unerwünschte Bestandteile der Suspension zu pelletieren. Das gereinigte Proteinlysat wurde in frischen Eppendorf-Gefäßen bei -20°C gelagert.

2.4.2 Reinigung von Hexahistidin-haltigem Protein durch Nickel-Agarose-Säulenchromatographie

Eine lineare Aminosäuresequenz von mindestens sechs Histidinresten (Hexahistidin, "His-Tag") in direkter Abfolge geht mit Nickelionen eine stabile Metall-Chelat-Verbindung ein. Proteine, die diese Sequenz enthalten, können deshalb mit Nickel-Agarose chromatographisch gereinigt werden.

Die Chromatographie wurde nach dem Protokoll für unlösliche Proteinfraktionen durchgeführt (siehe im Literaturverzeichnis: pET System Manual). Diese wurde pelletiert und in einer geeigneten Menge Puffer A aufgenommen (10 ml). Die Suspension wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur in einem kleinen Becherglas mit einem Magnetrührer gerührt. Eine geeignete Menge (2-8 ml) Nickel-Agarose wurde zunächst über 5 Minuten mit 50 ml Chromatographiepuffer A equilibriert, dann schonend zentrifugiert (2 Minuten bei 2000 U/Min.), der Überstand wurde bis auf das Ursprungsvolumen (4-8 ml) verworfen. Dieses Volumen Nickel-Agarose wurde mit der Proteinsuspension durchmischt und für 45 Minuten weiter gerührt (50 μ l Aliquot = Waschprobe a). Darauf wurde das Protein/Nickel-Agarose-Gemisch in eine passend dimensionierte Chromatographie-Säule mit Filterfritte gegeben. Die ablaufende Flüssigkeit wurde asserviert (Waschprobe b).

Es erfolgte ein Waschdurchlauf mit 20 ml Chromatographiepuffer A (Waschprobe c), danach mit Chromatographiepuffer B (Waschprobe d). Letzterer wurde mit soviel Volumen durchgeführt, bis eine spektrophotometrische Messung eines Aliquots des Durchlaufs eine optische Dichte $\leq 0,01$ bei einer Wellenlänge von 280 nm ergab (Verunreinigung durch unerwünschtes Protein). Dieses Vorgehen wiederholte sich mit dem stringenteren Chromatographiepuffer C (Waschprobe e).

Die Elution des zurückgehaltenen Proteins erfolgte mit Chromatographiepuffer C/250 mM Imidazol. Das Eluat wurde in 5 Portionen zu je 3 ml asserviert (Elution 1-5). Diese wurden zusammen mit den Waschproben gelelektrophoretisch analysiert. Zur Entfernung des Elutionspuffers wurden die Eluate in geeigneten Dialyseschläuchen über48 Stunden gegen insgesamt 10 Liter PBS-Puffer dialysiert.

2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit dem "Bio-Rad Protein Assay"

Eine saure Lösung von Coomassie-Blau G-250 verschiebt in Anwesenheit von Protein ihr Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm. Dieses Prinzip liegt dem Protein-Assay von BioRad zugrunde (siehe im Literaturverzeichnis: Bio-Rad Protein Assay). Da nur eine orientierende Konzentrationsbestimmung der Proteinlösungen angestrebt wurde, wurde stets die im Hersteller-Handbuch beschriebene Microassay-Procedure verwendet. Die Absorption der Proben wurde in einem Beckman-Spektrophotometer bestimmt, die jeweilige Proteinkonzentration in der Probe wurde durch Auftragen des Messwerts auf eine Standardkurve ermittelt.

Es erwies sich allerdings, dass das im Lysepuffer anwesende Detergens Nonidet P-40 mit dem Assay interferierte. Eine von der Proteinkonzentration unabhängige intensive Blaufärbung der Probe nach Zugabe des Bio-Rad Reagens führte zu unbrauchbaren Resultaten. Gute Resultate ließen sich nach Verdünnung der eingesetzten Proteinlösung auf mindestens 1:200 erzielen.

2.4.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Assay

Das Prinzip dieses zuverlässigeren Assays beruht auf der Fähigkeit von Proteinen, zweiwertiges Kupfer (Cu²⁺) zu einwertigen Kupfer (Cu⁺) zu reduzieren. Mit letzteren bildet Bicinchoninsäure (BCA) farbige Komplexe, die ein Absorptionsmaximum bei 562 nm Wellenlänge besitzen. Nach Vorschrift des Herstellers (siehe im Literaturverzeichnis: BCA Protein Assay Reagent -Instructions.) wurde aus den mitgelieferten Bestandteilen (BCA-Lösung und Kupfersulfat) eine Arbeitsverdünnung hergestellt. Ein Volumen der zu bestimmenden Proteinlysate (50 µl) wurde mit 50 Volumina (1 ml) der Arbeitsverdünnung versetzt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die auf Raumtemperatur abgekühlten Proben wurden anschließend bei einer Wellenlänge von 562 nm im Beckman-Spektrophotometer gemessen. Mit aufsteigenden Konzentrationen von bovinem Serumalbumin (BSA, 0,2 -1,2 mg/ml in PBS) eine Standardkurve ermittelt und auf Millimeterpapier aufgetragen. Alle Proben wurden gegen PBS (Referenzwert) gemessen. Die Messwerte der Proteinlysate wurden durch eine Leerwertmessung (Lysepuffer ohne Protein) korrigiert.

2.4.5 Deglykosylierung von Glykoproteinen

Das Enzym N-Glycosidase F (Boehringer Mannheim, Katalog-Nr. 1365 177) aus *Flavobacterium meningosepticum* spaltet Asparagin-gebundene N-Glycanketten. Geeignete Mengen Glykoprotein wurden nach Vorschrift des Herstellers in einer entsprechenden Pufferumgebung bei 37°C über mehrere Stunden inkubiert.

2.4.6 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Wie Nukleinsäuren lassen sich auch Proteine elektrophoretisch auftrennen. Um mit der Auftrennung eine Sortierung nach dem Molekulargewicht zu erzeugen, müssen die Proteine zunächst entfaltet und proportional zu ihrer Größe mit (negativen) Ladungsträgern besetzt werden. Diese Funktion übernimmt das Detergens Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS).

Bei der hier zur Anwendung kommenden diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Laemmli wird durch eine methodische Besonderheit die Trennschärfe verbessert: in der Laufstrecke der aufzutrennenden Proteine ändern sich Pufferzusammensetzung und die Geldichte. An der Grenze vom grobporigen Sammelgel (pH 6,8) zum feinporigen Trenngel (pH 9,2) werden die Proteine zunächst zu einer dünnen Schicht zusammengepresst, bevor die Auftrennung beginnt (*Sambrook et al. 1989*).

Die verwendeten Polyacrylamidgele wurden mit einem Acrylamidgehalt von 6-12% hergestellt. Als Laufpuffer wurde ein Tris/Glycin Puffersystem (TGS-Puffer) verwendet. Die Proben wurden vor Auftrag auf das Gel in einem SDS- und Mercaptoethanolhaltigen Puffer (SDS-PAGE-Ladepuffer) denaturiert und reduziert, dies geschah in der Regel für 5 Minuten bei 95°C. Die diesem Puffer beigegebene Farbmarkierung erlaubte die Beobachtung des Laufverhaltens während der Elektrophorese. Als Referenz zur Abschätzung des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine wurde in jedem Gel eine Laufspur mit 1,5 μ l Molekulargewichtsmarker beladen. Die Elektrophorese wurde in der Regel in einer handelsüblichen 10x10 cm-Apparatur durchgeführt. Zur Anfärbung der aufgetrennten Proteinbanden in nativen SDS-PAGE-Gelen wurde der Farbstoff Coomassieblau-R250 verwendet.

2.4.7 Western Blot

Zur Immundetektion wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidinfluorid(PVDF)-Membran transferiert (Blotting). Hierzu wurde eine "Semi-dry"-Elektroblot-Methode eingesetzt.

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteingele aus der Elektrophorese-Apparatur entfernt und sofort kurz in Elektroblot-Transferpuffer equilibriert. Eine PVDF-Membran in geeigneter Größe wurde kurz mit Methanol benetzt und anschließend ebenfalls in Elektroblot-Transferpuffer equilibriert. Whatman-Papier wurde ebenfalls mit Elektroblot-Transferpuffer gut befeuchtet. Die Elektroblot-Apparatur wurde luftblasenfrei wie folgt zusammengesetzt: Kathode (-), 3 Lagen Papier, Proteingel, PVDF-Membran, 3 Lagen Papier, Anode (+). Zum Transfer der Proteine auf die Membran wurde ein Stunde lang ein Strom von 0,8 mA/cm² (ca. 80 mA/Blot) angelegt.

Zur Detektion des Antigens wurden die Blots zunächst vollständig auf Whatman-3MM-Papier getrocknet. Nach Benetzung der PVDF-Membran mit Methanol wurde der Blot anschließend 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einer sanft bewegten Wipptischvorrichtung ("Rocking Platform") mit Blockierreagenz inkubiert und danach 5 Minuten mit TBST gewaschen.

Der Erstantikörper wurde in geeigneter Konzentration in TBST mit 20% (v/v) Blockierreagenz gelöst. Um in möglichst kleinen Volumina inkubieren zu können, wurden die Blots gelegentlich zusammen mit der Antikörperlösung in Plastikfolie eingeschweißt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf der Mischvorrichtung durchgeführt. Vor Inkubation mit dem Zweitantikörper wurden die Blots dreifach mit TBST gewaschen.

Als Zweitantikörper wurden Meerettich-Peroxidase(Horseraddish-Peroxidase, HRP)-Konjugate von anti-Immunglobulin-Antikörpern mit Speziesspezifität für die Immunglobuline des Erstantikörpers verwendet. Der Zweitantikörper wurde ebenfalls in TBST mit 20% (v/v) Blockierreagenz verdünnt. Die Blots wurden erneut für 30 Minuten auf der Mischvorrichtung mit der Antikörperlösung inkubiert und danach dreifach mit TBST gewaschen.

Die Lokalisation der Peroxidase-Konjugate auf den Blots wurde durch Chemilumineszenz ermittelt. Verwendet wurde ein Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Kit RPN 2109) (Amersham Life Science, Katalog-Nr. verwendet (siehe im Literaturverzeichnis: ECL Western Blotting Protocols.). Zunächst wurden die Blots kurz mit Wasser abgespült und nach Vorschrift des Herstellers für eine Minute mit frisch angesetzer ECL-Mixtur bedeckt. Bis zu zehnfache Verdünnung der ECL-Mixtur führte zu verlängerten Expositionszeiten ohne die Qualität der Blots zu beeinträchtigen. Die Zugabe von bovinem Serumalbumin (BSA, 0,3-3% v/v) zur ECL-Mixtur führte zu einer erheblichen Reduktion des Hintergrunds ohne wesentlichen Signalverlust (Okamura et al. 1995). Die mit ECL-Mixtur behandelten Blots wurden in gut lichtdurchlässiger Plastikfolie eingeschweißt und nach Bedarf für wenige Sekunden bis mehrere Stunden auf Röntgenfilm exponiert.

2.4.8 Immunpräzipitation

Antigen-beladene Antikörper können mittels Staphylokokken-Protein A (bindet F_{c} -Fragmente von Immunglobulinen) an Sepharose-Kügelchen gekoppelt werden, um Antigene aus Proteingemischen spezifisch zu reinigen und anzureichern.

500 µl Proteinlysat wurden dazu mit einer geeigneten Menge Antikörper versetzt und eine Stunde bei 4°C inkubiert. Im Proteinlysat vorhandene grobe Bestandteile wurden danach abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Zu der vorinkubierten Antigen/Antikörper-Mischung wurden 30 µl Protein-A-Sepharose gegeben und wiederum eine Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die mit Antikörper-Antigen-Komplexen beladenen Protein-A-Sepharosekügelchen mittels Zentrifugation präzipitiert und mehrfach mit Lysepuffer gewaschen. Zur Durchführung einer SDS-PAGE-Elektrophorese wurde das gebundene Antigen durch Denaturierung mit Ladepuffer freigesetzt. (modifiziert nach *Kriegler 1990*).

2.5 Methoden zum Umgang mit eukaryoten Zellen

2.5.1 Eukaryote Zellen zur Expression der TSH-Rezeptorkonstrukte

2.5.1.1 Cos-7-Zellen

Cos-7 ist eine Linie aus Affennierenzellen von Cercopithecus aethiops. Es handelt sich um Fibroblasten-artige Zellen, die in Zellkultur als Monolayer wachsen. (DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Nr. ACC 60, *Gluzman 1981*).

2.5.1.2 Hela-Zellen

Die Hela-Zellinie ist die älteste kontinuierlich kultivierte humane Zellinie. Sie wurde Anfang der fünfziger Jahre aus einem Zervix-Adenokarzinom einer damals 31-jährigen Afroamerikanerin gewonnen. Die Zellen wachsen in Zellkultur epithelartig. (DSMZ, Nr. ACC 57, *Scherer et al. 1953, Gey 1952*).

2.5.2 Zellkultur

2.5.2.1 Medien

Eukaryote Zellen (Cos-7, Hela) wurden in Dulbecco's modified of Eagle's medium (DMEM, 4.5 g/l Dextrose) kultiviert, dem 2 mM Glutamin, 1% v/v Penicillin/Streptomycin (10000 U/ 10000 μ g/ml) sowie 1% v/v foetales Kälberserum (FCS) zugesetzt wurden.

Dem Selektionsmedium für stabil transfizierte Zellen wurden 500 μ g/ml Geneticin (G-418) zugesetzt.

In den cAMP-Bioassays wurde HEPES-gepuffertes Minimal Essential Medium (MEM) mit 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin (IBMX) als Phosphodiesterase-Hemmstoff eingesetzt.

2.5.2.2 Kultur

Die Zellen wurden in handelsüblichen Zellkulturflaschen oder Petrischalen bei 37°C in einer Kohlendioxid-haltigen Atmosphäre (5% CO₂) inkubiert. Bei Erreichen von Konfluenz wurden die Zellen mit einer 0.5% Trypsinlösung vom Schalenboden abgelöst und in geringerer Zellzahl in neuem Medium angesetzt (sog. Passage). Wo nötig wurden Passagen mit fester Zellzahl durchgeführt, dazu wurden Aliquots suspendierter Zellen nach Trypanblaufärbung avitaler Zellen in einer Neubauer-Kammer ausgezählt.

2.5.2.3 Lagerung in Flüssigstickstoff

Zur Lagerung vitaler Zellen wurden Zellsuspensionen in Kulturmedium mit 10% v/v DMSO versetzt und schonend gefroren. Die endgültige Lagerung erfolgte in Flüssigstickstoff (-196°C).

2.5.3 Transfektion von eukaryoten Zellen

2.5.3.1 Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode

Der Mechanismus der Transfektion mit DEAE-Dextran ist nicht aufgeklärt (Sambrook et al. 1989). Es wird vermutet, dass das polymere Dextran DNA bindet und deren Abbau

durch Nukleasen verhindert, außerdem binden diese Komplexe möglicherweise besonders effizient an Zellen und vermitteln eine erleichterte Endozytose.

Es wurde eine vereinfachte Methode eingesetzt (*Cullen 1987*). $4x10^5$ Einzelzellen der zu transfizierenden Zellart wurden auf 10 cm-Kulturschalen mit 10 ml Medium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden 4 µg DNA pro Kulturschale in 1520 µl Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) und 80 µl DEAE-Dextran Lösung (10 mg/ml) angesetzt und auf 37°C vorgewärmt (Transfektions-Mix). Vor der Transfektion wurde das Kulturmedium von den Kulturschalen abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, dann wurden 1,6 ml des Transfektions-Mix vorsichtig auf die Zellen aufgetropft. Darauf wurden die Zellen 30 Minuten bei 37°C mit dem Transfektions-Mix inkubiert. Danach wurde vorgewärmtes Kulturmedium mit 80 µM Chloroquin zugegeben und die Zellen für weitere 150 Minuten bei 37°C inkubiert. Um die Aufnahme von DNA/DEAE-Dextran-Praezipitaten in die Zellen zu steigern, wurde danach das Medium entfernt und die Zellen mit 2,5 ml Kulturmedium mit 10% (v/v) DMSO überschichtet. Nach einer Minute wurde diese Lösung durch frisches Kulturmedium ersetzt und die Zellen bis zu ihrer experimentellen Verwendung weiter bei 37°C inkubiert.

2.5.3.2 Transfektion mittels Liposomen

Durch ihre Ähnlichkeit mit zellulären Membranen sind Liposomen besonders gut geeignet, schlecht membrangängige Stoffe wie z.B. DNA-Moleküle in Zielzellen einzuschleusen (*Felgner et al. 1987*). Wegen ihrer vergleichsweise hohen Effizienz wurde diese Methode zur stabilen Transfektion von Hela-Zellen eingesetzt.

Die Transfektion wurde mit LipofectAMINE-Reagens (Gibco BRL) nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. $4x10^5$ Einzelzellen der zu transfizierenden Zellart wurden in 35 mm-Kulturschalen mit 2 ml Kulturmedium angesetzt. Je 1 µg Plasmid-DNA in 100 µl DMEM wurde in einem Eppendorf-Röhrchen mit 6 µl LipofectAMINE-Reagens in 100 µl DMEM versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Lösung wurde mit 800 µl DMEM auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt und auf eine mit PBS gewaschene Zellkultur aufgebracht. Nach fünfstündiger Inkubation bei 37°C wurde den Zellkulturen 1 ml Kulturmedium mit 20% (v/v) fötalem Kälberserum zupipettiert und weiter inkubiert.

2.5.4 Transiente und stabile Transfektion

Da die Plasmid-kodierte Information häufig nach einer bestimmten Zeit aus der Zelle ausgeschleust wird, muss auf stabil zu transfizierende Zellen ein Selektionsdruck ausgeübt werden, der Plasmid-haltige Zellen bevorteilt. Dies wurde durch Kotransfektion des Expressionsvektors mit dem Resistenz-Plasmid pSVneo (Verhältnis 10:1) erreicht, durch dessen Aufnahme Plasmid-haltige Zellen unter Einwirkung des Antibiotikums Geneticin (G-418, Gibco BRL) überleben können.

2.6 Methoden zur Messung von zellulären Funktionen

2.6.1 Radio-Rezeptor-Assay

Im Radio-Rezeptor-Assay (RRA) wird die Bindung von Liganden an ihren Rezeptor gemessen. Das Messprinzip basiert auf der Kompetition von unmarkiertem mit radioaktiv markiertem Liganden (Tracer) am Rezeptor. Die Verdrängung des Tracers durch steigende Konzentrationen des unmarkierten Liganden wird radiometrisch gemessen und die Messwerte grafisch aufgetragen. Die ermittelte Bindungskurve erlaubt Rückschlüsse auf die Bindungscharakteristik von Rezeptor und Ligand.

Eine festgelegte Anzahl der zu untersuchenden Zellen (z.B. 4x10⁵) wurde in 10 cm-Kulturschalen ausplattiert und bis zu ca. 80% Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde das Kulturmedium verworfen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und gänzlich unbedeckt bei -22°C im Eisschrank eingefroren. Am folgenden Tag wurden die abgetöteten Zellreste aufgetaut, von ihrer Unterlage gelöst und in CAP-Puffer aufgenommen. Dort wurden erkennbare Zellreste nochmals mittels einer Zählkammer gezählt und die Suspension auf eine geeignete Zellzahl eingestellt.

Untersucht wurden Präparationen aus mit FLAG-TSHR- und HA-TSHR-cDNA transfizierten Zellen. Als Positivkontrolle wurden Präparationen von Zellen gleichen Zelltyps eingesetzt, die unmodifizierten Wildtyp-TSH-Rezeptor exprimierten. Als Negativkontrolle dienten untransfizierte Zellen gleichen Typs.

Als Tracer wurde 125-Jod-markiertes, bovines TSH (freundlich zur Verfügung gestellt von Dr. Willey, IHF, s. a. *Willey et al. 1993*) verwendet. Dieses wurde mit CAP-Puffer so verdünnt, dass 100 μ l Lösung ca. 10000 cpm (counts per minute, Zählrate) enthielten. Als Kompetitor wurde bovines TSH (0,5 IU/mg, Organon) über einen Konzentrationsbereich von 0 bis 10⁵ ng/ml TSH verwendet.

Der im Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung entwickelte Radio-Rezeptor-Assay wurde unter Zusatz von humanem Serum durchgeführt (*Willey et al. 1993*).

Die Reaktionsansätze wurden in 5ml Teströhrchen pipettiert. Für jeden Messwert wurde eine Dreifach-Bestimmung angesetzt. Ein Reaktionsansatz bestand aus 200 μ l Zell-suspension, 100 μ l Kompetitor, 100 μ l Serum und 100 μ l Tracer.

Die Reaktionsansätze wurden über Nacht bei 30°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die korpuskulären Bestandteile des Reaktionsansatzes, zu denen auch die Zellmembranen mit den Rezeptoren und dem gebundenen Tracer gehörten, mit PEG-haltigem Präzipitationsreagenz präzipitiert. Das Präzipitat wurde pelletiert und die ungebundene Tracersubstanz mit dem Überstand verworfen.

Die Radioaktivität der Pellets wurde in einem Gammacounter gemessen. Aus den gemessenen Daten wurde mit Hilfe eines Computerprogramms der Anteil von gebundenem Tracer in Prozent der insgesamt eingesetzten Tracer-Menge errechnet (B/B_0) . Die Messwerte wurden mit Hilfe des Computerprogramms SigmaPlot (Jandel Scientific) grafisch dargestellt.

2.6.2 Cyclo-Adenosin-Monophosphat-Bioaktivitäts-Assay (cAMP-Bioassay)

Ein häufiger Signalweg, dessen Bedeutung für den TSH-Rezeptor aufgezeigt werden konnte, ist die Cyclo-Adenosinmonophosphat-Kaskade. Bindet der Rezeptor seinen Liganden, so wird dieses Signal an intrazelluläre, membranassoziierte G-Proteine übermittelt, die das Enzym Adenylatcyclase zur Bildung des "second messengers" (sekundären Botenstoffs) cyclo-Adenosinmonophosphat (cAMP) anregen.

Die Konzentration von cAMP in Kulturmedium nach Stimulation mit TSH wurde mittels eines Radio-Immuno-Assays (RIA) bestimmt. In diesem RIA wurde die Bindung einer unbekannten Konzentration von cAMP an einen polyklonalen, cAMP-spezifischen Antikörper mit einer festgelegten Konzentration radioaktiv markierten cAMP kompetiert. Die absoluten Konzentrationswerte wurden mittels einer Standardkurve ermittelt. Die Standardkurve wurde ermittelt, indem bekannte Konzentrationen von cAMP (Standard-Lösungen) als x-Werte und die für diese Konzentrationen im RIA ermittelte Radioaktivität auf einer y-Werte in einem Koordinatensystem aufgetragen wurden.

Eine festgelegte Anzahl der zu untersuchenden Zellen (z.B. $5x10^4$ Zellen) wurde in 2 ml DMEM in 2 ml-Kulturschalen ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium (DMEM) abgesaugt und durch das Stimulationsmedium mit aufsteigenden Konzentrationen von bTSH in HEPES-gepuffertem Minimal Essential Medium (MEM) ersetzt. Diesem wurde der Phosphodiesterase-Hemmstoff IBMX (3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin) in einer Konzentration von 250 μ M zugesetzt, der den Abbau von aus den Zellen ins Medium gelangtem cAMP verhindert.

Die Stimulation wurde über 6 bzw. 24 Stunden durchgeführt. Nach Ablauf dieser Zeit wurden Aliquots des Überstands aus den Kulturschalen entnommen, deren cAMP-Gehalt wurde radioimmunometrisch bestimmt.

	Puffer	Standards	Proben	Tracer	Antikörper
Total Counts				100 μl	
Nicht-spezifische Bindung	300 μl			100 μl	
vollständige Tracerbindung	100 µl			100 µl	200 µl
Standards	-	100 μl		100 µl	200 µl
Proben			100 μl	100 µl	200 µl

Pipettierschema cAMP-RIA

Die Reaktion wurde in Natriumacetat-Puffer angesetzt. Als Standards wurden Verdünnungen von cAMP eingesetzt (1,95 / 3,9 / 7,8 / 15,6 / 31,3 / 62,5 / 125 / 250 / 500 / 1000 pmol/ml). Als Tracer wurde radioaktiv markiertes 125-Jod-cAMP verwendet. Alle Reagenzien und Antikörper wurden vom Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung zur Verfügung gestellt.

Die Reaktionsansätze wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe durch Zugabe von 1 ml einer Stoplösung präzipitiert. Diese wurden pelletiert (30 Min., 3.000 U/min., 4°C) und die Radioaktivität der Pellets in einem Gammacounter gemessen. Die gezählten Impulse wurden von einem Computer-programm in Konzentrationswerte umgesetzt.

2.7 Herstellung von Antiseren

Zur Gewinnung von Antiseren gegen die erzeugten Fusionsproteine mit den konkatemeren FLAG- und HA-Epitopen wurden Wistar-Ratten mit FLAG- und HA-Fusionsprotein immunisiert. Eingesetzt wurden je 100 µg mittels Nickel-Agarose-Chromatographie aufgereinigtes und gegen PBS dialysiertes FLAG-7mer- und HA-5mer-Fusionsprotein. Für beide Fusionsproteine wurden jeweils drei Ratten immunisiert.

Immur	nisier	unasc	oroto	koll
mmman	110101	ungor		NOIL

Tag 0	100 μg Protein in einem Gesamtvolumen von 1 ml Abnahme von Präimmunserum	50% CFA / 50% PBS
nach 4 Wochen	100 μ g Protein in einem Gesamtvolumen von 1 ml Abnahme des ersten Immunserums	50% IFA / 50% CFA
nach 8 Wochen	100 μ g Protein in einem Gesamtvolumen von 1 ml	50% IFA / 50% CFA
nach 12 Wochen	100 μ g Protein in einem Gesamtvolumen von 1 ml	50% IFA / 50% CFA
nach 14 Wochen	Abnahme des zweiten und letzten Immunserums durch Herzpunktion	

Protokoll für die Immunisierung von jeweils drei Wistar-Ratten mit FLAG- und HA-Fusionsprotein. CFA: complete Freund's adjuvant; IFA: incomplete Freund's adjuvant; PBS: Phosphatpuffer.

Es wurden je 100 µg Protein in einem Gesamtvolumen von 1 ml mit Adjuvans (CFA: complete Freund's adjuvant; IFA: incomplete Freund's adjuvant) gelöst und zu den angegebenen Zeitpunkten in 200 µl-Aliquots subcutan an verschiedenen Stellen unter die Rückenhaut der Tiere appliziert.

Die Gewinnung der Seren erfolgte am Tag 0 und nach vier Wochen durch Punktion eines retroorbitalen Blutgefäßes in Ethernarkose. Nach 14 Wochen wurde Serum durch eine Herzpunktion in Ethernarkose gewonnen, wodurch die Tiere gleichzeitig getötet wurden. Das gewonnene Blut wurde über Nacht bei 4°C geronnen, am folgenden Tag wurde der Blutkuchen abzentifugiert. Das reine Serum wurde bis zur Durchführung der Experimente aliquotiert bei -20°C aufbewahrt.

3 Ergebnisse

3.1 Einführung der für die Markerpeptide FLAG und HA kodierenden DNA-Nukleotidsequenzen in eine TSH-Rezeptor-cDNA mittels PCR

Die zur Markierung des TSH-Rezeptormoleküls in dieser Arbeit verwendeten Epitope FLAG (synthetisches Peptid) und HA (Teil des Influenza-Hämagglutinins) sind lineare Peptidsequenzen von acht bzw. neun Aminosäuren Länge. Um den TSH-Rezeptor mit Antikörpern gegen diese Epitope untersuchen zu können, mussten die Markerpeptide nahtlos in die Aminosäuresequenz des Rezeptormoleküls eingebettet werden. Da eine solche Modifikation "chemisch" auf Proteinebene kaum vorstellbar ist, bot sich am einfachsten ein Eingriff bereits auf der Ebene einer für das Rezeptormolekül kodierenden cDNA an. Die für ein lineares Markerpeptid kodierenden Basentripletts mussten also in das Leseraster einer vorhandenen TSH-Rezeptor-cDNA integriert werden, das markierte Rezeptormolekül konnte dann durch Expression der veränderten cDNA gewonnen werden. Eine Modifikation (PCR) erreicht werden.

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Es sollte ein 3'-terminales Teilstück des TSH-Rezeptor-Leserasters erzeugt werden, das die zusätzlichen Sequenzinformationen für die Markerpeptide am N-Terminus des TSH-Rezeptorproteins enthält. Die Wiederherstellung des gesamten Leserasters sollte später durch eine Ligation mit dem entsprechenden 5'-Teilstück erfolgen (siehe Abbildung 1). Ausgangspunkt der Synthese und Musterstrang für die Polymerase-Kettenreaktion bildete deshalb eine vollständige, 2,5 Kilobasen (kb) große, lineare TSH-Rezeptor-cDNA dar (1 kb = 1000 Basenpaare, bp). Diese cDNA wurde durch *Bam*H I- und *Hinc* II-Restriktion eines Plasmids aus dem Bestand des Instituts gewonnen, welches das benötigte Leseraster enthielt (pTSHR6L-8.15, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Nicholas Hunt, IHF).

Als 5'-Primer (upstream primer) wurde eine 20 Basen lange Nukeotidsequenz von Position +2141 bis +2161 im TSH-Rezeptor-Leseraster verwendet. Diese Sequenz befindet sich unmittelbar stromaufwärts der einzigen im TSH-Rezeptor-Leseraster vorkommenden *Bst*E II-Restriktionsstelle. Die Position für den 5'-Primer wurde so festgelegt, damit durch Restriktion der ursprünglichen TSH-Rezeptor-cDNA mit *Bst*E II so ein 5'-terminales cDNA-Fragment gewonnen werden konnte, welches nach Ligation mit dem PCR-Produkt die Wiederherstellung eines vollständigen Leserasters erlaubte.


Herstellung einer FLAG-TSHR-cDNA.

Abbildung 1

Syntheseweg eines Expressionsvektors mit einer TSH-Rezeptor-cDNA, an deren 3'-Terminus vor dem STOP-Codon ein Leseraster für das FLAG-Epitop eingefügt wurde. Erläuterungen siehe Text.

Als 3'-Primer (downstream primer) wurden Oligonukleotide verwendet, die das Einschleusen von Basenpaaren mit der Sequenzinformation für die Markerpeptide ermöglichten. Zu diesem Zweck bestanden diese Primer aus zwei Anteilen. Die Basen des dem TSH-Rezeptor-Leseraster "zugewandten" 3'-Anteils hybridisierten spezifisch mit den letzten 13 Basen des TSH-Rezeptor-Leserasters unmittelbar vor dessen Stop-Codon (TAA). Im dem Leseraster "abgewandten" 5'-Anteil der Oligonukleotide schloss sich die Sequenzinformation für das FLAG- (24 Basen) oder das HA-Epitop (27 Basen) an, gefolgt von 9 Basen, welche im fertigen PCR-Produkt für den Abschluss des Leserasters durch ein neues Stop-Codon (TAA) und eine *Bam*H I-Restriktionsstelle zur Erleichterung der späteren Subklonierung kodierten. Die Notwendigkeit eines abschließenden Cytosin-Nukleotid ergab sich aus einer Eigenschaft des *Bam*H I-Restriktionsenzyms, welches zur korrekten Bindung an seine Erkennungssequenz (GGATCC) flankierende Nukleotide benötigt.

Primer-Oligonukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion.

Primer TSHR	-5'								
Sequenz	5 ' \rightarrow GAACAGCACTGATATTCAGG \rightarrow 3 '								
Komplement	$3' \leftarrow \dots CTTGTCGTGACTATAAGTCCAAGTTTTCCAATGGGT \dots \leftarrow 5'$								
Größe	20 Basenpaare								
geschätzte Annealing-Temperatur: 58°C									
Primer HA-TSHR-3'									
Komplement	5 ' \rightarrow GCAAACGGTTTTG (TAA) \rightarrow 3 '								
Sequenz	3 ' \leftarrow CGTTTGCCAAAACATGGGGATGCTGCACGGGCTGATGCGG ATT <u>CCTAGG</u> C \leftarrow 5 '								
Größe	50 Basenpaare								
Primer FLAG-TSHR-3'									
Komplement	5 ' \rightarrow GCAAACGGTTTTG (TAA) \rightarrow 3 '								
Sequenz	3 ' \leftarrow CGTTTGCCAAAACCTGATGTTTCTGCTACTGCTGTTT ATT$CCTAGGC \leftarrow 5$ '								
Größe	47 Basenpaare								
geschätzte Annealing-Temperatur für die 3'-Primer: 38°C									

Der Primer TSHR-5' wurde mit jeweils einem der 3'-Primer kombiniert. Sequenz -Primersequenz. Komplement - Komlementärsequenz zum Primer im Musterstrang (template, TSH-Rezeptor-cDNA). Pfeile - Leserichtung der DNA-Polymerase.

Die Primersequenz wurde für die 3'-Primer invers $(3'\rightarrow 5')$ angegeben, um die Vorstellung von der Leserichtung im späteren PCR-Produkt zu erleichtern. Der kodierende Strang ist jeweils oberhalb des nicht-kodierenden Strangs dargestellt.

Die Annealing Temperatur der Primer wurde anhand der empirischen Formel T[$^{\circ}$ C]= 4x(G+C) + 2x(A+T) in Näherung ermittelt.

Fett markiert sind die in der Sequenz enthaltenen STOP-Codons (5'-TAA-3' auf dem kodierenden Strang). Unterstrichen sind die Restriktionsstellen der Enzyme *Bam*H I (3'-Primer) und *Bst*E II (TSHR-cDNA).

Da sich die geschätzte Annealing-Temperatur der beiden Primer stark unterschied, wurde die Polymerase-Kettenreaktion nach einem sogenannten Hot-Start/Touch-Down-Protokoll durchgeführt. Mit dieser methodischen Verfeinerung sollten unspezifische Primerbindungen und unerwünschte Syntheseprodukte weitgehend vermieden werden (hohe Stringenz).

Dazu wurde der Reaktionsansatz ohne Musterstrang-DNA (engl. template) in den PCR-Block gegeben und für 5' auf 80°C erwärmt. Nach Zugabe der Musterstrang-DNA wurden zunächst zwei PCR-Zyklen bei hoher Hybridisierungstemperatur (57°C) durchgeführt. Bei dieser Temperatur konnte nur für den 5'-Primer eine Hybridisierung und nachfolgende Verlängerung erwartet werden. In den folgenden PCR-Zyklen wurde die Hybridisierungstemperatur in jedem zweiten Zyklus um 4°C erniedrigt, um irgendwann auch dem 3'-Primer die Hybridisierung mit dem Musterstrang zu ermöglichen. Das Minimum der Annealing-Temperatur wurde in zwei PCR-Zyklen bei 35°C erreicht, wobei aus Sicherheitsgründen die geschätzte Temperatur für eine gute 3'-Primerbindung noch unterschritten wurde. Nach diesem Temperatur-"Touch Down" konnte erwartet werden, dass bereits einige PCR-Produkte mit der vollständigen Komplementärsequenz des 3'-Primers synthetisiert worden waren. Für deren Hybridisierungstemperatur (47/50 bp) konnte angenommen werden, dass sie mit Sicherheit noch höher als die des 5'-Primers (20 bp) sein würde. Zur Verbesserung der Stringenz wurde deshalb die Hybridisierungstemperatur in den folgenden zehn PCR-Zyklen wieder in den Bereich des 5'-Primers angehoben (55°C). In einem alternativen Protokoll wurde der Touch-Down zugunsten einer höheren Stringenz bei 40°C beendet, also etwas oberhalb der empirisch ermittelten optimalen Annealing-Temperatur der 3'-Primer (Protokolle siehe Anhang, Tabelle A-1 und A-2).

Als Polymerase-Enzym wurde nicht wie üblich die thermostabile DNA-Polymerase von *Thermophilus aquaticus (Taq)* verwendet, sondern die *Pfu*-Polymerase, da diese eine deutlich geringere Anzahl von Schreibfehlern im Synthesestrang erzeugt. In einem abschließenden Reaktionsschritt wurden die Ansätze zusätzlich für 10 Minuten bei 72°C mit *Taq*-Polymerase inkubiert, um die für die Klonierung in den Vektor pMOSblue notwendigen überhängenden Adenosin-Nukleotide ("A-Überhänge") an das 3'-Ende der PCR-Produkte anzufügen.



PCR-Produkte.

Abbildung 2

Die PCR-Produkte aus beiden PCR-Protokollen wurden zur Analyse auf ein 1% Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Marker - DNA-Molekulargewichts-Marker, Angabe der Banden in Basenpaaren (bp) bzw. Kilobasen (kb).

Mit beiden Protokollen gelang die Synthese von PCR-Produkten, die bei elektrophoretischer Analyse die erwartete Größe von ~180 Basenpaaren (bp) (HA 178 bp, FLAG 175 bp) aufwiesen und frei von Verunreinigungen durch unspezifische Nebenprodukte waren (Abbildung 2).

3.1.2 Wiederherstellung des vollständigen Leserasters einer FLAG/HA-TSH-Rezeptor-cDNA

Die PCR-Produkte wurden anschließend zur weiteren Analyse aus dem Gel eluiert und in den Vektor pMOSblue ligiert. Mit dem Ligationsprodukt wurden kompetente *E.coli*-XL1-blue-Bakterienzellen transformiert, die mit diesem Vektor eine Unterscheidung von Insert-tragenden Kolonien anhand deren Weißfärbung erlauben (siehe Material und Methoden).

Für die vollständige Wiederherstellung des TSH-Rezeptor-Leseraster durch Restriktion und Re-Ligation im Vektor pMOSblue war es notwendig, dass die PCR-Produkte in korrekter Leserichtung im Vektor pMOSblue vorlagen. Beim Screening der farblich positiven Kolonien mittels PCR (siehe Material und Methoden) wurden deshalb die Primer so gewählt, dass nur ein PCR-Produkt entstehen konnte, wenn die Inserts in einer bestimmten Orientierung im Vektor vorlagen (siehe Skizze, Protokoll siehe Anhang Tabelle A-3).

Prinzip einer PCR zur Überprüfung der Orientierung des FLAG/HA-TSHR-cDNA-PCR-Produkts im Vektor pMOSblue.



Abbildung 3

Kolonie-Screening mittels PCR. Eine PCR mit einem Primer innerhalb und einem Primer außerhalb der zu prüfenden Insert-DNA ergibt nur ein Produkt, wenn das Insert in der richtigen Leserichtung eingebaut wurde. Ein solches Screening kann aus einer durch Kochen denaturierten Bakterien-Suspension durchgeführt werden, eine vorherige Aufreinigung der DNA ist nicht notwendig.

Von Kolonien, die das PCR-Produkt in der korrekten Orientierung enthielten, wurde Plasmid-DNA präpariert. Durch eine anschließende vollständige Dideoxy-Sequenzierung der Plasmidregion mit dem inserierten PCR-Produkt wurden Klone identifiziert, die das PCR-Produkt in voller Länge mit korrekter Sequenz enthielten.

Das vollständige Leseraster der TSH-Rezeptor-cDNA wurde nun zunächst im Vektor pMOSblue wiederhergestellt. Aus dem Plasmid mit dem PCR-Produkt wurde dazu durch Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Xba* I und *Bst*E II ein kleines Oligonukleotid

aus der "Multiple Cloning Region" direkt stromaufwärts des inserierten PCR-Produkts entfernt und der Vektor so linearisiert, dass eine Insertionsstelle mit einem freien *Xba* I-Überhang 5'-wärts und einem freien *Bst*E II-Überhang 3'-wärts entstand (siehe Abbildung 1). Durch Insertion eines linearen *Xba* I/*Bst*E II-Fragments aus dem 5'-Terminus der ursprünglichen TSH-Rezeptor-DNA wurde anschließend der Vektor rezirkularisiert und das vollständige Leseraster wiederhergestellt.

Zur Expression der so erzeugten Konstrukte in eukaryoten Zellen wurde das modifizierte TSH-Rezeptor-Leseraster mittels *Bam*H I-Restriktionsverdau vollständig aus dem Vektor pMOSblue herausgelöst und in einen mit *Bam*H I linearisierten Expressionsvektor pCDL-SRα296 ligiert. Die 3'-Termini des linearisierten Vektors pCDL-SRα296 wurden dazu vor der Ligation dephosphoryliert (Enzym: shrimp alkaline phosphatase, SAP), um die bei einer solchen Ligation mit identischen Schnittstellen (*Bam*H I/*Bam*H I) hohe Wahrscheinlichkeit einer Rezirkularisierung des Vektors ohne Aufnahme des TSH-Rezeptor-*Bam*H I-Fragments zu verringern.

Mit dem Ligationsprodukt wurden erneut kompetente Bakterienzellen (*E.coli* XL1-blue) transformiert. Durch einen analytischen *Hind* III-Verdau der aus einzelnen Kolonien gewonnenen Plasmid-DNA wurde das Vorhandensein und die korrekte Orientierung des TSH-Rezeptor-Leserasters ermittelt (charakteristisches Bandenmuster aufgrund der Verteilung von *Hind* III-Restriktionsstellen im Leseraster). Die Basensequenz von im Screening positiven Plasmiden wurde durch erneute Dideoxy-Sequenzierung einer Region von stromaufwärts der *Bst*E II-Restriktionsstelle im TSH-Rezeptor-Leseraster bis stromabwärts über die FLAG- bzw. HA-Sequenzen und das STOP-Signal hinaus überprüft.

3.2 Transiente Expression von FLAG-TSHR und HA-TSHR in Cos-7-Zellen

Nachdem die Herstellung eines Expressionsvektors mit den modifizierten TSH-Rezeptor-Leserastern gelungen war, sollte die Funktionsfähigkeit der Rezeptorkonstrukte in eukaryoten Zellen untersucht werden. Dazu wurden die modifizierten TSH-Rezeptoren zunächst transient in Cos-7-Zellen exprimiert.

Um zu ermitteln, ob die modifizierten Rezeptorkonstrukte in eukaryoten Expressionssystemen korrekt synthetisiert und in die Plasmamembran integriert werden, wurden zunächst Hormonbindungs-Studien an Membranen von transient transfizierten Zellen durchgeführt. Danach wurde die biologische Funktion der Rezeptorkonstrukte anhand der Stimulierbarkeit der Adenylatcyclase-Kaskade nach Hormonbindung untersucht.

3.2.1 Transiente Transfektion von Cos-7-Zellen

Jeweils 4 μ g Plasmid-DNA (FLAG-TSHR, HA-TSHR, Wildtyp-TSHR als Positivkontrolle, pCDL-SR α 296 als Negativkontrolle) wurden in 4x10⁵ Cos-7-Zellen mittels DEAE-Dextran-Methode transfiziert.

3.2.2 TSH-Bindung von transient in Cos-7-Zellen exprimierten TSH-Rezeptorkonstrukten

48 und 72 Stunden nach Transfektion wurden Kulturen aus dem Inkubator entnommen, das Kulturmedium entfernt und die Zellen zur Terminierung aller Stoffwechselvorgänge bei -30°C tiefgefroren. Nach dem Wiederauftauen wurden die Zellen als Ganzes von den Kulturplatten gelöst und in Puffer aufgenommen und die TSH-Bindung der suspendierten Zellmembranen mittels Radio-Rezeptor-Assay untersucht.

Die Kompetition von unmarkiertem TSH mit jodmarkiertem TSH (Tracer) an Bindungsstellen von Membanpräparationen der beiden modifizierten Konstrukte (FLAG-TSHR, HA-TSHR), eines rekombinanten Wildtyp-Rezeptors (WT-TSHR als Positivkontrolle) sowie zweier Negativkontrollen (Vektor pCDL-SR α 296 und untransfizierte Cos-7-Zellen) wurde über einen Konzentrationsbereich von 0 bis 10^5 ng/ml untersucht. An sechs Messpunkten (0, 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 ng/ml unmarkiertes TSH) wurden Dreifachbestimmungen der Tracerbindung durchgeführt. Die Tracerbindung bei unterschiedlichen Konzentrationen "kalten" TSH wurde als Prozentwert des eingesetzten Tracers (100%) ausgedrückt (Näheres siehe Material und Methoden). Dargestellt ist die graphische Auftragung der Messergebnisse (Daten siehe Anhang, Tabelle A-4).

In Abwesenheit von unmarkiertem TSH wurde eine deutlich höhere Bindung von jodmarkiertem TSH (Tracer) in Membranpräparationen von mit den TSH-Rezeptorkonstrukten transfizierten Zellen (FLAG-TSHR, HA-TSHR, Wildtyp-TSHR) detektiert als in Membranen von untransfizierten und mit leerem Vektor (pCDL-SR α 296 ohne TSH-Rezeptor-Insert) transfizierten Zellen (Negativ-Kontrollen). Jodmarkierter Tracer konnte von steigenden Konzentrationen unmarkiertem TSH aus der Bindung an die mit TSH-Rezeptorkonstrukten transfizierten Zellen verdrängt werden, bis sich bei Konzentrationen > 10⁴ ng/ml unmarkierten TSH die Tracer-Bindung nicht mehr von der der Negativ-Kontrollen unterschied (unspezifische Bindung).



Radio-Rezeptor-Assay mit transfizierten Cos-7-Zellen.

Abbildung 4

Kompetition von unmarkiertem bTSH mit jodmarkiertem TSH (Tracer) an transient exprimierten TSH-Rezeptor-Konstrukten in Cos-7-Zellen 72 Stunden nach Transfektion. Die aufgetragenen Werte entsprechen dem Mittelwert von 3 Messungen, Balken: Standardfehler des Mittelwerts.

Die Kompetitionskurven zeigten einen sigmoiden Verlauf. Kompetition an den Bindungsstellen erfolgte über einen Konzentrationsbereich von etwa 10 ng/ml bis $10 \mu g/ml$ unmarkiertem TSH. Die Kompetitionskurven der modifizierten TSH-Rezeptorkonstrukte unterschieden sich nicht merklich von der des Wildtyp-Rezeptors.

3.2.3 Signaltransduktion von TSH-Rezeptorkonstrukten in COS-7-Zellen

Die Veränderung am intrazellulären C-Terminus der Primärstruktur des TSH-Rezeptors beeinflusste also nicht die extrazelluläre Bindung von TSH. Die Signaltransduktion in das Zellinnere und damit die Funktion des Rezeptors wird jedoch von intrazellulären Anteilen des Rezeptormoleküls vermittelt. Die dominierende Signalkaskade führt beim TSH-Rezeptor über den "second messenger" cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP). Auswirkungen der C-terminalen Markerpeptide auf diesen Signalweg wurden mittels TSH-Stimulation in einem Bio-Assay untersucht.

Je $2x10^5$ transient transfizierte Cos-7-Zellen wurden in 35 mm-Kulturschalen in Gegenwart von TSH kultiviert. Untersucht wurde die cAMP-Produktion von Zellen, die mit den modifizierten TSH-Rezeptor-Konstrukten (FLAG-TSHR, HA-TSHR), dem

Wildtyp-TSH-Rezeptor (WT-TSHR) oder dem Vektor pCDL-SR α 296 transfiziert wurden, sowie von untransfizierten Cos-7-Zellen (die zwei letztgenannten als Negativ-Kontrollen). Zur Stimulation der cAMP-Signalkaskade wurden 0 ng/ml (Basalwert), $5x10^2$ ng/ml und $1x10^5$ ng/ml bovines TSH eingesetzt. Nach 6 und 24 Stunden Stimulation wurde die cAMP-Konzentration im Überstand der Zellkulturen radioimmunometrisch bestimmt. Zwar verläuft die Aktivierung der cAMP-Signalkaskade durch TSH und der Anstieg von intrazellulärem cAMP wesentlich schneller (*Chazenbalk et al. 1990*), die langen Stimulationszeiten erlaubten jedoch die Anwendung eines im Vergleich zu anderen Arbeiten wesentlich vereinfachten Assay-Prinzips: es wurde die Konzentration von aus den Zellen diffundiertem cAMP nach Akkumulation im Überstand gemessen. (Daten siehe Anhang, Tabelle A-5).

In Abwesenheit von TSH wurden für alle untersuchten Zellen basale cAMP-Spiegel gemessen. Auf Stimulation mit TSH reagierten alle mit TSH-Rezeptorkonstrukten transfizierten Zellen mit einem deutlichen Anstieg der im Überstand gemessenen cAMP-Konzentration. Für die nicht mit TSH-Rezeptorkonstrukten transfizierten Negativkontrollen wurden auch in Anwesenheit von TSH unverändert nur basale cAMP-Spiegel gemessen.

Die TSH-stimulierte Aktivierung der cAMP-Signalkaskade wurde durch die Cterminalen FLAG- bzw. HA-Peptide am TSH-Rezeptormolekül also nicht erkennbar beeinflusst.

Eine höhere TSH-Konzentration erbrachte keine wesentliche Steigerung der gemessenen cAMP-Werte (siehe Abbildung 5). Eine Verlängerung der Stimulationsperiode auf 24 Stunden ergab vergleichbare Messwerte mit höheren cAMP-Konzentration im Überstand von TSH-Rezeptor-positiven Zellkulturen (siehe Anhang, Tabelle A-5).



cAMP Bioassay mit transfizierten Cos-7-Zellen.

Abbildung 5

cAMP-Produktion der mit den TSH-Rezeptorkontrukten transient transfizierten Cos-7-Zellen nach 6 Stunden Stimulation mit bovinem TSH. Die akkumulierte cAMP-Konzentration im Überstand wurde radioimmunometrisch bestimmt, vergleiche obige Tabelle.

3.2.4 Immunologischer Nachweis und Strukturaufklärung von markierten TSH-Rezeptoren

Die in den TSH-Bindungsstudien und Signaltransduktionsstudien gewonnenen Ergebnisse bestätigten die Annahme, dass die modifizierte TSH-Rezeptor-DNA in eukaryoten Zellen transkribiert und translatiert, das gewonnene Protein prozessiert und zur Hormonbindung und Signaltransduktion befähigt in der Zellmembran der transfizierten Zellen lokalisiert wird. Besonderes Interesse richtete sich nun auf die Frage, ob die Markerpeptide (epitope tags) an den Rezeptormolekülen von den entsprechenden Antikörpern sensitiv und spezifisch erkannt würden. Durch elektrophoretische Auftrennung und nachfolgende Übertragung auf PVDF-Membranen (Western Blot) sollte mit Hilfe dieser Antikörper die Struktur verschiedener Rezeptorformen untersucht werden.

Zum immunologischen Nachweis der markierten TSH-Rezeptor-Konstrukte wurden je $6x10^5$ Cos-7-Zellen pro 10 cm-Kulturschale mittels der DEAE-Dextran-Methode mit je 4 µg Plasmid-DNA (FLAG-TSHR, HA-TSHR, Wildtyp-TSHR, Vektor pCDL-SRα296 ohne Insert) transfiziert. Nach einem Zeitraum von 48 Stunden wurde durch Lyse der Zellen das zelluläre Gesamtprotein gewonnen. Die Proteinlysate wurden mittels SDS-PAGE in einem 8%-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Die Blots wurden mit den entsprechenden Antikörpern (anti-FLAG, anti-HA) inkubiert. Gebundener Antikörper wurde in einer Zweitreaktion mit einem peroxidase-konjugierten IgG_{Fc}-Antikörper markiert. Dessen Lokalisation auf dem Blot wurde mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht und durch Exposition auf Röntgenfilm festgehalten.



Western Blot mit anti-FLAG- (links) und anti-HA-Antikörper (rechts).

Abbildung 6

Ca. 5 μg einer Proteinpräparation von transient transfizierten Cos-7-Zellen wurden in einem 8%-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. FLAG-TSHR, HA-TSHR: modifizierte TSH-Rezeptorkonstrukte; Wildtyp-TSH-Rezeptorkonstrukt; Vektor: pCDL-SRα296 ohne Insert.

Die Detektion spezifischer Antigenbanden erfolgte mit anti-FLAG-Antikörper (Verdünnung 1:1000, linkes Bild) und anti-HA-Antikörper (Verdünnung 1:1000, rechtes Bild). Gebundener Antikörper wurde mit einem peroxidase-konjugierten anti-IgG_{Fc}-Zweitantikörper (Verdünnung 1:4000) markiert, dessen Lokalisation wurde mittels einer Chemilumineszenzreaktion auf Röntgenfilm abgebildet (Belichtungszeit 120 Min.).

TSH-R: glykosyliertes TSH-Rezeptormolekül; Komplex 1 und Komplex 2: hochmolekulare spezifische Signale; unspez.: unspezifisches Signal.

Von beiden Antikörpern (anti-FLAG, anti-HA) wurden spezifische Signale in den korrespondierenden Laufspuren detektiert (ausgefüllte Pfeile). Eine spezifische Bande migrierte auf Höhe von ca. 100 kDa (TSH-R) und entsprach damit gut der Größe des glykosylierten humanen TSH-Rezeptormoleküls (84 kDa Protein + ca. 14 kDa Glykosylierung, *Libert et al. 1989, Nagayama et al. 1989*). Beide Antikörper detektierten zusätzlich höhermolekulare Formen (ca. 220 kDa und >220 kDa, Komplex 1 und Komplex 2).

Die Spezifität der Proteinbanden wurde durch Kontrollen gesichert. So wurden diese Banden weder vom anti-FLAG- noch vom anti-HA-Antikörper in Proteinlysaten von untransfizierten Cos-7-Zellen detektiert, ebenso wenig in Lysaten von Cos-7-Zellen, die den Wildtyp-TSH-Rezeptor ohne Markerpeptid exprimierten. Eine Kreuzreaktivität der Antikörper mit dem jeweils anderen Markerpeptid wurde nicht beobachtet.

Eine unspezifische Bande wurde vom anti-HA-Antikörper bei ca. 66 kDa in allen Laufspuren erkannt (heller Pfeil). Da zur Detektion beider Erstantikörper (anti-FLAG, anti-HA) derselbe Zweitantikörper in identischer Verdünnung verwendet wurde, lässt sich diese Erscheinung nur auf eine unspezifische Bindung eines Erstantikörpers (anti-HA) zurückführen. Der anti-FLAG-Antikörper erwies sich als erfreulich spezifisch, unspezifische Banden wurden nicht detektiert.

3.3 Stabile Expression von FLAG-TSHR und HA-TSHR in Hela-Zellen

Im Hinblick auf weiterführende Untersuchungen wurde entschieden, eine stabile Expression der TSH-Rezeptorkonstrukte in Hela-Zellen (humane Zervix-Karzinom Zellinie) anzustreben. Trotz aufwendiger Selektions- und Screeningprozeduren versprach dieses Vorgehen etliche Vorteile:

- Nahezu beliebige Mengen von Rezeptorprotein sind ständig verfügbar, ohne dass zur Proteingewinnung Zellen stets neu transfiziert werden müssen.
- Einmal erzeugte Klone lassen sich in ihren Eigenschaften genau charakterisieren.
- Durch wiederholte Transfektionen entstehende Schwankungen der Expression des Rezeptorkonstrukts entfallen.
- Hela-Zellen sind, anders als Cos-7-Zellen, menschlichen Ursprungs und entsprechen damit näher der physiologischen Umgebung des TSH-Rezeptors in menschlichen Thyrozyten.
- Eine Hela-Zellinie, die den menschlichen Wildtyp-TSH-Rezeptor exprimiert, war bereits im Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung erzeugt und eingehend untersucht worden. Diese Zellinie wurde als Positivkontrolle eingesetzt (*Willey et al. 1993*).

3.3.1 Transfektion und Selektion stabil transfizierter Hela-Klone

Zur Transfektion der Hela-Zellen wurde ein Verfahren mit Liposomen (LipofectAMINE, Gibco BRL) gewählt. Dieses Verfahren besitzt eine hohe Transfektionseffizienz, was den Aufwand bei der nachfolgenden Selektion stabil transfizierter Klone erleichtern sollte. Jeweils 4x 10^5 Hela-Zellen wurden mit 1 µg Plasmid-DNA (FLAG-TSHR, HA-TSHR) und 100 ng pSV2neo-DNA transfiziert.

Der kotransfizierte Vektor pSV2neo vermittelt den Zellen, die ihn aufnehmen, Resistenz gegen das Antibiotikum Geneticin (G418, Gibco BRL). In Geneticin-haltigem Medium überleben nur diese Zellen. Das Verhältnis von 10:1 zwischen Nutz-DNA (TSH-Rezeptorkonstrukte) und Resistenz-Vektor macht es wahrscheinlich, dass Zellen, die den Resistenzvektor aufgenommen haben, auch die Nutz-DNA aufgenommen haben. Wird der Selektionsdruck aufrechterhalten, entstehen Zellklone, die die transfizierte DNA stabil exprimieren. Ein Teil dieser Klone wird ebenfalls die Nutz-DNA stabil exprimieren. Die transfizierten Kulturen wurden 14 Tage in Selektionsmedium (Kulturmedium + 0,5 mg/ml G418, Gibco BRL) kultiviert. Je 47 Einzelklone (FLAG-TSHR, HA-TSHR) wurden mittels Trypsin-getränkten Filterpapier-Plättchen geerntet, in 10 mm-Kulturschalen transferiert und dort expandiert. Die TSH-Bindung dieser Klone wurde dann mittels eines einfachen Radio-Rezeptorassays an zwei Messpunkten untersucht (10⁵ ng/ml TSH, kein TSH). (Ergebnisse für alle getesteten Klone im Anhang, Tabelle A-6).

Es wurden fünf Klone ausgewählt, die im Screening eine deutliche TSH-Bindung aufwiesen (Differenz der prozentualen Tracerbindung mit versus ohne Kompetitor zwischen 4,5 und 14,4, Positivkontrolle: 6,9; siehe Anhang, Tabelle A-6): FLAG-TSHR-Klone 12 und 30, HA-TSHR-Klone 22, 41 und 44. Diese fünf Klone wurden weiter expandiert, aliquotiert und zur späteren Verwendung in Flüssigstickstoff dauerhaft gelagert. Die Expansion dieser Klone für die nachfolgenden Experimente erfolgte im üblichen Kulturmedium in Anwesenheit von Geneticin (G-418).

3.3.2 TSH-Bindung von stabil transfizierten TSH-Rezeptorkonstrukten

Analog zu den Experimenten mit transient transfizierten Cos-7-Zellen wurden auch mit den stabil transfizierten Hela-Klonen TSH-Bindungsstudien durchgeführt.

Für die Klone FLAG-TSHR 12, 30 und HA-TSHR 41, 44 wurde die Bindungskurve über einen Konzentrationsbereich von 0 bis 10⁵ ng/ml bTSH ermittelt, für HA-TSHR 22 lediglich die Werte für 0 und 10⁵ ng/ml bTSH. Die Hela-Klone wurden expandiert, das Kulturmedium entfernt und die nackten Zellen bei -30°C tiefgefroren. Die Zellmembranen dieser Klone wurden nach Auftauen vom Flaschenboden gelöst und in Puffer aufgenommen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde für alle getesteten Klone eine Zellzahl von ca. 100000 Zellen pro Assay-tube eingestellt.

Als Positivkontrolle wurde eine geeignete Verdünnung von Membranen der stabil den Wildtyp-TSH-Rezeptor exprimierenden Hela-Zellinie eingesetzt. Als Negativkontrolle diente eine geeignete Verdünnung von untransfizierten Hela-Zellmembranen. Die eingesetzten Kontrollen wurden freundlicherweise vom Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung zur Verfügung gestellt (*Willey et al. 1993*). (Daten zur Grafik im Anhang, Tabelle A-7).

Analog zu den transient transfizierten Cos-7-Zellen zeigten die stabil mit den FLAGbzw. HA-TSH-Rezeptor-Konstrukten transfizierten Hela-Klone eine sigmoide TSH-Bindungskurve. Der Verlauf dieser Bindungskurve entsprach dem einer als Positivkontrolle eingesetzten, stabil mit dem Wildtyp-TSH-Rezeptor transfizierte Hela-Zellinie (*Willey et al. 1993*). Untransfizierte Hela-Zellen wiesen keine spezifische TSH-Bindung auf (Negativ-Kontrolle).

TSH-Bindungskurve stabil transfizierter Hela-Klone (FLAG-TSHR), Radio-Rezeptor-Assay.



Abbildung 7

TSH-Bindungskurven der stabil mit FLAG-TSH-Rezeptorkonstrukten transfizierten Hela-Klone (FLAG-TSHR 12 u. FLAG-TSHR 30). Kompetition von unmarkiertem bTSH mit jodmarkiertem TSH (Tracer). Die aufgetragenen Werte entsprechen dem Mittelwert von 3 Messungen, Balken: Standardfehler des Mittelwerts.

TSH-Bindungskurve stabil transfizierter Hela-Klone (HA-TSHR), Radio-Rezeptor-Assay.



Abbildung 8

TSH-Bindungskurven der stabil mit HA-TSH-Rezeptorkonstrukten transfizierten Hela-Klone (HA-TSHR 41 u. HA-TSHR 44). Für HA-TSHR 22 sind die Daten aus dem Screening dargestellt. Kompetition von unmarkiertem bTSH mit jodmarkiertem TSH (Tracer). Die aufgetragenen Werte entsprechen dem Mittelwert von 3 Messungen, Balken: Standardfehler des Mittelwerts.

3.3.3 Signaltransduktion von stabil transfizierten TSH-Rezeptorkonstrukten

Nachdem eine qualitativ offensichtlich unbeeinträchtigte TSH-Bindung an die modifizierten Rezeptorkonstrukte auch für die stabil transfizierten Hela-Klone gezeigt werden konnte, wurde in Analogie zu den Experimenten mit transient transfizierten Cos-7-Zellen die Signaltransduktion über die cAMP-Kaskade untersucht.

5x10⁴ Zellen wurden in 1 cm-Kulturschalen ausplattiert und über Nacht in Normalmedium kultiviert. Am folgenden Tag wurde das Normalmedium durch Stimulationsmedium mit verschiedenen Konzentrationen von bovinem TSH (bTSH) ersetzt und die Zellen weiter kultiviert. Nach 6 und 24 Stunden wurde konditioniertes Medium entnommen und dessen cAMP-Gehalt radioimmunometrisch bestimmt. Als Positivkontrolle kam wiederum die beschriebene, stabil den Wildtyp-TSH-Rezeptor exprimierende Hela-Zellinie zur Verwendung, als Negativkontrolle wurden untransfizierte Hela-Zellen eingesetzt. (Daten zur Grafik im Anhang, Tabellen A-8, A-9).

cAMP-Bioassay mit FLAG-TSH-Rezeptorkonstrukten.



Abbildung 9

cAMP-Produktion von stabil mit FLAG-TSH-Rezeptorkonstrukten transfizierten Hela-Klonen (FLAG-TSHR 12, FLAG-TSHR 30) unter Stimulation mit ansteigenden Konzentrationen bovinen TSHs. Wildtyp-TSHR: stabil mit Wildtyp-TSH-Rezeptorkonstrukt transfizierte Hela-Zellinie (Positivkontrolle); untransf. Hela: untransfizierte Hela-Zellen (Negativkontrolle). Die cAMP-Konzentration im konditionierten Medium wurde 6 (links) bzw. 24 (rechts) Std. nach Zugabe von TSH radioimmunometrisch bestimmt. Die aufgetragenen Werte entsprechen dem Mittelwert von Dreifachbestimmungen, Balken: Standardfehler des Mittelwerts.



cAMP-Bioassay mit HA-TSH-Rezeptorkonstrukten.

Abbildung 10

cAMP-Produktion von stabil mit HA-TSH-Rezeptorkonstrukten transfizierten Hela-Klonen (HA-TSHR 22, HA-TSHR 41, HA-TSHR 44) unter Stimulation mit ansteigenden Konzentrationen bovinen TSHs. Wildtyp-TSHR: stabil mit Wildtyp-TSH-Rezeptorkonstrukt transfizierte Hela-Zellinie (Positivkontrolle); untransf. Hela: untransfizierte Hela-Zellen (Negativkontrolle). Die cAMP-Konzentration im konditionierten Medium wurde 6 (links) bzw. 24 Std. (rechts) nach Zugabe von TSH radioimmunometrisch bestimmt. Die aufgetragenen Werte entsprechen dem Mittelwert von Dreifachbestimmungen, Balken: Standardfehler des Mittelwerts.

Auf Stimulation mit TSH reagierten alle TSH-Rezeptorkonstrukte exprimierenden Zellen mit einem deutlichen Anstieg des second messenger cAMP. Dieser Anstieg war bereits bei einer TSH-Konzentration von 1 ng TSH/ml unterscheidbar. Bei Konzentrationen von $10^4 - 10^5$ ng/ml TSH scheint der Anstieg der cAMP-Produktion abzuflachen, höhere Konzentrationen von TSH erschienen zur Stimulation nicht sinnvoll. Die nach 6 Stunden Stimulation gewonnenen Erkenntnisse waren in jeder Hinsicht mit denen nach 24-stündiger Stimulation vergleichbar, zusätzliche Aspekte nach verlängerter Stimulation ergaben sich nicht.

Wiederum wurden für alle untersuchten Zellen basale cAMP-Spiegel nach Kultivierung in TSH-freiem Medium gemessen. Die basale cAMP-Produktion der mit TSH-Rezeptorkonstrukten transfizierten Zellen (FLAG-TSHR 12, 30; HA-TSHR 22, 41, 44; Wildtyp-TSHR) in Abwesenheit von TSH lag in diesem Experiment erkennbar über der von untransfizierten Hela-Zellen.

Basale cAMP-Produktion von stabil mit TSH-Rezeptorkonstrukten transfizierten Hela-Zellen.



cAMP Basalwerte ohne TSH

Abbildung 11

Vergrößerte Darstellung der basalen cAMP-Produktion von stabil TSH-Rezeptorkonstrukte exprimierenden Hela-Zellklonen über 6 Stunden Kultivierung in TSH-freiem Medium (FLAG-TSHR 12 u. 30, HA-TSHR 22, 41 u. 44). Wildtyp-TSHR: stabil mit Wildtyp-TSH-Rezeptorkonstrukt transfizierte Hela-Zellinie (Positivkontrolle); untransf. Hela: untransfizierte Hela-Zellen (Negativkontrolle). Die cAMP-Konzentration wurde radioimmunometrisch bestimmt. Die aufgetragenen Werte entsprechen dem Mittelwert von Dreifachbestimmungen, Balken: Standardfehler des Mittelwerts.

Die für die mit modifizierten TSH-Rezeptorkonstrukten transfizierten Hela-Klone ermittelten cAMP-Werte zeigten quantitativ und qualitativ eine gute Übereinstimmung mit denen der den Wildtyp-TSH-Rezeptor exprimierenden Hela-Zellinie.

3.3.4 Immunologischer Nachweis und Strukturaufklärung von stabil transfizierten, markierten TSH-Rezeptoren

3.3.4.1 Western Blot Detektion von FLAG-/HA-TSHR-Protein in Hela-Zell-Lysaten

Aus den stabil sowohl die markierten als auch einen Wildtyp-TSH-Rezeptor exprimierenden Hela-Zellinien konnte beständig Protein in ausreichend großer Menge gewonnen werden, um die mit Proteinlysaten aus transient transfizierten Cos-7-Zellen begonnenen proteinbiochemischen Studien fortzusetzen. Zunächst wurde versucht, die Expressionsprodukte der FLAG- bzw. HA-TSHR-cDNA wiederum mittels Western-Blot-Technik darzustellen.

Dazu wurden die stabil transfizierten Hela-TSHR-Zellinien in Kulturflaschen zu ca. 80% Konfluenz kultiviert und anschließend lysiert. Gesamtprotein-Lysate der untersuchten Klone wurden mittels SDS-Polyacrylamid Gelektrophorese aufgetrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Die Bindung der Epitop-spezifischen Antikörper (anti-FLAG und anti-HA) an Zielantigene auf der Blotmembran wurde wiederum durch Markierung mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-IgG_{Fc}-Zweitantikörper und nachfolgender Chemilumineszenz-Detektion sichtbar gemacht.

Die Western-Blots wurden mit unbehandelten, d.h. nicht weiter aufgereinigten, konzentrierten oder anderweitig prozessierten Proteinlysaten durchgeführt. Auf 8-12% ige PAGE-Gele wurden Lysate mit zwischen 5 und 20 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Die zur Detektion verwendeten FLAG- bzw. HA-Antikörper wurden in Verdünnungen von 1:1000 bis 1:4000, der Zweitantikörper meist in einer Verdünnung von 1:4000 eingesetzt.

Bei der Western Blot Analyse mit dem anti-FLAG-Antikörper stellten sich bei beiden FLAG-TSHR Klonen (FLAG-TSHR 12, FLAG-TSHR 30) zwei spezifische Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 95 bzw. ca. 120 kDa dar (Abbildung 12, ausgefüllte Pfeile). Diese Banden konnten in Proteinlysaten von Hela-Klonen mit den HA-markierten TSH-Rezeptorkonstrukten, mit Wildtyp-Rezeptor und ohne Rezeptor nicht nachgewiesen werden. Die Banden entsprechen Glykosylierungsvarianten des TSH-Rezeptormoleküls (siehe unten, siehe Diskussion).



Western Blot mit anti-FLAG-Antikörper.

Abbildung 12

Ca. 6 μ g Protein aus stabil mit TSH-Rezeptorkonstrukten tranfizierten Hela-Zellinien wurden in einem 8%-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. FLAG-TSHR, HA-TSHR: modifizierte TSH-Rezeptorkonstrukte; Wildtyp-TSH-Rezeptorkonstrukt; untranfizierte Hela-Zellen. Die Detektion spezifischer Antigenbanden erfolgte mit anti-FLAG-Antikörper (Verdünnung 1:2000). Gebundener Antikörper wurde mit einem peroxidase-konjugierten anti-IgG_{Fc}-Zweitantikörper (Verdünnung 1:4000) markiert dessen Lokalisation wurde mittels einer

Zweitantikörper (Verdünnung 1:4000) markiert, dessen Lokalisation wurde mittels einer Chemilumineszenzreaktion auf Röntgenfilm abgebildet (Belichtungszeit 15 Min.). TSH-R: TSH-Rezeptor, Glykosylierungsvarianten; unspez.: unspezifisches Signal.

Gelegentlich traten unspezifische Banden in allen Laufspuren auf (heller Pfeil), deren Intensität jedoch stets weit geringer als die der spezifischen Banden war.

Auch mit dem polyklonalen anti-HA-Serum konnte in Proteinlysaten von Hela-Klonen, die den HA-markierten TSH-Rezeptor exprimierten, eine spezifische Doppelbande bei ca. 95 kDa bzw. 120 kDa nachgewiesen werden (ausgefüllte Pfeile, Abbildung 13).

Bei ca. 66 kDa stellte sich, wie bei den Versuchen mit Proteinlysaten aus transient transfizierten Cos-7-Zellen, mit dem anti-HA-Antikörper eine unspezifische, in allen Laufspuren nachweisbare Bande dar (helle Pfeile).

Im direkten Vergleich zeigte der anti-FLAG-Antikörper deutliche Vorteile bei der Verwendung im Western Blot. Unter sonst identischen Versuchsbedingungen traten in Experimenten mit dem anti-HA-Antikörper eine schwächere spezifische Signalintensität, eine höhere Anzahl unspezifischer Signale und ein ungünstigeres Signal/Hintergrund-Verhältnis auf. Die folgenden Untersuchungen wurden deshalb größtenteils mit den FLAG-TSH-Rezeptorkonstrukten und dem entsprechenden anti-FLAG-Antikörper durchgeführt.



Western Blot mit anti-HA-Antikörper.

Abbildung 13

Linkes Bild - Nachweis von HA-TSHR-Rezeptorkonstrukten. Ca. 10 µg Protein aus stabil mit TSH-Rezeptorkonstrukten tranfizierten Hela-Zellinien wurden in einem 8%-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. HA-TSHR: modifizierte TSH-Rezeptorkonstrukte; Wildtyp-TSH-Rezeptorkonstrukt; Proteinlysat aus untranfizierten Hela-Zellen. Die Detektion spezifischer Antigenbanden erfolgte mit anti-HA-Antikörper (Verdünnung 1:1000). Gebundener Antikörper wurde mit einem peroxidase-konjugierten anti-IgG_{Fc}-Zweitantikörper (Verdünnung 1:4000) markiert, dessen Lokalisation wurde mittels einer Chemilumineszenzreaktion auf Röntgenfilm abgebildet (Belichtungszeit 5 Sek.).

Rechtes Bild - Ausschluss einer Kreuzreaktivität des anti-HA-Antikörpers mit FLAG-TSH-Rezeptorkonstrukten. Ca. 20 µg Protein aus stabil mit TSH-Rezeptorkonstrukten tranfizierten Hela-Zellinien wurden in einem 8%-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. FLAG-TSHR: modifizierte TSH-Rezeptorkonstrukte; Wildtyp-TSH-Rezeptorkonstrukt; untransfizierte Hela-Zellen. Die Detektion spezifischer Antigenbanden erfolgte mit anti-HA-Antikörper (Verdünnung 1:4000). Gebundener Antikörper wurde mit einem peroxidase-konjugierten anti-IgG_{Fc}-Zweitantikörper (Verdünnung 1:4000) markiert, dessen Lokalisation wurde mittels einer Chemilumineszenzreaktion auf Röntgenfilm abgebildet (Belichtungszeit 30 Sek.).

3.3.4.2 Einfluss unterschiedlicher Denaturierungsverfahren auf die Darstellung des TSH-Rezeptorproteins im Western Blot

Hochmolekulare Membranproteine zeigen bei der Auftrennung mittels herkömmlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese häufig ein unerwünschtes Verhalten: sie neigen zur Aggregation und mangelhaftem Einlaufen in das Elektrophorese-Gel (*Guellaen et al. 1984*). Über ein solches Verhalten wurde bei SDS-PAGE-Experimenten mit TSH-Rezeptor-Präparationen bereits berichtet (*Akamizu et al. 1990, Ban et al. 1992*).

Die SDS-PAGE mit Proteinlysaten sowohl aus transient mit den TSH-Rezeptorkonstrukten transfizierten Cos-7-Zellen als auch aus stabil transfizierten Hela-Klonen verlief auch in der vorgelegten Arbeit bei Anwendung eines Standardverfahrens zunächst unbefriedigend. Zwar konnten aus den jeweils zum verwendeten Antikörper passenden Laufspuren durchaus Signale gewonnen werden, die durch eine spezifische Antikörperbindung erklärt werden konnten, doch verteilte sich diese Signal-Aktivität zunächst weitgehend diffus über einen weiten Bereich hochmolekularer Proteine. Vereinzelt konnten Banden-ähnliche Orte höherer Signaldichte beobachtet werden, allerdings lagen diese Orte weit oberhalb des erwarteten Größenbereichs für die markierten TSH-Rezeptormoleküle.

Daraufhin vorgenommene Modifikationen der Versuchsbedingungen führten schließlich zur Darstellung scharf begrenzter, spezifischer Banden. Hervorragenden Einfluss auf das Ergebnis der Western-Blot Untersuchung übte die Temperatur aus, die zur Denaturierung der Proben in Anwesenheit von β-Mercaptoethanol und SDS vor Auftrennung im Gel angewandt wurde. Wurden die Proben, wie in allen Standard-Protokollen vorgesehen, kochend denaturiert (95 - 100°C), kam es zum beschriebenen Verlust einer scharf begrenzten Darstellung der TSH-Rezeptor-Banden. Nur durch Anwendung niedrigerer Temperaturen konnte ein deutliches Signal erhalten werden. Eine Denaturierung bei Raumtemperatur (RT) über einen Zeitraum von 30 Minuten (*Ban et al. 1992*) erwies sich als brauchbar (Abbildung 14).

Auswirkung verschiedener Denaturierungs-Protokolle auf das Blot-Ergebnis.



Abbildung 14

Ca. 6 µg Protein aus stabil mit TSH-Rezeptorkonstrukten tranfizierten Hela-Zellinien wurden in einem 8%-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. In Spur 1 (FLAG-TSHR - 97°C) wurde die Probe vor dem Auftrag auf das Polyacrylamidgel 5 Min. bei 97°C in SDS-PAGE-Ladepuffer denaturiert. In Spur 2 (FLAG-TSHR - RT) wurde, ebenso wie in Spur 3 und 4, im gleichen Agens 30 Minuten bei Raumtemperatur denaturiert. Die Detektion spezifischer Antigenbanden erfolgte mit anti-FLAG-Antikörper (Verdünnung 1:2000). Gebundener Antikörper wurde mit einem peroxidase-konjugierten anti-IgG_{Fc}-Zweitantikörper (Verdünnung 1:4000) markiert, dessen Lokalisation wurde mittels einer Chemilumineszenzreaktion auf Röntgenfilm abgebildet (Belichtungszeit 10 Min.).

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss von reduzierendem ß-Mercaptoethanol bei der Denaturierung von TSH-Rezeptorprotein auf dessen Laufverhalten in der SDS-PAGE untersucht. Dieses Agens reduziert und bricht damit Disulfid-Brückenbindungen zwischen Cysteinresten der aufgetrennten Proteine.

Die ausgedehnte extrazelluläre Domäne und auch extrazelluläre Anteile der Transmembrandomäne des TSH-Rezeptors sind reich an Cysteinen, die zur Bildung von Disulfid-Brücken befähigt sind. Es wurde gezeigt, dass diese Cysteine für die Hormonbindung und auch die Signaltransduktion eine herausragende Bedeutung besitzen (*Kosugi et al. 1992*). Sie scheinen einen wichtigen Beitrag für die korrekte dreidimensionalen Faltung des Rezeptors zu leisten.

Bei einer angenommenen proteolytischen Spaltung des TSH-Rezeptormoleküls in eine α und eine β -Untereinheit, wie sie von vielen Autoren postuliert wird (siehe Diskussion), käme Disulfidbrücken die Aufgabe zu, die beiden Untereinheiten zu einem funktionellen Holorezeptor zu verbinden. Durch Denaturierung unter reduzierenden Bedingungen sollten diese Untereinheiten dann dissoziiert nachweisbar sein.

Da die dem TSH sehr ähnlichen Glykoproteinhormone FSH und LH/CG eine Thioredoxin-artige Aktivität besitzen (*Boniface et al. 1990*) und somit zur Lösung von

Disulfidbrücken in der Lage sind, ist es denkbar, dass die Bindung von TSH an den TSH-Rezeptor über das Lösen und möglicherweise Neuknüpfen von Disulfid-Brückenbindungen Änderungen der TSH-Rezeptorstruktur vermitteln kann.

Deshalb wurde zusätzlich zur Wirkung von β -Mercaptoethanol untersucht, ob die Kultivierung der TSHR-Hela-Klone über 12 Stunden in Anwesenheit von 1×10^5 ng/ml TSH vor der Proteingewinnung das Laufverhalten der Rezeptorkonstrukte in der SDS-PAGE beeinflusst.

Elektrophorese reduzierter vs. nicht-reduzierter TSH-Rezeptoren. Einfluss der TSH-Bindung auf die Rezeptorkonformation.



Abbildung 15

Ca. 5 µg Protein aus stabil mit TSH-Rezeptorkonstrukten tranfizierten Hela-Zellinien wurden in einem 8%-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Spur 1 - FLAG-TSHR 30, denaturiert unter reduzierenden Bedingungen mit 1% ß-Mercaptoethanol; Spur 2 - dto. unter nicht-reduzierenden Bedingungen ohne ß-Mercaptoethanol; Spur 3 - FLAG-TSHR 30, vor Proteinpräparation kultiviert in Anwesenheit von 10⁵ ng/ml TSH, denaturiert ohne ß-Mercaptoethanol; Spur 4 - dto. mit 1% ß-Mercaptoethanol. Alle Proben wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur denaturiert.

Die Detektion spezifischer Antigenbanden erfolgte mit anti-FLAG-Antikörper (Verdünnung 1:2000). Gebundener Antikörper wurde mit einem peroxidase-konjugierten anti-IgG_{Fc}-Zweitantikörper (Verdünnung 1:4000) markiert, dessen Lokalisation wurde mittels einer Chemilumineszenzreaktion auf Röntgenfilm abgebildet (Belichtungszeit 5 Min.).

Wie gezeigt, blieben die genannten Maßnahmen ohne wesentlichen Einfluss auf das Laufverhalten der Rezeptorkonstrukte in der SDS-PAGE. Die Kultivierung in Anwesenheit von TSH vor Proteingewinnung führte nicht zum Auftreten neuer Banden.

In Abwesenheit von reduzierendem β -Mercaptoethanol bei der Probendenaturierung verlor die Auftrennung der beiden nachgewiesenen Expressionsprodukte an Trennschärfe. insgesamt erschien die Laufgeschwindigkeit der Rezeptorkonstrukte in der SDS-PAGE geringfügig beschleunigt, wie es für kleinere Moleküle üblich ist. Ein solches Verhalten ist für nicht-reduzierte Makromoleküle bekannt, da sich durch bestehende

intramolekulare Disulfidbrücken der effektive Radius dieser Moleküle in des SDS-PAGE tatsächlich verkleinert.

Andere Autoren konnten zeigen, dass über die dargestellten Ergebnisse hinaus weder die Variation der SDS-Konzentration von 1-10% noch die Zugabe von Triton X-100 bei der Denaturierung mit SDS-Ladepuffer das Laufverhalten von TSH-Rezeptorproteinen veränderten (*Ban et al. 1992*).

3.3.4.3 Immunpräzipitation von markierten TSH-Rezeptorproteinen mit anti-FLAG- und anti-HA-Antikörper

Zur Anreicherung der TSH-Rezeptorkonstrukte und zur Reinigung von anderen zellulären Proteinen wurde eine Immunpräzipitation der Proteinlysate mit FLAG- und HA-Antikörper durchgeführt.

500 μ l Proteinlysat (Proteingehalt ca. 0,5-1 mg Gesamtprotein) wurden dazu mit 10 μ l (ca. 1 μ g) der jeweiligen Antikörperlösung inkubiert. Die entstehenden Antigen-Antikörper-Komplexe wurden mit Protein-A-Sepharose gebunden, mittels Zentrifugation pelletiert und der Überstand mit den verbleibenden verunreinigenden Proteinen dekantiert.

Zur Analyse im Western Blot wurden die Immunpräzipitate in SDS-Ladepuffer denaturiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet.

Bei der Immunpräzipitation und nachfolgenden Western-Blot-Detektion mit anti-FLAG-Antikörper gelangten wiederum die bereits beschriebenen spezifischen TSH-Rezeptor-Banden bei 95 kDa und 120 kDa zur Darstellung (Abbildung 16, ausgefüllte Pfeile).





Abbildung 16

Mit anti-FLAG-Antikörper immunpräzipitiertes FLAG-TSHR-Proteinlysat wurde und bei verschiedenen Temperaturen (RT = Raumtemperatur) in SDS-PAGE-Ladepuffer denaturiert, in einem 8% Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet.

F - Immunpräzipitat von FLAG-TSHR 30 Proteinlysat; He - Immunpräzipitat eines Proteinlysats von untransfizierten Hela-Zellen als Negativkontrolle.

Die Detektion spezifischer Antigenbanden erfolgte mit anti-FLAG-Antikörper (Verdünnung 1:2000). Gebundener Antikörper wurde mit einem peroxidase-konjugierten anti-IgG_{Fc}-Zweitantikörper (Verdünnung 1:4000) markiert, dessen Lokalisation wurde mittels einer Chemilumineszenzreaktion auf Röntgenfilm abgebildet (Belichtungszeit 30 Min.). Erklärung der Banden im Text.

Zusätzlich zu diesen bereits in den vorhergehenden Experimenten nachgewiesenen TSH-Rezeptor-Banden zeigten sich spezifische Signale in Bereich hoher Molekulargewichte (Komplex 1 und Komplex 2, ca. 200 kDa und >220 kDa). Signale in diesem Größenbereich waren schon in Western Blots mit Cos-7-Protein aufgefallen, es könnte sich dabei um komplex glykosylierte, hochmolekulare Rezeptor-Vorstufen oder um Komplexe aus mehreren einzelnen Rezeptorproteinen handeln, die durch herkömmliche Denaturierung nicht separiert werden können.

Eine spezifische Bande stellte sich bei ca. 40 kDa dar. Es ist interessant zu spekulieren, ob es sich bei diesem Produkt um eine durch proteolytische Spaltung hervorgegangene Rezeptor-Untereinheit handelt, wie sie von manchen Autoren im Rahmen der post-translationellen Prozessierung des Rezeptormoleküls postuliert wird (z.B. *Couet et al. 1996a*, siehe Diskussion).

Als problematisch bei der Western Blot-Analyse von Immunpräzipitaten erwies sich das Auftreten einer Vielzahl unspezifischer Banden in der Negativkontrolle (Immunpräzipitation von Protein aus untransfizierten Hela-Zellen), wenn die in den vorhergehenden Experimenten mit guter Erfahrung eingesetzte schonende Denaturierung des Probenmaterials (30 Minuten bei Raumtemperatur) verwendet wurde (graue Pfeile). Unglücklicherweise ko-migrierten diese unspezifischen Banden teilweise mit den spezifischen TSH-Rezeptor-Banden, so dass eine sichere Identifizierung spezifischer Signale unmöglich wurde. Durch wirksamere Denaturierung bei höheren Temperaturen konnten diese Banden auf eine Einzelbande bei ca. 50 kDa reduziert werden (grauer Pfeil unten), die der erwarteten Größe einer Immunglobulin-Schwerkette entsprach (53 kDa, siehe *Darnell et al. 1990*). Als Verursacher dieser Signale kommt das zur Präzipitation eingesetzte anti-FLAG-Immunglobulin in Frage, welches nach Denaturierung der Probe gemeinsam mit dem immunpräzipitierten Rezeptorprotein ebenfalls der Elektrophorese und dem anschließenden Western Blot unterworfen wird. Der für die Chemilumineszenz-Nachweisreaktion verwendete Zweitantikörper detektiert auf der Blotmembran dann außer dem spezifisch gebundenen anti-FLAG-Erstantikörper zusätzlich das auf dem Blot vorhandene anti-FLAG-Immunglobulin aus der Präzipitation. Vermeidbar wäre dieses Verhalten nur, wenn z.B. zur Detektion des FLAG-Antigens auf dem Blot ein Meerettich-Peroxidase-gekoppelter anti-FLAG-Erstantikörper verwendet würde, so dass auf den problematischen Zweitantikörper verzichtet werden könnte.

Eine mit anti-HA-Antikörper und HA-TSH-Rezeptor durchgeführte Immunpräzipitation erbrachte im Vergleich zum anti-FLAG-Antikörper wie schon im Western Blot unterlegene Ergebnisse. Neben den TSH-Rezeptorbanden bei 95 kDa und 120 kDa (Abbildung 17, ausgefüllte Pfeile) kamen unspezifische Banden zur Darstellung, die dem in der Immunpräzipitation verwandten Antikörper entsprechen. Im Vergleich zum entsprechenden Experiment mit dem FLAG-markierten TSH-Rezeptor ergibt sich ein ungünstigeres Signal-Hintergrund-Verhältnis: eine große Menge anti-HA-Antikörper (unspezifische Banden) präzipitiert und detektiert nur eine geringe Menge HA-TSH-Rezeptor.

Auch mit dem anti-HA-Antikörper konnte im Immunpräzipitat eine schwach ausgeprägte, jedoch spezifische Bande bei ca. 40 kDa dargestellt werden. Der unabhängige Nachweis einer solchen Bande sowohl mit der FLAG- als auch mit der HA-Markierung kann die Vermutung stützen, dass es sich bei dieser Rezeptorform um den C-terminalen Anteil eines Rezeptor-Spaltprodukts handelt (s. oben, s. Diskussion).



Immunpräzipitation von HA-TSHR mit anti-HA-Antikörper.

Abbildung 17

Mit anti-HĀ-Antikörper präzipitiertes Proteinlysat aus HA-TSHR 22 wurde 5 Min. bei 65°C in SDS-PAGE-Ladepuffer denaturiert, in einem 8% Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. von links nach rechts: Spur 1 - mit anti-HA immunpräzipitiertes HA-TSHR 22 Proteinlysat; Spur 2 - mit anti-HA immunpräzipitiertes Wildtyp-TSHR Proteinlysat; Spur 3 und 4 - unbehandeltes Proteinlysat von HA-TSHR 22 und Wildtyp-TSHR (nicht immunpräzipitiert). Die Detektion spezifischer Antigenbanden erfolgte mit anti-HA-Antikörper (Verdünnung 1:2000). Gebundener Antikörper wurde mit einem peroxidase-konjugierten anti-IgG_{Fc}-Zweitantikörper (Verdünnung 1:4000) markiert, dessen Lokalisation wurde mittels einer Chemilumineszenzreaktion auf Röntgenfilm abgebildet (Belichtungszeit 1 Min.).

Hochmolekulare Rezeptorformen wie im entsprechenden Experiment mit dem FLAG-TSH-Rezeptor (s. oben) kamen in diesem Experiment auch langer Expositionszeit (Überbelichtung) des Blots nicht zustande.

Sehr wahrscheinlich ließen sich die mit dem anti-HA-Antikörper und HA-TSH-Rezeptor erzielten Ergebnisse durch Optimierung der Versuchsbedingungen noch verbessern, da für die Annahme einer prinzipiellen Unterlegenheit des HA-Markersystems kein Anlas besteht. Das folgende, aufwendige Experiment zur Untersuchung der Glykosylierung der immunpräzipitierten TSH-Rezeptormoleküle wurde jedoch zur Vereinfachung nur mit den FLAG-TSH-Rezeptorkonstrukten durchgeführt.

3.3.4.4 Deglykosylierung des TSH-Rezeptorproteins

Das Molekulargewicht der nativen, nicht posttranslationell prozessierten TSH-Rezeptor-Proteinkette ließ sich nach Kenntnis der Primärstruktur (Aminosäuresequenz) als ca. 84 kDa berechnen (*Libert et al. 1989*). Durch posttranslationelle Glykosylierung an sechs potentiellen N-Glykosylierungsstellen erhöht sich das Molekulargewicht der membranständigen Rezeptoren. Der TSH-Rezeptor liegt in eukaryoten Zellen in verschiedenen Glykosylierungsformen vor (siehe Diskussion). Um herauszufinden, welche der in dieser Arbeit detektierten TSH-Rezeptorbanden glykosylierten Molekülen Glykosylierungsvarianten nachzuweisen sind entsprechen, ob und um das Molekulargewicht der verschiedenen Expressionsprodukte der FLAG/HA-TSH-Rezeptor-cDNA ohne Glycanreste zu ermitteln, wurden immunpräzipitierte FLAG-TSH-Rezeptormoleküle mit N-Glyksosidase F deglykosyliert. Dieses Enzym aus Flavobacterium meningosepticum spaltet Asparagin-gebundene N-Glycanketten von der Proteinkette ab.

500 µl FLAG-TSHR 30-Proteinlysat wurden mit 10 µl Anti-FLAG-Antikörper (1 µg IgG) und Protein A-Sepharose präzipitiert. Das Präzipitat wurde in 20 µl Proteinlysepuffer in Anwesenheit von 1% SDS und 1% β-Mercaptoethanol 5 Minuten bei 65°C denaturiert und mit 200 µl Proteinlysepuffer auf 220 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. 100 µl dieser Lösung wurden mit 5 µl (entspr. 1 U) N-Glycosidase F (Boehringer Mannheim, Kat. Nr. 1365 177), weitere 100 µl mit Aqua dest. versetzt und bei 37°C inkubiert. Die verbleibenden 20 µl wurden als nicht-deglykosylierte Probe aufbewahrt. Nach 4, 6, 8 und 12 Stunden Inkubation wurden je 20 µl aus der Inkubation entnommen. Alle Proben wurden anschließend im Western Blot untersucht.

Die Deglykosylierung des TSH-Rezeptormoleküls führte zur Reduktion der beiden 95 und 120 kDa-Banden auf eine einzelne Bande im Bereich der erwarteten Größe des TSH-Rezeptor-Proteinkerns von ca. 84 kDa (Abbildung 18, schwarz ausgefüllte Pfeile). Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung, dass es sich bei den beiden erstgenannten Banden um Glykosylierungsvarianten nur eines einzigen Expressionsprodukts der eingesetzten TSH-Rezeptor-cDNA handelt.



Deglykosylierung von immunpräzipitiertem FLAG-TSH-Rezeptor.

Abbildung 18

500 µl FLAG-TSHR Proteinlysat (1-1,5 mg Gesamtprotein) wurden mit 10 µl anti-FLAG-Antikörper (1 µg IgG) und Protein A-Sepharose präzipitiert. Die Präzipitate wurden in Anwesenheit von 1% SDS und 1% ß-Mercaptoethanol 5 Minuten bei 65°C denaturiert. Die denaturierten Proteine wurden in 200 µl Proteinlysepuffer aufgenommen. 100 µl dieses Ansatzes wurden mit 5 µl N-Glycosidase (Boehringer, 1 Unit) versetzt (Deglykosylierung, +), 100 µl nur mit 5 µl Wasser (Kontrolle, -). Die restlichen 20 µl wurden als nicht-deglykosylierter Ansatz ("0") aufbewahrt.

Deglykosylierungsansatz und Kontrolle wurden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach 4, 6, 8 und 12 Stunden wurden jeweils 20 µl-Proben entnommen. Alle Proben wurden nochmals mit SDS-PAGE-Ladepuffer denaturiert und elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Detektion spezifischer Antigenbanden erfolgte mit anti-FLAG-Antikörper (Verdünnung 1:2000). Gebundener Antikörper wurde mit einem peroxidase-konjugierten anti-Ig G_{Fc} -Zweitantikörper (Verdünnung 1:4000) markiert, dessen Lokalisation wurde mittels einer Chemilumineszenzreaktion auf Röntgenfilm abgebildet (Belichtungszeit 45 Sek.).

Die spezifischen Signale ober- und unterhalb des Molekulargewichtsbereichs des TSH-Rezeptorproteins zeigten nach Deglykosylierung ein interessantes Verhalten:

Die hochmolekularen TSH-Rezeptorbanden "Komplex 1" und "Komplex 2" kamen nach Deglykosylierung ebenfalls mit reduzierter Molekülgröße zur Darstellung, es scheinen also auch in diesen Formen N-glykosidische Molekülanteile vorzuliegen. Die Größe der verbliebenen Proteinanteile ist durch die Anwesenheit nur einer einzelnen TSH-Rezeptor-Proteinkette nicht erklärlich, es handelt sich bei diesen Formen also scheinbar nicht um komplex glykosylierte Einzelmoleküle einer Rezeptorvorstufe. Vereinbar erscheint das Ergebnis der Deglykosylierung mit der Annahme von Komplexen aus mehreren glykosylierten TSH-Rezeptormolekülen oder deren Vorstufen, die durch das eingesetzte Denaturierungsverfahren nicht in Einzelmoleküle separiert wurden.

Ebenfalls zur Darstellung gelangte erneut ein spezifisches Signal bei ca. 40 kDa (so benannter heller Pfeil). Diese Bande erscheint auch in deglykosyliertem Probenmaterial in unveränderter Lokalisation, so dass es sich um ein nicht-glykosyliertes Molekül handelt. Diese Eigenschaft ist vereinbar mit einem C-terminalen Spaltprodukt des TSH-Rezeptormoleküls, bei dem die extrazelluläre Domäne mit allen im Molekül vorkommenden N-Glykosylierungsstellen fehlt. Die bereits bei der Immunpräzipitation nachgewiesene Schwerkette des zur Immunpräzipitation eingesetzten Immunglobulins (anti-FLAG-Antikörper, grau ausgefüllte Pfeile) ist ebenfalls ein glykosyliertes Protein, sie gelangt nach Deglykosylierung mit verringertem Molekulargewicht zur Darstellung.

3.4 Kotransfektion von FLAG- und HA-TSHR in Cos-7-Zellen

Während die 95 kDa- und 120 kDa-Expressionsprodukte der TSH-Rezeptor-cDNA durch Unterschiede bei der posttranslationellen Glykosylierung eines einzelnen TSH-Rezeptorproteins erklärt werden konnten, legten die vorhergehenden Versuche die Annahme nahe, dass die nach Immunpräzipitation im hochmolekularen Bereich des SDS-PAGE-Gels detektierten Banden nicht auf diese Weise zustande gekommen sein konnten: durch Deglykosylierung ließen sie sich nicht auf eine dem Molekulargewicht der unglykosylierten TSH-Rezeptor-Proteinkette (ca. 84 kDa) entsprechende Bande zurückführen.

Aufgrund des hohen Molekulargewichts schien es denkbar, dass es sich bei diesen Formen um Komplexe aus einem TSH-Rezeptormolekül und anderen Proteinbestandteilen oder aber um Komplexe aus mehreren, z.B. zwei und drei, TSH-Rezeptormolekülen handelt, die aus unbekannten Gründen einer Separation durch Denaturierung und Reduktion von Disulfidbrücken trotzten.

Um diese Annahme zu untersuchen wurde cDNA beider modifizierter TSH-Rezeptoren (FLAG-TSHR, HA-TSHR) in Cos-7-Zellen gleichzeitig transient transfiziert, so dass bei der gleichzeitigen Expression von FLAG- und HA-TSH-Rezeptoren in einer Zelle eventuell Komplexe aus TSH-Rezeptoren mit den beiden verschiedenen Markerpeptiden entstehen konnten. Es sollte dann möglich sein, die gebildeten heteropolymeren Komplexe mit dem Antikörper einer Spezifität (z.B. anti-FLAG) zu präzipitieren und im Präzipitat Antigene der jeweils anderen Spezifität (z.B. anti-HA) nachzuweisen (Prinzip der Kopräzipitation, z.B. bei *Ransone 1995*).

Die Cos-7-Zellen wurden dazu mit einer festen Menge $(4 \mu g)$ der einen und variablen Mengen (400 ng, 2 μg , 4 μg und 8 μg) der jeweils anderen cDNA transfiziert, um den Einfluss unterschiedlicher Mengenverhältnisse der beiden Expressionsprodukte untersuchen zu können.

Aus den transfizierten Zellen wurde nach 48 Stunden Kultur Protein gewonnen. Das Proteinlysat (150 μ g Gesamtprotein) wurde mit dem Antikörper immunpräzipitiert, der dem in fixer Konzentration transfizierten Markerpeptid entsprach (FLAG:HA 1:0,1, 1:0,5, 1:1 und 1:2 mit anti-FLAG-Antikörper; HA:FLAG 1:0,1, 1:0,5, 1:1 und 1:2 mit anti-HA-Antikörper). Die präzipitierten Protein A-Sepharose-Antikörper-Antigen-komplexe wurden in 100 μ l Puffer aufgenommen, von dieser Menge wurden 32 μ l mittels SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet.



Kotransfektion von FLAG- und HA-TSHR in Cos-7-Zellen (1).

Abbildung 19

FLAG- und HA-TSHR-cDNA wurde in verschiedenen Gewichtsverhältnissen mittels DEAE-Dextran-Methode in Cos-7-Zellen kotransfiziert und koexprimiert. Proteinlysate dieser Zellen wurden mit anti-FLAG-Antikörper präzipitiert, auf 8%-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf PVDF-Membran geblottet.

von links nach rechts: FLAG - Proteinlysat von ausschließlich mit FLAG-TSHR-cDNA transfizierten Cos-7-Zellen; F:H - Proteinlysat von im angegebenen Verhältnis mit FLAG- und HA-TSHR-cDNA kotransfizierten Cos-7-Zellen; HA - Proteinlysat von ausschließlich mit HA-TSHR-cDNA transfizierten Cos-7-Zellen. Alle diese Lysate wurden mit anti-FLAG-Antikörper immunpräzipitiert. rechte Spur - anti-HA-Immunpräzipitat von ausschließlich mit HA-TSHR-cDNA transfizierten Cos-7-Zellen.

Die Detektion von Antigenbanden erfolgte mit anti-HA-Antikörper (Verdünnung 1:1000). Gebundener Antikörper wurde mit einem peroxidase-konjugierten anti-IgG_{Fc}-Zweitantikörper (Verdünnung 1:4000) markiert, dessen Lokalisation wurde mittels einer Chemilumineszenzreaktion auf Röntgenfilm abgebildet (Belichtungszeit 15 Sek.).

Bei Immunpräzipitation mit dem anti-FLAG-Antikörper und nachfolgender Detektion HA-spezifischer Banden im Präzipitat gelangten tatsächlich beide hochmolekularen Banden zur Darstellung (helle Pfeile), die Signalintensität dieser Banden nahm mit steigenden Mengen kotransfizierter HA-TSHR-cDNA zu (Spur 1-5 von links nach rechts). In anti-FLAG-Immunpräzipitat von Proteinlysaten, die ausschließlich HA-TSH-Rezeptorprotein enthielten, konnten diese Banden nicht nachgewiesen werden (Spur 6, HA).

In der rechten Spur wurde mit anti-HA-Antikörper präzipitiertes Proteinlysat von Cos-7-Zellen aufgetragen, welche HA-TSH-Rezeptorprotein exprimierten, um die Identität der hochmolekularen Banden in allen Spuren zu verdeutlichen. Nur in dieser Präparation kommt das 100 kDa TSH-Rezeptorprotein zur Darstellung (ausgefüllter Pfeil). Die Banden unter 100 kDa müssen als unspezifisch angesehen werden (siehe oben, Immunpräzipitation von HA-TSHR mit anti-HA-Antikörper).



Kotransfektion von FLAG- und HA-TSHR in Cos-7-Zellen (2).

Abbildung 20

FLAG- und HA-TSHR-cDNA wurde in verschiedenen Gewichtsverhältnissen mittels DEAE-Dextran-Methode in Cos-7-Zellen kotransfiziert und koexprimiert. Proteinlysate dieser Zellen wurden mit anti-HA-Antikörper präzipitiert, auf 8%-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf PVDF-Membran geblottet.

von links nach rechts: HA - Proteinlysat von ausschließlich mit HA-TSHR-cDNA transfizierten Cos-7-Zellen; H:F - Proteinlysat von im angegebenen Verhältnis mit HA- und FLAG-TSHR-cDNA kotransfizierten Cos-7-Zellen; FLAG - Proteinlysat von ausschließlich mit FLAG-TSHR-cDNA transfizierten Cos-7-Zellen. Alle diese Lysate wurden mit anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert. rechte Spur - anti-FLAG-Immunpräzipitat von ausschließlich mit FLAG-TSHR-cDNA transfizierten Cos-7-Zellen (Positivkontrolle).

Die Detektion von Antigenbanden erfolgte mit anti-FLAG-Antikörper (Verdünnung 1:1000). Gebundener Antikörper wurde mit einem peroxidase-konjugierten anti-IgG_{Fc}-Zweitantikörper (Verdünnung 1:4000) markiert, dessen Lokalisation wurde mittels einer Chemilumineszenzreaktion auf Röntgenfilm abgebildet (Belichtungszeit 15 Sek.).

Die Detektion FLAG-spezifischer Banden auf einem Blot mit Proteinlysaten aus kotransfizierten Zellen, die mit dem anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert wurden, ergab aufgrund der geringeren Spezifität des dem anti-FLAG-Antikörper auch bei der Immunpräzipitation deutlich unterlegenen anti-HA-Antikörpers (siehe oben) eine Vielzahl unspezifischer Signale. Da sich letztlich alle Banden unterhalb 120 kDa trotz unterschiedlicher Proben in den Spuren 1-6 in gleicher Laufhöhe und Intensität darstellen und in Spur 1 (HA) das FLAG-Epitop gar nicht vorhanden ist, können sie keinem spezifischen FLAG-Signal entsprechen. Interessanterweise zeigten sich jedoch mit steigender Konzentration kotransfizierter FLAG-TSH-Rezeptor-cDNA (Spuren 2-5 von links nach rechts) steigende Signalintensitäten der hochmolekularen Banden (helle Pfeile), Zum Vergleich wurde wiederum ein anti-FLAG-Immunpräzipitat von FLAG-TSH-Rezeptor auf die Spur rechts außen aufgetragen.

Der Nachweis von FLAG-Antigen in immun-präzipitierten Proteinlysaten von sowohl den FLAG- als auch HA-TSH-Rezeptor koexprimierenden Cos-7-Zellen und von HA-Antigen im entsprechenden Vergleichsexperiment legt den Schluss nahe, dass in den nachgewiesenen hochmolekularen Expressionsprodukten mehr als ein TSH-Rezeptormolekül mit Markerpeptid vorliegt.

3.5 Herstellung von Antiseren gegen Fusionsproteine mit konkatemerisierten FLAGund HA-Epitopen

Im Hinblick auf weiterführende Experimente mit dem markierten TSH-Rezeptor, aber auch zur späteren Ausweitung der Markierungstechnik auf andere Moleküle, wurde begonnen, die für solche Experimente notwendigen Werkzeuge selbst herzustellen, um von teuren Einkäufen unabhängig zu werden und die gewünschten Eigenschaften dieser Werkzeuge selbst steuern zu können.

Bei den verwendeten Markern FLAG und HA handelt es sich um lineare Epitope. Solche Epitope können grundsätzlich als einzelne, lineare Peptidstränge exprimiert werden, indem die entsprechende Basensequenz in einen geeigneten Expressionsvektor eingebracht und z.B. in Bakterienzellen exprimiert wird. Mit Hilfe solcher Peptide können Kompetitionsexperimente durchgeführt, aber auch - wichtiger noch - Antikörper gegen diese linearen Epitope selbst hergestellt werden.

Die Expression der Peptide wurde als Fusionsprotein realisiert (Abbildung 21). Der Kern dieses Proteins besteht aus mehreren aneinandergereihten Markerpeptiden, die aus methodischen Gründen über eine Methionin-Brücke verbunden sind. Der N-Terminus des Proteins wird durch das Enzym Ketosteroidisomerase (KSI, 125 Aminosäuren) gebildet. Dieses Enzym dient ausschließlich als Trägermolekül, es ist hydrophob und vereinfacht nach der Expression die Abtrennung des Fusionsproteins von anderen bakteriellen Proteinen, die in der Mehrzahl hydrophil sind. Am C-Terminus der Peptid-Konkatemere schließt sich eine Hexahistidin-Sequenz an (sog. Histidin-Tag), die eine hohe Affinität zu Nickel besitzt. Über diese Sequenz kann das Fusionsprotein mittels Nickel-Agarose-Chromatographie aufgereinigt werden.

Herstellung eines Konstrukts zur Expression von KSI-Poly-FLAGbzw. KSI-Poly-HA-Hexahistidin-Fusionsproteinen im Vektor pET-31b(+) (Firma Novagen).



Abbildung 21

Die sense- und antisense-Oligonukleotide wurden zunächst zu doppelsträngigen DNA-Kassetten mit 3-Basen-Überhängen hybridisiert und anschließend durch Ligation zu Oligomeren konkatemerisiert. Diese Oligomere wurden in den mit *Alw*N I linearisierten, dephosphorylierten Expressionsvektor pET-31b(+) ligiert. Die anschließende Expression ergab Fusionsproteine aus einem schwer wasserlöslichen KSI-Anteil (Ketosteroid-Isomerase), mehreren durch Methionin verbundenen FLAG- bzw. HA-Peptiden (FLAG/HA) und einem Hexahistidin-Anteil (6His, Histidin-Tag) zur anschließenden Reinigung mit Nickel-Agarose-Chromatographiesäulen. (siehe im Literaturverzeichnis: pET System Manual)

Die für das FLAG- bzw. HA-Peptid kodierenden DNA-Kassetten wurden durch Hybridisierung geeigneter einzelsträngiger Oligonukleotide hergestellt. Zur Klonierung enthielten diese Kassetten 3'-Überhänge mit der Sequenz ATG respektive TAC. Über dieses Basentriplett konnten die Kassetten durch eine Ligationsreaktion konkatemerisiert und anschließend in den vorbereiteten Expressionsvektor inseriert werden. Das Basentriplett kodiert für die Aminosäure Methionin, die als Brücke die FLAG- bzw. HA-Peptide im Fusionsprotein verbindet.

Der KSI-Anteil und das Hexahistidin wurden vom für die Expression verwendeten Vektor pET-31b(+) eingebracht. Dieser Vektor wurde speziell für die rekombinante Produktion von Peptiden und kleinen Proteinen konstruiert (Firma Novagen).

3.5.1 Herstellung von doppelsträngigen DNA-Kassetten mit Leserastern für das FLAG- bzw. das HA-Epitop

Für jedes der beiden Peptide wurden Oligonukleotide mit dem gewünschten Leseraster als sense- und antisense-DNA synthetisiert (MWG Biotech). Die korrespondierenden

sense- und einem antisense-Oligonukleotide wurden zu einer doppelsträngigen DNA-Kassette hybridisiert. Am 3'-Ende einer solchen DNA-Doppelstrang-Kassette befindet sich jeweils ein komplementäres Basentriplett (ATG bzw. TAC). Über diese "klebrigen Enden" (engl. sticky ends) konnten Konkatemere mehrerer solcher Kassetten ligiert werden.

Primer FLAG-sense												
Sequenz	5'G	AC	TAC	AAA	GAC	GAT	GAC	GAC	AAA	ATG	3 '	
Größe	27 E	ase	npaa	are								
Annealing-Temperatur:	57,2°C											
Primer FLAG-antisense												
Sequenz	5' Т	TT	GTC	GTC	ATC	GTC	TTT	GTA	GTC	CAT	3'	
Größe	27 Basenpaare											
Annealing-Temperatur	59°C											
DNA-Doppelstrang nach Hybridisierung												
Sequenz	5'		GAC	TAC	AAA	GAC	GAT	GAC	GAC	AAA	ATG	3 '
	3' І	AC	CTG	ATG	TTT	CTG	CTA	CTG	CTG	TTT		5 '
Peptid	M	iet .	Asp	Tyr	Lys	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Met	

Primer HA-sense													
Sequenz		TAC	CCC	TAC	GAC	GTG	CCC	GAC	TAC	GCC	ATG	3'	
Größe	30	Base	enpaa	are									
Annealing-Temperatur:	73,3°C												
Primer HA-antisense													
Sequenz	5'	GGC	GTA	GTC	GGG	CAC	GTC	GTA	GGG	GTA	CAT	3'	
Größe	30	30 Basenpaare											
Annealing-Temperatur	71,	9°C											
DNA-Doppelstrang nach Hybridisierung													
Sequenz	5'		TAC	CCC	TAC	GAC	GTG	CCC	GAC	TAC	GCC	ATG	3 '
	3'	TAC	ATG	GGG	ATG	CTG	CAC	GGG	CTG	ATG	CGG		5 '
Peptid		Met	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Val	Pro	Asp	Tyr	Ala	Met	

3.5.2 Herstellung von Konkatemeren der DNA-Kassetten

Zur Ligation wurden je 2 nmol dieser Oligonukleotide zunächst mit T4-Polynukleotidkinase am 5'-Ende phosphoryliert. Die korrespondierenden Oligonukleotide wurden anschließend zu Doppelsträngen ("Kassetten") hybridisiert. Um unspezifische Bindungen zu minimieren, wurde die Reaktion in einem PCR-Thermocycler durchgeführt. Dieser wurde so programmiert, dass die Oligonukleotide zunächst bei 95°C als Einzelstränge vorlagen, danach wurde die Temperatur schrittweise auf einen Wert knapp unterhalb der berechneten Hybridisierungstemperatur für das Oligonukleotidpaar reduziert (56°C für die FLAG-Kassette, 70°C für die HA-Kassette). Nach 30 Minuten Reaktionszeit wurden die Ansätze auf Eis abgekühlt. Die fertigen DNA-Kassetten wurden anschließend mit Phenol/Chloroform extrahiert, mit Ethanol gefällt und in 20 µl Wasser aufgenommen (Endkonzentration: 100 pmol dsDNA/µl). 500 pmol dieser DNA wurden anschließend in einer Ligationsreaktion zu Polymeren konkatemerisiert, diese wurden in einem 3% igen Agarosegel aufgetrennt.

Es bildeten sich Ligationsprodukte von <100 bis mehreren 1000 Basenpaaren, entsprechend einzelnen bis >20 kokatemerisierten DNA-Kassetten (Abbildung 22). Nur im unteren Bereich des Gels konnten Einzelbanden ausreichend sicher unterschieden werden, diese wurden mit einem Skalpell unter UV-Beleuchtung aus dem Gel herausgetrennt.



Auftrennung der FLAG- und HA-Konkatemere.

Abbildung 22

Bei der Konkatemerisierung der phosphorylierten FLAG- und HA-DNA-Kassetten mittels T4-DNA-Ligase bildeten sich Reaktionsprodukte aus n Kassetten über einen weiten Größenbereich. Elektrophoretische Auftrennung in einem 3%-Agarosegel.

3.5.3 Ligation von konkatemeren DNA-Kassetten in den Expressionsvektor pET-31b(+)

Aus den Gelstücken wurde die enthaltene DNA extrahiert und in den vorbereiteten Expressionsvektor kloniert. Wie sich herausstellte, führte eine direkte Klonierung nicht zu einer ausreichend hohen Ausbeute an Vektorklonen. Es ist anzunehmen, dass sich unter den Endprodukten der Konkatemerisierung ein hoher Anteil DNA-Doppelstränge befand, die wegen fehlender 5'-Phosphatreste nicht zu größeren Einheiten verknüpft werden konnten und gerade deshalb als Reaktions-Endprodukte vorlagen. Erst durch erneute Phosphorylierung der Konkatemere an deren 5'-Enden und anschließende Phenolextraktion konnten die Bedingungen für eine Klonierung in den dephosphorylierten, linearisierten Expressionsvektor pET-31b(+) geschaffen werden.

Mit einem Aliquot der Ligation wurden *E.coli* XL1-blue Bakterienzellen transformiert und auf LB-Agar mit Ampicillin ausplattiert. Die gewachsenen Kolonien wurden mittels eines PCR-Kolonie-Screenings auf Inserts getestet, dazu wurde ein Primerpaar aus dem Expressionsvektor stromauf- und stromabwärts der Klonierungsstelle verwendet (Protokoll im Anhang, Tabelle A-10). In Vektoren, bei denen erfolgreich ein DNA-Fragment in die Klonierungsstelle inseriert wurde, weichen die Bindungsstellen der Primer auf der Vektorsequenz auseinander. Das PCR-Produkt sollte also in positiven Klonen um die Länge des inserierten DNA-Fragments verlängert sein.



Insert-Screening mittels PCR.

Abbildung 23

Agarose-Gelelektrophorese von PCR-Produkten aus dem Insert-Screening. Durch zwei Pfeile markiert ist das PCR-Produkt aus einem Vektor ohne Insert. Größere PCR-Produkte enthalten Inserts verschiedener Größe. Die Bande bei ca. 400 bp ist in allen Reaktionsansätzen enthalten und entspricht einer DNA-Kontamination.

Von im Screening positiven Klonen wurde mittels "Mini-Prep" Plasmid-DNA gewonnen und zur Kontrolle über den vollständigen Bereich der inserierten DNA-Fragmente sequenziert. Für die Expression von Fusionsprotein wurden vier Plasmide ausgewählt, die ein 4-mer, ein 7-mer und ein 12-mer der FLAG-DNA-Kassette sowie ein 5-mer der HA-DNA-Kassette enthielten.

3.5.4 Expression der Fusionsproteine in kompetenten *Escherichia coli* Bakterienzellen

3.5.4.1 Test-Expression von Fusionsprotein und Untersuchung der Immunreaktivität mit anti-FLAG- bzw. anti-HA-Antikörpern

Zur Expression der Fusionsproteine wurden mit den ausgewählten Konstrukten (FLAG-4mer, -7mer, -12mer, HA-5mer) kompetente *E.coli*-Zellen transformiert. Zur Sicherheit wurden zwei gering verschiedene Stämme als Expressionssystem eingesetzt: *E.coli* BL21 (DE3) und *E.coli* BL21 (DE3) pLysS. Um eine ausreichende Anzahl Transformanden zu erhalten, mußte je 1 µg Vektor-DNA eingesetzt werden.

Zum Test der Expression wurde jeweils eine Einzelkolonie transformierter Bakterien zunächst vermehrt. Anschließend wurde die Transskription und Translation des Fusionsproteins auf der Plasmid-DNA durch Zugabe von IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid) induziert. Die Expression wurde über 4 Stunden fortgesetzt. Nach dieser Zeit wurde ein Aliquot der Kultur (300 µl aus 10 ml Kulturvolumen) entnommen und die Bakterienzellen pelletiert. Zur Überprüfung der Expressionsprodukte wurde das im Pellet vorliegende Protein auf einfache Weise durch Resuspension und Denaturierung

des Pellets mit SDS-PAGE-Ladepuffer suspendiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach Coomassie angefärbt.



Expression der FLAG-/HA-KSI-Fusionsproteine in E.coli.

Abbildung 24

Kompetente *E.coli BL21(DE3)* und *E.coli BL21(DE3)pLysS* wurden mit je 1 µg Plasmid transformiert. Die Expression der rekombinanten Proteine wurde mit 1 mM IPTG induziert und für 4 h bei 37°C durchgeführt. Ein Aliquot der Bakteriensuspension (300 µl von 10 ml Kulturvolumen) wurde pelletiert, das Pellet in 15 µl SDS-PAGE-Puffer aufgenommen, 5 min. bei 95°C denaturiert und in einem 12%igen Gel mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden Proteinbanden mit Coomassie-Blau eingefärbt. Die weißen Pfeile zeigen die den Expressionsprodukten entsprechenden Banden. MW = Molekulargewichts-Marker.

Die Expressionsprodukte waren als deutliche Bande im erwarteten Größenbereich von 21 bis 35 kDa zu erkennen. Beide verwendeten Bakterienstämme, *E.coli* BL21 (DE3) und BL21 (DE3) pLysS, erwiesen sich als gleichermaßen geeignet zur Herstellung des erwünschten Fusionsproteins.

3.5.4.2 Zeitverlauf der Expression von Fusionsprotein

Nachdem die prinzipielle Eignung des gewählten Vorgehens zur Produktion von immunreaktiven FLAG- bzw. HA-Peptiden nachgewiesen werden konnte, wurde in einem nachfolgenden Experiment der Einfluss der Expressionsdauer auf die Expressionsprodukte untersucht, um für die Herstellung großer Mengen von Fusionsprotein optimale Bedingungen festzulegen. Theoretisch führt eine zu kurze Inkubationszeit zu einer niedrigen Ausbeute, während sich mit steigender Inkubationsdauer die Kulturbedingungen für die Bakterien verschlechtern und unerwünschte Abbauprodukte akkumulieren können.
Bakterienkolonien mit den entsprechenden Expressionsvektoren wurden zunächst in 10 ml Kulturmedium expandiert, bevor die Expression der Fusionsproteine durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert wurde. Jede Stunde wurden 300 µl Bakteriensuspension aus Kulturmedium die Bakterienzellen dem aliquotiert. pelletiert und die Expressionsprodukte in SDS-PAGE-Puffer resuspendiert und denaturiert. Mit diesen Suspensionen wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Der Rest der Kultursuspension (ca. 8 ml) wurde für weitere Experimente (Ultraschall-Lyse der Bakterien, Auffinden von Expressionsprodukten in der löslichen und unlöslichen Proteinfraktion, Reinigung mittels Nickel-Agarose-Chromatographie, siehe unten) tiefgefroren und aufbewahrt.



Zeitverlauf der Expression von rekombinanten Proteinen über 5 Stunden nach Induktion.

Abbildung 25

Die Expression der rekombinanten Proteine in kompetenten *E.coli BL21(DE3)* wurde nach Induktion mit 1 mM IPTG über 5 h beobachtet. Coomassie-Färbung eines 12%-SDS-PAGE-Gels. Die weißen Pfeile zeigen die den Expressionsprodukten entsprechenden Banden. Ein identisches Ergebnis wurde mit *E.coli BL21(DE3)pLysS* erzielt. Die weißen Pfeile indizieren die Expressionsprodukte in den mit Abkürzungen beschrifteten Laufspuren (F4 = FLAG-4mer usw.). MW = Molekulargewichts-Marker.

Wie sich zeigen ließ, nahm mit steigender Induktionsdauer die Menge des gewonnenen Gesamtproteins stetig zu. Bereits nach einer Stunde Induktion lagen große Mengen Fusionsprotein vor. Nach 3-4 Stunden ließ sich die Menge gebildeten Fusionsproteins nicht mehr erheblich steigern. In späteren Proteinpräparationen befanden sich die erwünschten Fusionsproteine in einem ungünstigeren Verhältnis zu den unerwünschten Verunreinigungen mit anderen bakteriellen Proteinen. Für die Expression großer Mengen von Fusionsprotein wurde deshalb später eine Expressionszeit von 4 Stunden gewählt.

3.5.5 Gewinnung reiner Fusionsproteine

3.5.5.1 Trennung von löslicher und unlöslicher Proteinfraktion

Für die Reinigung der Expressionsprodukte von anderen bakteriellen Proteinen war es nötig festzustellen, ob die Fusionsproteine tatsächlich, wie wegen des schwer löslichen KSI-Anteils erwartet, in der wasser-"unlöslichen" Fraktion des bakteriellen Gesamtproteins vorlagen. Zu diesem Zweck wurde der Rest der Bakteriensuspension aus dem Vorexperiment (siehe oben) verwandt, dies entsprach ca. 8 ml Kultursuspension zum Zeitpunkt 5 Stunden nach Induktion der Expression. Die Bakterienzellen wurden pelletiert und in 5 ml Ultraschall-Puffer aufgenommen. Zur Zerstörung der bakteriellen Zellwand und Freisetzung des bakteriellen Gesamtproteins wurde diese Suspension energiereichen Ultraschallwellen ausgesetzt (2x20 Sekunden).

Die unlöslichen Bestandteile der entstandenen Proteinsuspension wurden durch Zentrifugation pelletiert. Aliquots (16 μ l) beider Fraktionen - lösliche Proteine im Überstand und unlösliche Proteine im Pellet, welches dazu nochmals in 5 ml Ultraschall-Puffer resuspendiert wurde - wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und nach Coomassie angefärbt. Die Restmenge (ca. 5 ml) beider Fraktionen wurde für die Aufreinigung der Fusionsproteine mittels Nickel-Agarose-Chromatographie aufbewahrt.

Wie sich zeigte, befanden sich die kleineren Fusionsproteine praktisch vollständig in der unlöslichen Fraktion (Abbildung 26). Nur größte Fusionsprotein mit 12 konkatemerisierten FLAG-Peptiden wurde überwiegend in der löslichen Proteinfraktion nachgewiesen (FLAG-12mer) - die Hydrophilie anteilig sehr großen FLAG-Domäne überwog in diesem Fusionsprotein die durch die KSI-Domäne vermittelte Hydrophobie (Abbildung 27).

Entscheidend für die Reinigung größerer Mengen Fusionsprotein war die Erkenntnis, dass sich durch die Trennung von löslicher und unlöslicher Fraktion bereits ein erster Schritt zur Aufreinigung der Expressionsprodukte verwirklichen ließ. Für die weitere Aufreinigung mittels Nickel-Agarose-Chromatographie wurde entschieden, mit den Fusionsproteinen FLAG-7mer und HA-5mer weiterzuarbeiten, beide lagen in überwiegender Menge in der unlöslichen Fraktion vor.



Unlösliche Proteinfraktion aus mit Ultraschall lysierten Bakteriensuspensionen.

Abbildung 26

Bakterien wurden 5 h nach Induktion der Expression pelletiert, in Puffer resuspendiert und durch Ultraschallanwendung lysiert. Die unlöslichen Proteine der entstehenden Suspension wurden durch Zentrifugation abgetrennt, das Pellet wurde resuspendiert und die enthaltenen unlöslichen Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Coomassie-Färbung. In der unlöslichen Fraktion gelangen hauptsächlich die kleineren Fusionsproteins zur Darstellung (weiße Pfeile).

Lösliche Proteinfraktion aus mit Ultraschall lysierten Bakteriensuspensionen.



Abbildung 27

Bakterien wurden 5 h nach Induktion der Expression pelletiert, in Puffer resuspendiert und durch Ultraschallanwendung lysiert. Die unlöslichen Proteine der entstehenden Suspension wurden durch Zentrifugation abgetrennt, die im verbleibenden Überstand befindlichen löslichen Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Coomassie-Färbung. In der löslichen Fraktion stellt sich nur ein Anteil des FLAG-12mer-Fusionsproteins dar (weiße Pfeile).

3.5.5.2 Nickel-Agarose-Chromatographie der FLAG-7mer- und HA-5mer-Fusionsproteine

Zur weiteren Aufreinigung der Expressionsprodukte wurde die FLAG-7mer- und HA-5mer-Expressionsprodukte einer Nickel-Agarose-Chromatographie unterworfen. Dazu wurde der Rest der unlöslichen Proteinfraktion aus dem Vor-Experiment erneut pelletiert, in Puffer aufgenommen und mit einer Nickel-Agarose-Gelmatrix (2 ml Gelvolumen) versetzt. Der Hexahistidinanteil der Fusionsproteine vermittelt eine Chelat-Bindung an Nickelionen, so dass die Gelmatrix bevorzugt das Hexahistidin-haltige Fusionsprodukt zurückhält. Verunreinigende bakterielle Proteine wurden durch mehrere Waschvorgänge entfernt (Abbildung 28, a-e). Die Fusionsproteine konnten danach in großer Reinheit aus der Gelmatrix eluiert werden (fraktionierte Elution, Abbildung 28, 1-5).



Reinigung der Fusionsproteine durch Nickel-Agarose-Chromatographie.

Abbildung 28

Im Experiment untersucht wurden die Fusionsproteine FLAG-7mer und HA-5mer. Die Expression der rekombinanten Proteine in kompetenten *E.coli BL21(DE3)* erfolgte in 10 ml Kultursuspension über 5 h nach Induktion mit 1 mM IPTG. Vor der Chromatographie wurden die Bakterienzellen durch Ultraschall-Lyse zerstört und das bakterielle Gesamtproteins in eine lösliche und eine unlösliche Fraktion geschieden. Nur die unlösliche Fraktion mit den Expressionsprodukten wurde in Puffer resuspendiert und über 2 ml einer Nickel-Agarose-Gelmatrix chromatographiert.

Aufgetragen wurden $24 \,\mu$ l-Aliquots verschiedener Säulendurchläufe der Nickel-Agarose-Chromatographie: a-e Waschdurchläufe, 1-5 fraktionierte Elution (je 1 ml Elutionspuffer). Die Bande nahe 30 kDa entspricht den gereinigten Fusionsproteinen. MW = Molekulargewichts-Marker.

Coomassie-Färbung eines 12%-SDS-PAGE-Gels.

Es zeigte sich, dass die Fusionsproteine während der Waschdurchläufe effizient in der Gelmatrix zurückgehalten wurden. Nach nur zwei Elutionsfraktionen war kaum mehr Protein in der Gelmatrix verblieben, dies zeigte an, dass die Nickel-Agarose-Menge für die im Experiment verarbeitete Menge Fusionsprotein sehr großzügig bemessen war und bei weitem nicht alle Bindungsstellen der Matrix besetzt waren.

3.5.5.3 Expression und Aufreinigung von Milligramm-Mengen der FLAG-7mer- und HA-5mer-Fusionsproteine

Zur Erzeugung von Antiseren gegen das FLAG- und das HA-Epitop sollten Ratten mit den Fusionsproteinen FLAG-7mer und des HA-5mer immunisiert werden. Für eine derartige Immunisierung wurden die Fusionsproteine in hochreiner Form und ausreichender Menge benötigt. Es wurden deshalb die beschriebenen Expressions- und Reinigungsschritte auf die benötigte Proteinmenge im Milligrammbereich skaliert.

Die Expression der Fusionsproteine wurde nach Induktion mit IPTG über 4 Stunden in 500 ml Kultursuspension durchgeführt. Die Auftrennung in lösliche und unlösliche Proteinfraktionen erfolgte wie im Vorexperiment (siehe oben). Nach den Erfahrungen aus den Vorexperimenten wurden für die größere Proteinmenge 4 ml Nickel-Agarose-Gelmatrix eingesetzt. Die Elution erfolgte fraktioniert in 5 Einzelvolumina zu je 3 ml Elutionspuffer.



Aufreinigung von Fusionsprotein in Milligramm-Mengen.

Abbildung 29

Exprimiert und aufgereinigt wurden die Fusionsproteine FLAG-7mer und HA-5mer. Die Expression der rekombinanten Proteine in kompetenten E.coli BL21(DE3) erfolgte in 500 ml Kultursuspension über 4 h nach Induktion mit 1 mM IPTG. Vor der Chromatographie wurden die Bakterienzellen durch Ultraschall-Lyse zerstört und das bakterielle Gesamtproteins in eine lösliche und eine unlösliche Fraktion geschieden. Nur die unlösliche Fraktion mit den Expressionsprodukten wurde in Puffer resuspendiert und über 4 ml einer Nickel-Agarose-Gelmatrix chromatographiert. Aufgetragen wurden 20 µl-Aliquots verschiedener Säulendurchläufe der Nickel-Agarose-Chromatographie: a-e Waschdurchläufe, 1-5 fraktionierte Elution (je 1 ml Elutionspuffer). Die Bande nahe 30 kDa entspricht den gereinigten Fusionsproteinen. MW = Molekulargewichts-Marker. Coomassie-Färbung eines 12%-SDS-PAGE-Gels.

Die überwiegende Menge des Fusionsproteins wurde mit den ersten beiden Eluatfraktionen freigesetzt (Abbildung 29). Der Nachweis kleiner Mengen Fusionsprotein in den Eluatfraktionen 3-5 und in den Waschdurchläufen a und e deutete eine Beladung der Nickel-Agarose-Gelmatrix an der oberen Grenze der Gelkapazität an. In einem Folgeexperiment wurde deshalb die Gelmenge bei sonst identischer Skalierung auf 8 ml erhöht, wodurch die Überladungseffekte reduziert werden konnten. Die aus zwei Expressionsansätzen mit je 500 ml Bakterienkultur und nachfolgender Reinigung gewonnenen Eluate wurden zur Reinigung von unerwünschten niedermolekularen Bestandteilen gegen Phosphatpuffer (PBS) dialysiert. Die Proteinkonzentration der Dialysate wurde anschließend mittels BCA-Assay bestimmt. Aus beiden Experimenten konnte das Fusionsprotein FLAG-7mer in einer Gesamtmenge von 14 mg (0,5 mg/ml x 10 ml, 0,6 mg/ml x 15 ml), das Fusionsprotein HA-5mer in einer Gesamtmenge von 25 mg (1 mg/ml x 10 ml, 1 mg/ml x 15 ml).

Zur Kontrolle der Reinheit wurden die Dialysate aus beiden Experimenten mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Von identisch angefertigten SDS-PAGE-Gelen wurden Western-Blots auf PVDF-Membran angefertigt, auf diesen wurde mit anti-FLAG und anti-HA-Antikörper die Lokalisation des korrespondierenden Antigens überprüft.

Die Coomassie-Färbung einer SDS-PAGE mit Dialysaten aus den beiden unabhängigen Proteinpräparationen zeigte, dass die gewünschten Fusionsproteine in hoher Reinheit gewonnen werden konnten. Das Fusionsprotein mit sieben konkatemerisierten FLAG-Peptiden wurde sensitiv und hochspezifisch von dem kommerziellen FLAG-Antiserum erkannt. Auch das kommerzielle HA-Antiserum detektierte sehr sensitiv das Fusionsprotein mit fünf konkatemerisierten HA-Peptiden. Die Spezifität des Antikörpers erreichte wie in den Experimenten mit dem HA-markierten TSH-Rezeptor nicht ganz die des anti-FLAG-Antikörpers. Unerwünschte Kreuzreaktivität mit dem jeweils anderen Epitop wurde nicht beobachtet (Abbildung 30).

Western-Blot-Detektion der Fusionsproteine mit anti-FLAG und anti-HA-Antikörpern.



Abbildung 30

Linkes Bild - Coomassie-Färbung einer 15%-SDS-PAGE mit aufgereinigtem und gegen Phosphatpuffer dialysiertem Expressionsprodukt aus zwei unabhängigen Präparationen (ca. 10-20 µg Protein pro Laufspur).

Mittleres Bild - Western Blot von einer ähnlichen SDS-PAGE (nur 1-2 µg Protein pro Laufspur). Erstantikörper: anti-FLAG (1:4000), Zweitantikörper: anti-IgG (1:2000), Detektion mittels Chemilumineszenz-Reaktion (ECL).

Rechtes Bild - Erstantikörper: anti-HA (1:4000), Zweitantikörper: anti-IgG (1:2000), Detektion mittels Chemilumineszenz-Reaktion (ECL).

3.5.6 Herstellung von Ratten-Immunseren gegen das FLAG-7mer- und das HA-5mer-Fusionsprotein

3.5.6.1 Immunisierung von Ratten mit den Fusionsproteinen FLAG-7mer und HA-5mer

Wie im Methodenteil beschrieben wurden je drei Ratten mit dem FLAG-7mer (Tiere #67-#69) und dem HA-5mer-Fusionsprotein (Tiere #70-#72) immunisiert. Das den Tieren vor Immunisierung abgenommene Serum wurde als Präimmunserum (vor Antigen-Kontakt) bezeichnet, die während der Immunisierung gewonnenen Seren wurden als Immunseren bezeichnet. Anschließend wurden die gewonnenen Seren auf ihre Eignung im Western Blot mit den entsprechenden Antigenen untersucht.

3.5.6.2 Western Blot mit Präimmunseren

Zum Ausschluss einer in den Rattenseren vor Immunisierung vorliegenden Immunreaktivität gegen FLAG- und HA-Antigene wurde ein Western Blot mit den zur Immunisierung verwandten FLAG- und HA-Fusionsproteinen als Antigen und vor der Immunisierung gewonnenen Seren (Präimmunseren) als Antikörper durchgeführt. Es wurden für die FLAG-Präimmunseren 100 ng FLAG-Fusionsprotein und für die HA-Präimmunseren 100 ng HA-Fusionsprotein mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membran geblottet und mit den entsprechenden Präimmunseren (1:1000) inkubiert. Als Zweitantikörper wurde ein Peroxidase-gekoppelter anti-Ratten-IgG-Antikörper (1:5000) eingesetzt. In keinem der untersuchten Präimmunseren konnte Immunreaktivität gegen FLAG- und HA-Fusionsprotein nachgewiesen werden.



Western Blot mit Präimmunseren.

Abbildung 31

Je 100 ng FLAG-7mer- (linke Bildhälfte) und HA-5mer-Fusionsprotein (rechte Bildhälfte) wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet. Praeimmunserum HA #70 konnte nicht untersucht werden, da es durch Hämolyse unbrauchbar geworden war. Die Detektion von Antigenbanden erfolgte mit vor der Immunisierung gewonnenen Rattenseren (Präimmunseren) (Verdünnung 1:1000). Gebundener Antikörper wurde mit einem peroxidase-konjugierten anti-Ratten-IgG-Antikörper (Verdünnung 1:5000) markiert, dessen Lokalisation wurde mittels einer Chemilumineszenzreaktion auf Röntgenfilm abgebildet (Belichtungszeit 1 Minute).

3.5.6.3 Western Blot mit Immunseren

Zur Untersuchung der Immunreaktivität der Rattenseren nach Immunisierung mit FLAGund HA-Fusionsprotein wurden Western Blots durchgeführt, bei denen auf zwei Spuren jeweils 100 ng FLAG- und 100 ng HA-Fusionsprotein aufgetragen wurden. Die Fusionsproteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet. Jeder Blot mit den beiden Antigenen wurde mit jeweils einem Immunserum inkubiert, zum Nachweis der gebundenen Antikörper wurde ein Peroxidase-gekoppelter anti-Ratten-IgG-Antikörper (1:5000) eingesetzt.



Western Blot mit Immunseren.

Abbildung 32

Je 100 ng FLAG-7mer- (linke Spur "F") und HA-5mer-Fusionsprotein (rechte Spur "H") wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet.

Die Detektion von Antigenbanden erfolgte mit 4 Wochen nach Immunisierung gewonnenen Rattenseren gegen FLAG-7mer-Fusionsprotein (Immunseren #67-#69, 1:1000, linke Gruppe) und gegen HA-5mer-Fusionsprotein (Immunseren #70-#72, 1:1000, rechte Gruppe). Gebundener Antikörper wurde mit einem peroxidase-konjugierten anti-Ratten-IgG-Antikörper (1:5000) markiert und dessen Lokalisation mittels Chemilumineszenz auf Röntgenfilm abgebildet (Belichtungszeit 1 Minute).

Wie sich zeigte, wurde von allen Immunseren das entsprechende Antigen im erwarteten Molekulargewichtsbereich detektiert. Eine Kreuzreaktion mit dem jeweils anderen Antigen (anti-FLAG mit HA, anti-HA mit FLAG) wurde nicht beobachtet. Diese wichtige Beobachtung belegt, dass die induzierte Immunreaktivität tatsächlich gegen die FLAG- und HA-Anteile der verabreichten Fusionsproteine gerichtet ist. Bei Immunreaktivität gegen die gemeinsamen Anteile der Fusionsproteine (KSI, Hexahistidin) wäre ein Antigen-Nachweis in beiden Laufspuren (mit beiden Fusionsproteinen) zu beobachten gewesen.

3.5.7 Detektion von FLAG- und HA-TSH-Rezeptor mit Ratten-Immunseren

Abschließend musste untersucht werden, ob die gegen die Fusionsproteine erzeugten Immunseren in der Lage waren, die konkatemerisierten linearen Peptid-Epitope auch in einer anderen als der zur Immunisierung vorgegebenen Umgebung zu erkennen. Diese Untersuchung wurde natürlich mit dem am C-Terminus markierten TSH-Rezeptormolekül durchgeführt.

Da eine eingehende Untersuchung den vorgegebenen Rahmen dieser Arbeit sprengen würde, wurde zunächst stellvertretend nur FLAG-markierter TSH-Rezeptor mit einem Immunserum (Serum #69) untersucht.

Markierte TSH-Rezeptormoleküle aus dem Hela-Klon FLAG-TSHR #30 wurden mittels eines kommerziell vertriebenen anti-FLAG-Serums immunpräzipitiert. $2 \mu l$ des Immunpräzipitats wurden anschließend zusammen mit dem zur Immunisierung verwendeten Antigen (FLAG-7mer-Fusionsprotein) einer SDS-PAGE unterworfen und auf PVDF-Membran geblottet. Die Detektion von FLAG-Antigen erfolgte mit dem selbst hergestellten Ratten-Immunserum #69 und zur Kontrolle mit kommerziellem anti-FLAG-Serum. Wie sich zeigte, konnte das C-terminale FLAG-Epitop am TSH-Rezeptor in diesem Versuch vom Immunserum #69 nicht detektiert werden, während der Nachweis einer großen Menge FLAG-Antigen im Immunpräzipitat mit dem kommerziellen Antiserum wie gewohnt gelang (Abbildung 34). Das zur Immunisierung verwendete FLAG-7mer-Fusionsprotein wurde sowohl vom Serum #69 als auch vom kommerziellen anti-FLAG-Serum mit annähernd gleicher Signalintensität detektiert.

Erprobung des anti-FLAG-7mer-Fusionsprotein-Immunserums #69 gegen immunpräzipitierten FLAG-TSH-Rezeptor.



Abbildung 34

500 ng und 1 μ g FLAG-7mer-Fusionsprotein (FLAG-7) sowie 2 μ l einer Immunpräzipitation von Protein aus den FLAG-TSH-Rezeptor exprimierenden Hela-Zellen (FLAG-TSHR #30), mit einem kommerziellen anti-FLAG-Immunserum durchgeführt, wurden in einem 15% igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet.

FLAG-Antigen wurde im linken Blot mit einem kommerziellen anti-FLAG-Antiserum (Zymed polyklonales Kaninchen-anti-FLAG-Serum, 1:2500) detektiert, als Zweitantikörper wurde ein Peroxidase-gekoppelter anti-Kaninchen-Antikörper eingesetzt (1:2500).

Im rechten Blot wurde Antigen mit dem gegen das FLAG-7mer-Fusionsprotein erzeugten Rattenimmunserum #69 detektiert (1:2500), als Zweitantikörper wurde ein Peroxidase-gekoppelter anti-Ratten-Antikörper verwendet (1:2500).

Die Lokalisation des peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers wurde durch eine Chemilumineszenzreaktion auf Röntgenfilm dokumentiert (Belichtungszeit 1 Minute).

Das Ergebnis dieses Experiments verweist darauf, dass die hier gegen Fusionsproteine mit konkatemerisierten Peptid-Epitopen erzeugten Antiseren sich unter Umständen nicht zum Nachweis dieser Epitope in anderen Umgebungen eignen. In der anschließenden Diskussion soll darauf eingegangen werden, welche Untersuchungen mit den erzeugten Antiseren noch durchgeführt werden müssen, um ihre Tauglichkeit zum Nachweis der Peptid-Epitope in anderen Umgebungen zu ermitteln oder verwerfen zu müssen, wo die Gründe für ein mögliches Scheitern der erzeugten Antiseren liegen können, und wie diesen Ursachen möglicherweise begegnet werden kann.

4 Diskussion

4.1 Einführung der für die Epitope FLAG und HA kodierenden DNA-Nukleotidsequenzen in eine TSH-Rezeptor-cDNA mittels PCR

Die Anwendung einer Epitop-Markierung erfordert grundsätzlich die Modifikation der im markierten Protein vorliegenden Peptidsequenz. Methodisch ist eine solche Insertion an beliebigen Stellen der cDNA- und damit auch Peptidsequenz durchführbar. Um zu nützlichen Ergebnissen zu gelangen, sollten die "überzähligen" Peptide die physiologische Konformation und Funktion des untersuchten Proteins jedoch möglichst wenig beeinträchtigen.

Die Struktur des TSH-Rezeptorproteins erlaubt die Unterscheidung von drei wesentlichen Domänen: auf eine ausgedehnte, N-terminale, extrazelluläre Domäne folgen die sieben Schleifen der Transmembrandomäne, daran schließt sich eine relativ kurze, rein intrazelluläre Domäne an.

Da die N-terminale, extrazelluläre Domäne des Rezeptors die Hormonbindung vermittelt, musste für eine Veränderung der Primärstruktur an dieser Stelle eine Veränderung der Hormonbindungs-Eigenschaften des Rezeptors angenommen werden. Während der Durchführung der hier vorgestellten Experimente jedoch veröffentlichte eine Arbeitsgruppe Daten zu einem in der extrazellulären Domäne markierten TSH-Rezeptormolekül, welches im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor unveränderte TSH-Bindungseigenschaften aufwies (*Tanaka et al. 1996*). Diese Arbeitsgruppe mutierte die Aminosäuren 338-349 der Rezeptor-Peptidsequenz zu einem c-myc-Antigen. Neuere Daten legen allerdings die Vermutung nahe, dass gerade dieser Teilabschnitt der extrazellulären Domäne in funktionellen Rezeptoren abgespalten wird und somit die TSH-Bindung nicht beeinflusst (*Tanaka et al. 1998*, siehe auch unten: TSH-Rezeptor-Untereinheiten).

Die Transmembrandomäne des Rezeptors vermittelt die korrekte Integration des Rezeptors in das Lipid-Bilayer der Zellmembran und die Übertragung eines durch die Hormonbindung ausgelösten Signals auf intrazelluläre G-Proteine, so dass auch diese Domäne nicht geeignet erschien.

Als Integrationsort wurde schließlich der C-terminale, intrazelluläre "Schwanz" des Rezeptors gewählt, der keine bedeutende physiologische Funktion bei der Hormonbindung und Signaltransduktion zu besitzen scheint und nachweislich nahezu komplett entfernt werden kann, ohne die Rezeptorfunktion maßgeblich zu beeinträchtigen (*Chazenbalk et al. 1990*).

4.2 TSH-Bindung der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte

Da die TSH-Bindung sowohl von transient in Cos-7-Zellen als auch von stabil in Hela-Zellen exprimierten TSH-Rezeptorkonstrukten analoge Ergebnisse erbrachte, sollen diese hier gemeinsam diskutiert werden.

4.2.1 Bedeutung der wesentlichen TSH-Rezeptordomänen für die TSH-Bindung

Die Bindung von TSH an den TSH-Rezeptor wird hauptsächlich von extrazellulären Anteilen des Rezeptormoleküls vermittelt. Die korrekte Prozessierung und Glykosylierung der extrazellulären Rezeptordomäne ist dabei für die hochaffine Hormonbindung und Signaltransduktion von Bedeutung (*Russo et al. 1991a [735]*). Auch rekombinante, in Baculovirus-transfizierten Insektenzellen exprimierte extrazelluläre Domänen des TSH-Rezeptors binden TSH (*Seetharamaiah et al. 1994*); ebenso wurden in Schilddrüsen-Präparationen lösliche TSH-bindende Moleküle gefunden (*Willey et al. 1993 [482]*). Diese könnten mindestens zum Teil den im Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung charakterisierten Splicing-Varianten entsprechen, die für die extrazelluläre Domäne des Rezeptors ohne Membranverankerung kodieren (*Hunt et al. 1995 [1190]*).

In umfangreichen Studien wurde versucht, auf der sehr ausgedehnten extrazellulären Domäne (394 Aminosäurereste) Bereiche zu identifizieren, die für die TSH-Bindung besondere Bedeutung besitzen (zusammengefasst bei *Kohn et al. 1995 [348]*). Mindestens zwei Peptidsequenzen am N-terminalen und am C-terminalen Ende der extrazellulären Domäne, die wahrscheinlich durch die komplexe dreidimensionale Faltung des Proteins in unmittelbarer Nachbarschaft zu liegen kommen, werden für die spezifische TSH-Bindung verantwortlich gemacht. Auch für die Interaktion von spezifischen (Auto)Antikörpern mit dem Rezeptor, z.B. bei Morbus Basedow-Patienten, wurden bestimmte Bereiche eingegrenzt.

Peptidsequenzen in der extrazellulären Domäne des TSH-Rezeptors, deren Homologe sich auch in den anderen Glykoproteinhormon-Rezeptoren (FSHR, LH/CGR) finden, könnten für die Interaktion der Glykoproteinhormon-Rezeptoren mit der bei den Glykoproteinhormonen FSH, LH/CG und TSH identischen α -Untereinheit verantwortlich sein. Interessanterweise ist hCG/LH unter bestimmten Bedingungen sogar in der Lage, an TSH-Rezeptoren zu binden und eine Rezeptoraktivierung auszulösen (*Y oshimura et al. 1995 [253]*). Dieser experimentelle Befund unterstützt die klinische Beobachtung, dass bei manchen Patienten mit trophoblastischen Tumoren und hohen Serum-hCG-Spiegeln hyperthyreote Funktionsstörungen auftreten können.

Es mehren sich Hinweise, wonach die TSH-bindende extrazelluläre Domäne des TSH-Rezeptors im Unterschied zu den homologen Domänen des LH/CG- und FSH-Rezeptors posttranslationell proteolytisch gespalten wird, möglicherweise geht sogar ein Teil dieser Domäne mit fehlender Entsprechung in den homologen Glykoproteinhormon-Rezeptoren als C-Peptid verloren (*Tanaka et al. 1998*, siehe weiter unten). Eine solche Modifikation scheint jedoch für die hochaffine Bindung von TSH zumindest nicht notwendig zu sein.

Auch extrazelluläre Anteile der Transmembrandomäne scheinen an der hochaffinen TSH-Bindung beteiligt zu sein. Es wurden sogar Mutationen an intrazellulären Anteilen der Rezeptor-Primärstruktur beschrieben, die wahrscheinlich über eine Änderung der gesamten Rezeptorkonformation die extrazelluläre TSH-Bindung am Rezeptor beeinflussen (*Kosugi et al. 1992, Kosugi et al. 1993, Kosugi et al. 1994a*).

Die notwendigen Modifikationen zur Einführung der Markerpeptide wurden am intrazellulären C-Terminus der TSH-Rezeptorsequenz vorgenommen. Diese endständige Rezeptordomäne scheint für die Hormonbindung eine vernachlässigbare Rolle zu spielen, da selbst zwei Drittel seiner Länge ohne Einfluss auf die TSH-Bindung entfernt werden können (*Chazenbalk et al. 1990 [749]*).

4.2.2 TSH-Bindung der FLAG- und HA-TSH-

Rezeptorkonstrukte im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor

Die im Experiment ermittelten TSH-Bindungseigenschaften der mit Rezeptorkonstrukten transfizierten Zellen stimmten weitestgehend mit der Charakteristik überein, die für die Bindung von TSH an den TSH-Rezeptor in nativem, humanem Schilddrüsengewebe erhoben wurde (z.B. *Powell-Jones et al. 1980*). Vergleichbare Ergebnisse wurden mit verschiedenen eukaryoten Zellinien erzielt, in denen rekombinante TSH-Rezeptorkonstrukte exprimiert wurden (*Perret et al. 1990 [762]* - humaner TSHR in CHO-Zellen, *Akamizu et al. 1990 [776]* - Ratten-TSHR in Cos-7-Zellen).

Das hier als Positivkontrolle eingesetzte Wildtyp-TSH-Rezeptorkonstrukt wurde von Mitarbeitern des Instituts für Hormon- und Fortpflanzungsforschung bereits in verschiedenen eukaryoten Zellsystemen exprimiert. Die TSH-Bindung dieser Zellen wurde ausführlich charakterisiert und direkt mit der von menschlichen Schilddrüsen-Homogenaten verglichen (*Willey et al. 1993 [482]*).

Die Peptidsequenzen für die FLAG- bzw. HA-Epitope beeinflussten die Bindungseigenschaften der modifizierten Rezeptorkonstrukte so wenig, dass in den durchgeführten Bindungsstudien keine wesentlichen Unterschiede zwischen modifizierten Rezeptorkonstrukten und dem Wildtyp-Rezeptor gefunden werden konnten.

Zusammenfassend weisen die erzielten Ergebnisse darauf hin, dass die C-terminale Markierung des TSH-Rezeptors keinen Einfluss auf die Bindungseigenschaften des Rezeptors für seinen Liganden TSH besitzt. Die markierten TSH-Rezeptorkonstrukte und die erzeugten Zellinien sollten sich ohne Einschränkungen für weiterführende Studien zum Mechanismus der TSH-Bindung an den Rezeptor eignen.

4.3 Signaltransduktion der FLAG- und HA-TSH-Rezeptorkonstrukte

Nachdem die TSH-Bindung an die markierten Rezeptorkonstrukte ungestört erfolgte, wurde der Einfluss der Rezeptormodifikation auf die cAMP-Signalkaskade untersucht. Auch hier sollen zur Vermeidung von Wiederholungen die Ergebnisse der transienten Expression in Cos-7-Zellen mit denen der stabilen Expression in Hela-Zellen gemeinsam diskutiert werden.

4.3.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Der TSH-Rezeptor gehört mit den anderen Glykoproteinhormon-Rezeptoren (FSH-R, LH/CG-R) in die große Gruppe von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Übersicht bei *Strader et al. 1994*). Diese Rezeptoren vermitteln ihre biologische Wirkung über die Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden mittels sogenannter G-Proteine.

G-Proteine sind trimere Proteine aus den Untereinheiten α , β und γ . Aufgrund von Sequenzhomologien werden vier Familien unterschieden (G_s, G_q, G_i und G₁₂). Bei der Aktivierung von G-Proteinen wird ein an die α -Untereinheit gebundenes Molekül Guanosindiphosphat (GDP) durch Guanosintriphosphat (GTP) ersetzt. Die GTPtragende α -Untereinheit dissoziiert daraufhin von der $\beta\gamma$ -Untereinheit und aktiviert in Abhängigkeit von ihrer Spezifität nachgeordnete Signalkaskaden. Im Fall des cAMP-Signalwegs aktiviert die α -Untereinheit eines G-Proteins der G_s-Proteinfamilie das Enzym Adenylatcyclase, welches die Bildung des second-messengers cyclo-Adenosinmonophosphat (cAMP) katalysiert. α -Untereinheiten der G_q-Proteinfamilie aktivieren die Phospholipase C, die die Bildung von Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) katalysiert. IP₃ mediiert den Einstrom von Ca²⁺-Ionen aus intrazellulären Speichern und dem Extrazellulärraum, DAG aktiviert die Proteinkinase C. Inhibitorische Wirkungen auf die cAMP-Signalkaskade werden von G-Proteinen der Familie G_i vermittelt, andere G-Proteine sind z.B. in der Lage, Ionenkanäle zu beeinflussen.

Das durch die Rezeptoraktivierung erzeugte intrazelluläre Signal wird durch die potentielle Übertragung auf mehrere G-Proteine und zusätzlich durch mehrfache Aktivierungen nachgeordneter Systeme durch ein einzelnes aktiviertes G-Protein kaskadenartig verstärkt. Nach kurzer Zeit vermittelt die α -Untereinheit der G-Proteine eine enzymatische Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP, wodurch die Aktivierung beendet wird. Die freie α -Untereinheit verbindet sich wieder mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit, wodurch das G-Protein für einen erneuten Aktivierungszyklus bereitsteht (Übersicht bei *Hepler et al. 1992*).

4.3.2 TSH-Rezeptor und cAMP-Signalkaskade

Für den TSH-Rezeptor sind Bindungen an G-Proteine aus allen Untergruppen beschrieben worden (*Laugwitz et al. 1996*). Bei physiologischen TSH-Konzentrationen überwiegt die Aktivierung der cAMP-Signalkaskade. Unphysiologisch hohe Konzentrationen von TSH führen zu einer Stimulation des Phospholipase-Signalwegs (*Laurent et al. 1987*), der nach Meinung einiger Autoren in vivo ebenfalls physiologische Teilfunktionen beeinflusst (Übersicht bei *Vassart et al. 1992*).

Die überragende physiologische Bedeutung im Schilddrüsenstoffwechsel wird jedoch dem cAMP-Signalweg beigemessen (Übersicht bei *Vassart et al. 1992* und *Kohn et al. 1995*). Die Aktivierung der Adenylatcyclase nach TSH-Bindung an den Rezeptor erfolgt über ein G-Protein der G_s-Gruppe. Beispielhaft lässt sich die Bedeutung dieses Signalwegs in der Schilddrüsenphysiologie anhand von Krankheitssyndromen aufzeigen,

bei denen dieser pathologisch verändert ist. Zu nennen ist zum einen die Hypothyreose von Patienten mit hereditärer Osteodystrophie (Albright-Syndrom, bestimmte Formen des Pseudohypoparathyreoidismus), sowie andererseits eine Hyperthyreose, die bei Patienten mit McCune-Albright-Syndrom (fibröse Dysplasie mit endokriner Stoffwechselstörung) gefunden wird. Den für die Schilddrüse beschriebenen Auswirkungen beider Erkrankungen liegt eine Funktionsstörung von mutierten G-Proteinen im Gesamtorganismus zugrunde. Im ersten Fall handelt es sich um eine G-Protein-vermittelte, pathologische Aktivitätsverminderung der cAMP-Kaskade (*Levine et al. 1988*), im zweiten Fall um eine pathologisch gesteigerte Aktivität (*Weinstein et al. 1991*).

4.3.3 Signalübertragung über intrazelluläre Rezeptoranteile

Umfangreiche Mutations- und Deletionsstudien ergaben, dass das die Adenylatcyclase aktivierende G-Protein der G_s-Familie hauptsächlich mit der zweiten und dritten intrazellulären Schleife der TSH-Rezeptor-Transmembrandomäne interagierten (Übersicht bei Kohn et al. 1995). Auch bei anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren vermitteln diese Regionen die Aktivierung der cAMP-Signalkaskade (Strader et al. 1994), z.B. beim ß-Adrenozeptor, der im Vergleich zum TSH-Rezeptor einen sehr kurzen C-terminalen "Schwanz" besitzt. Die Aminosäuren in unmittelbarer Nachbarschaft der Markerpeptide FLAG und HA besitzen für die Aktivierung der cAMP-Signalkaskade anscheinend keine Bedeutung, da auch eine Deletion von zwei Dritteln des intrazellulären Rezeptor-"Schwanzes" keine Änderung der Signalübertragung bewirkt (Chazenbalk et al. 1990). Für den membrannahen Anteil dieses "Schwanzes" konnte ebenfalls keine Bedeutung für die Aktivierung der cAMP-Signalkaskade gefunden werden, diese Region soll jedoch an der Aktivierung des IP₃-Signalwegs beteiligt sein (Kosugi et al. 1994c, Kosugi et al. 1994b). Bei einem Teil von Patienten mit autonomen Schilddrüsen-Adenomen konnten Mutationen im C-terminalen Anteil des TSH-Rezeptors identifiziert werden, die mit Veränderungen der Signaltransduktion einhergingen. Keine dieser Mutationen involviert jedoch den C-terminalen Rezeptor-"Schwanz" (van Sande et al. 1995).

In dieser Arbeit wurde im Kulturmedium von mit dem Wildtyp-TSH-Rezeptor und mit den markierten TSH-Rezeptorkonstrukten transfizierten Cos-7- und Hela-Zellen nach Stimulation mit TSH eine gesteigerte Freisetzung von cAMP gemessen. Dies wird auf eine physiologische Aktivierung der cAMP-Signalkaskade durch Ligandenbindung an den TSH-Rezeptor zurückgeführt. Für den Wildtyp-TSH-Rezeptor und die markierten TSH-Rezeptorkonstrukte wurden qualitativ und - mit methodisch bedingten Einschränkungen - quantitativ vergleichbare Messwerte ermittelt. Der "Einbau" von Markerpeptiden am unmittelbaren C-Terminus des Moleküls beeinflusste also nicht nachweisbar die Interaktion von intrazellulären Anteilen des Rezeptors mit signalübertragenden G_s -Proteinen.

4.3.4 Ligandenunabhängige Aktivierung der cAMP-Signalkaskade

Ein konzeptionell interessanter, eine Vielzahl von Rezeptoren betreffender Befund ist eine basale "Eigenaktivität" von Rezeptormolekülen, d.h., die rezeptorabhängigen Signalkaskaden werden zu einem gewissen Teil auch ohne Bindung von Liganden aktiviert (konstitutionelle Aktivierung). Nach einem Modell von Samama (*Samama et al. 1993*) wird diese konstitutionelle Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren ohne Ligand unterschiedlich stark unterdrückt (engl. constraint), erst durch Bindung des Liganden wird der Rezeptor vollständig aktiviert.

Dem TSH-Rezeptor wird wie vielen anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren eine konstitutionelle Aktivität zugeschrieben (*Parma et al. 1993; Kosugi et al. 1993; Duprez et al. 1994*). Beim TSH-Rezeptor ist nach dem genannten Modell die Unterdrückung von Rezeptorsignalen ohne Bindung des Hormons relativ schwach ausgeprägt, so dass eine basale Daueraktivität des Rezeptors resultiert ("noisy receptor"). Physiologisch sinnvoll wäre dieses Verhalten für die Glykoproteinhormonrezeptoren insofern, als durch sie im wesentlichen trophische, langanhaltende Effekte auf die Zielorgane vermittelt werden.

Man nimmt an, dass minimale Störungen der Rezeptorstruktur eine weitere Zunahme der basalen Aktivität bewirken können, wodurch sich u.a. die überraschende Vielzahl gefundener aktivierender TSH-Rezeptor-Mutationen erklären ließe (Tonacchera et al. 1996). Eine Interpretation der in dieser Arbeit erhobenen Befunde in dieser Hinsicht ist aufgrund des gewählten Messprinzips nur mit allergrößter Zurückhaltung sinnvoll. Das verwendete Messverfahren zum Nachweis einer Aktivierung der cAMP-Signalkaskade nahm bewusst gewisse Vergröberungen zugunsten von Einfachheit und effizienter Durchführung in Kauf. Die Messung von gebildetem cAMP erfolgte aus dem Kulturmedium (Überstand) nach Akkumulation des aus den Zellen freigesetzten cAMP, dessen Abbau durch Zugabe eines Phosphodiesterase-Hemmers verhindert wurde. Über 6 bzw. 24 Stunden wurden so leicht messbare, hohe cAMP-Spiegel erzeugt - im Inneren der Zellen erfolgt eine massive Steigerung der cAMP-Konzentration innerhalb weniger Minuten nach Stimulation mit TSH, ein Steady-State ist in mit dem TSH-Rezeptor transfizierten CHO-Zellen nach zwei Stunden erreicht (Perret et al. 1990). Die in dieser Arbeit pro Experiment eingesetzte Zellzahl wurde kontrolliert, hinsichtlich der genauen Anzahl von Rezeptormolekülen wurden jedoch Ungenauigkeiten in Kauf genommen (z.B. Transfektionseffizienz, Anzahl von Rezeptoren pro Zelle).

Die Ergebnisse für transient transfizierte Cos-7-Zellen zeigten in Abwesenheit von TSH für die mit TSH-Rezeptorkonstrukten (Wildtyp-TSHR, FLAG-TSHR, HA-TSHR) transfizierten, mit Vektor transfizierten und für untransfizierte Zellen keinen messbaren Unterschied der cAMP-Konzentration im Kulturmedium. Mit stabil transfizierten Hela-Zellen ließ sich jedoch auch in Abwesenheit von TSH eine deutlich höhere cAMP-Konzentration im Kulturmedium von mit Rezeptorkonstrukten transfizierten Zellen nachweisen. Wenn auch mit Vorsicht zu bewerten, enthält dieser Befund bestätigende Hinweise für eine basale Eigenaktivität des Wildtyp- sowie auch der markierten TSH-Rezeptoren.

Zusammenfassend bestätigten die erhobenen Daten, dass die TSH-abhängige und möglicherweise auch -unabhängige Aktivierung der cAMP-Signalkaskade durch die markierten TSH-Rezeptorkonstrukte in jeder Hinsicht mit der des Wildtyp-Rezeptors vergleichbar ist. Die markierten Rezeptorkonstrukte und die sie stabil exprimierenden Hela-Zellinien sollten sich ohne Einschränkung für nähere Untersuchungen der cAMP-Signalkativierung des TSH-Rezeptors eignen. Ob auch die Aktivität anderer rezeptorabhängiger Signalkaskaden, z.B. des DAG/IP₃-Signalwegs, durch die Markerpeptide unbeeinflusst bleibt, muss noch untersucht werden. Nach genauer Standardisierung könnten die erzeugten Hela-Zellinien auch für klinische Fragestellungen eingesetzt werden, wie dies als cAMP-Bioassay zum Nachweis von TSH-Aktivitäten mit anderen Zellinien (CHO-Zellen, chinesische Hamster Ovarienzellen) bereits geschehen ist (*Persani et al. 1993*), ähnliches gilt für Nachweis von Thyroidea-stimulierenden Antikörpern in Seren von Schilddrüsenpatienten. Möglicherweise lässt sich wegen des menschlichen Ursprungs sogar eine Überlegenheit der in dieser Arbeit erzeugten Zellinien demonstrieren.

4.4 Immunologischer Nachweis und Strukturaufklärung der markierten TSH-Rezeptoren

Vor Aufklärung der cDNA-Sequenz des TSH-Rezeptormoleküls existierten über die Eigenschaften von TSH-Bindungsstellen auf Thyreozyten kontroverse Ansichten. In Ermangelung geeigneter Antikörper wurden mittels verschiedener anderer proteinbiochemischer Methoden wie TSH-Crosslinking, Affinitätsreinigung, Präzipitation mit Seren von M. Basedow-Patienten u.a. Aggregate präpariert. Die Angaben zu möglichen Untereinheiten dieser Komplexe schwankten zwischen eins und drei, für die Molekulargewichte wurden Werte zwischen 30 und 500 kDa gefunden. Die Untersuchung des TSH-Rezeptormoleküls wurde durch die geringe Anzahl von einzelnen Rezeptoren auf den Thyreozyten (nur einige Tausend pro Zelle, *Rees-Smith et al. 1988, Furmaniak et al. 1990*) und die Fragilität des Moleküls bei der Aufreinigung zusätzlich kompliziert.

Die Aufklärung der cDNA-Sequenz erlaubte für den TSH-Rezeptor die Angabe einer theoretisch zu erwartenden Molekülgröße von ca. 84 kDa (*Libert et al. 1989, Nagayama et al. 1989, Misrahi et al. 1990, Parmentier et al. 1989, Akamizu et al. 1990, Libert et al. 1990a*). Auch nach Aufklärung der Primärstruktur des TSH-Rezeptors und der damit möglichen Expression und Untersuchung als rekombinantes Protein werden mittels immunologischer und anderer proteinbiochemischer Verfahren eine Vielzahl von Expressionsprodukten detektiert, deren Struktur und biologische Relevanz noch kontrovers diskutiert wird.

Es erscheint sinnvoll, die angesprochenen und zum Teil auch in dieser Arbeit nachgewiesenen Strukturen in drei Gruppen einzuteilen: in einer ersten Gruppe Expressionsprodukte mit einem Molekulargewicht von 95 - 120 kDa, die nach allgemeiner Auffassung einer funktionellen, glykosylierten, membranständigen TSH-Rezeptor-Einzelkette entsprechen; in einer zweiten Gruppe höhermolekulare Expressionsprodukte, die Komplexen aus mehreren Einzelmolekülen entsprechen könnten; und in einer dritten Gruppe Expressionsprodukte mit einem geringeren Molekulargewicht zwischen 30 und 60 kDa, die mögliche proteolytische Untereinheiten oder auch artifizielle Spaltprodukte des Holorezeptors darstellen.

4.4.1 Expressionsprodukte zwischen 95 kDa und 120 kDa

Kurz nach Beschreibung der TSH-Rezeptor-Primärstruktur anhand der aufgeklärten cDNA-Sequenz konnte ein Produkt mit der vorhergesagten Molekülgröße von etwa 84 kDa in vitro aus einer solchen cDNA translatiert werden (*Akamizu et al. 1990*). Da jedoch schon vor der Klonierung der cDNA bekannt war, dass es sich beim TSH-Rezeptor um ein Glykoprotein handelt (*Tate et al. 1975, Kress et al. 1986*), konnte für das Expressionsprodukt eukaryoter Zellen ein noch höheres Molekülgewicht durch posttranslationelle Glykosylierung an einigen oder allen sechs potentiellen N-Glykosylierungsstellen der extrazellulären Domäne vorhergesehen werden.

Bei der transienten Expression der FLAG- und HA-TSH-Rezeptor-cDNA in Cos-7-Zellen wurde in dieser Arbeit ein ca. 100 kDa großes Expressionsprodukt dargestellt.

Arbeitsgruppen, die Anfang der neunziger Jahre nach Beschreibung der Primärsequenz sowohl Ratten- als auch humane TSH-Rezeptor-cDNA in Cos-7-Zellen exprimierten, erhielten ebenfalls ein Molekül dieser Größe (*Ban et al. 1992, Akamizu et al. 1993, Grossman et al. 1995*, unabhängig davon *Gu et al. 1995*). Eine einzelne Bande dieser Größe wurde auch bei der Expression von rekombinantem TSH-Rezeptor in CHO-Zellen nachgewiesen (*Russo et al. 1991b*), außerdem konnte diese Rezeptorform in der von Ratten-Schilddrüsenfollikeln ausgehenden FRTL-5-Zellinie (*Ambesi-Impiombato et al. 1980*) und in humanen Schilddrüsen-Membranen gezeigt werden (*Ban et al. 1995*).

Bei dieser Form scheint es sich um einen membranständigen, funktionellen TSH-Rezeptor zu handeln, denn ein Fehlen dieser Bande bei Expression von mutierten TSH-Rezeptor-Varianten in Cos-7-Zellen ging mit dem Verlust der TSH-Bindung und cAMP-Signalaktivierung einher (*Ban et al. 1992*). Die Molekülgröße des Rezeptors entspricht dem aus der Primärstruktur vorausgesagten Protein-Kern zuzüglich etwa 14 kDa Glykosylierung (*Akamizu et al. 1990, Kosugi et al. 1991*).

Bei Expression der FLAG- bzw. HA-TSH-Rezeptorkonstrukte in stabil transfizierten Hela-Zellen kamen im angesprochenen Molekulargewichtsbereich zwei isolierte Formen des Rezeptormoleküls zur Darstellung: eine Form migrierte bei ca. 95 kDa, eine weitere Form bei ca. 120 kDa.

Diese beiden Formen wurden auch bei der Expression von rekombinanten TSH-Rezeptorkonstrukten in murinen L-Zellen (*Misrahi et al. 1994*) und in humanen embryonalen Nierenzellen (human embryonal kidney, HEK-cells) beschrieben (*Tanaka et al. 1996*). Die Struktur dieser Banden konnte durch Untersuchungen des zeitlichen Auftretens ihrer Expression weiter aufgeklärt werden. In Pulse-Chase-Experimenten mit radioaktiv markierten Aminosäuren konnte gezeigt werden, dass die 95 kDa schwere Form bereits wenige Minuten nach Zugabe der markierten Aminosäure-Bausteine vorliegt. Nach Ablauf von 4-6 Stunden tritt die 120 kDa Form hinzu, bis nach 8 Stunden der 95 kDa-Rezeptor fast vollständig durch die schwere Form ersetzt wird (*Misrahi et al. 1994*, *Tanaka et al. 1996*).

Die experimentelle Untersuchung des Glykosidanteils dieser beiden Rezeptorformen erbrachte weitere Aufklärung. Zu diesem Zweck können Rezeptorpräparationen vor der Auftrennung in der SDS-PAGE mit verschiedenen Glykosidasen behandelt werden: N-Glykosidase F spaltet alle N-glykosidisch gebundenen Zuckern, Endoglykosidase H katalysiert die Abtrennung von mannosereichen Zuckerseitenketten, wie sie bei der posttranslationellen Glyskosylierung als Intermediärprodukte auftreten.

Bei Behandlung immunpräzipitierter FLAG- und HA-TSH-Rezeptoren mit N-Glykosidase F wurden beide Rezeptorformen (95 und 120 kDa) auf eine ca. 84 kDa große Einzelbande reduziert - diese Größe entspricht wie erwähnt dem Proteinkern des TSH-Rezeptors.

Bei Behandlung mit Endoglykosidase H ließ sich ausschließlich die 95 kDa-Form auf 84 kDa zurückführen, während sich der 120 kDa-Rezeptor als Endoglykosidase H-resistent erwies (*Misrahi et al. 1994*). Endoglykosidase H spaltet Mannose-reiche Zuckerseitenketten von Glykoproteinen, wie sie als Intermediate bei der Glykosylierung von Membranproteinen entstehen. Nur die 120 kDa-Form ließ sich durch Neuraminidase in ihrer Größe reduzieren, wodurch ein hoher Sialinsäureanteil dieser Form angezeigt wird (*Misrahi et al. 1994*). Diese Beobachtungen konnten durch die Untersuchung der Glykosylierungsvarianten des Rezeptors mit Lektinen bestätigt werden (*Sanders et al. 1997*).

Zusammengefasst ergeben diese Beobachtungen folgendes Bild: Bei der Expression der FLAG- und HA-markierten TSH-Rezeptor-cDNA entsteht in Cos-7-Zellen ein Hauptprodukt von ca. 100 kDa. In Hela-Zellen werden zwei Hauptprodukte von 95 kDa und 120 kDa gebildet. Diese Formen entsprechen nach derzeitiger Erkenntnis einzelkettigen, glykosylierten TSH-Rezeptorformen. Bei der 95 kDa-Form handelt es sich scheinbar um ein mannosereiches, intermediäres Translationsprodukt der TSH-Rezeptor-cDNA. Auf dem Weg durch endoplasmatisches Reticulum und Golgi-Apparat maturiert diese Vorläuferstufe durch den Ersatz der Mannose-reichen durch komplexe Zuckerseitenketten. Das komplex glykosylierte 120 kDa-Molekül stellt den reifen, membranständigen, zur hochaffinen Bindung von TSH befähigten Rezeptor dar.

4.4.2 Hochmolekulare Expressionsprodukte

Bei der Expression der rekombinanten TSH-Rezeptorkonstrukte in Cos-7- und Hela-Zellen wurden, insbesondere nach Immunpräzipitation des Gesamtproteins mit anti-FLAG bzw. anti-HA-Antikörper, neben den Rezeptor-Einzelketten Antigene detektiert, deren Wanderungsverhalten in der SDS-PAGE Molekülgrößen um 200 kDa und höher entsprach. Die Zuordnung dieser Expressionsprodukte erwies sich zunächst als schwierig, da deren Molekulargewicht eindeutig die für Expressionsprodukte der verwendeten FLAG- und HA-TSH-Rezeptor-cDNA erwartete Größenordnung verließ (84 kDa Proteinkern zuzüglich Glykosylierung). Aus noch aufzuzeigenden Gründen wurden diese Banden als "Komplex 1" und "Komplex 2" bezeichnet. Grundsätzlich musste natürlich erwogen werden, dass es sich bei den dargestellten Banden um nur in dieser Arbeit nachgewiesene Artefakte handelt, deren Auftreten z.B. durch experimentelle Unzulänglichkeiten erklärt werden müsste. Hochmolekulare Banden traten jedoch bei der Western Blot-Analyse von rekombinantem und nativem TSH-Rezeptor auch bei anderen Autoren auf, blieben jedoch zum Teil unbesprochen (z.B. bei *Chazenbalk et al. 1996a*). Der wiederholte und konsistente Nachweis solcher hochmolekularen Banden in dieser Arbeit sollte allerdings nähere Betrachtungen im Rahmen dieser Diskussion rechtfertigen.

Zunächst werden einige Arbeiten aufgeführt, deren Autoren TSH-Rezeptor-Antigen oberhalb des erwarteten Molekulargewichtsbereichs nachweisen konnten.

Bei einer Untersuchung der TSH-Rezeptor-Expression in humanen Schilddrüsentumoren wurde ein einzelnes Antigen im Bereich von 150 kDa detektiert (Pötter et al. 1994). Zwei hochmolekulare Banden, deren Größe mit den in dieser Arbeit beschriebenen vereinbar ist, traten bei der Expression von TSH-Rezeptor-cDNA in stabil transfizierten CHO-Zellen auf (Harfst et al. 1994). In Proteinlysaten von FRTL5-Zellen (immortalisierte Rattenschilddrüsen-Zellinie) und von transient mit einer Wildtyp-TSH-Rezeptor-cDNA transfizierten Cos-7-Zellen wurden mit einem polyklonalen Antiserum gegen ein lineares Peptid aus der extrazellulären Domäne des TSH-Rezeptors (Aminosäuren 352-366) zwei hochmolekulare Antigene detektiert (Ban et al. 1992). Deren Größe, die die Autoren mit 180 bzw. 230 kDa angaben, entspricht unter Berücksichtigung einer gewissen Ungenauigkeit im Laufverhalten von sehr großen, glykosylierten Membranproteinen gut den in dieser Arbeit dargestellten Banden. Die Autoren vermuteten, dass diese Banden durch Überexpression des Antigens im verwendeten Expressionssystem zustande kamen. Dieser Interpretation widerspricht, dass solche hochmolekularen Banden in FRTL-5-Zellen (s.o.) und, mittels Immunpräzipitation, auch aus humanem Schilddrüsengewebe isoliert wurden (Grossman et al. 1995).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit den FLAG- und HA-markierten TSH-Rezeptorkonstrukten ermöglichten eine Beobachtung des Verhaltens der hochmolekularen Banden unter verschiedenen Versuchsbedingungen, wodurch über die Beschreibung ihres Auftretens hinaus gewisse Rückschlüsse auf das Zustandekommen und die Zusammensetzung dieser Antigene möglich wurde.

Zunächst wurde die Frage aufgeworfen, ob es sich bei diesen Formen um einzelne TSH-Rezeptor-Moleküle handeln konnte, die durch eine posttranslationelle Modifikation (z.B. Glykosylierung) ein in den Bereich von sehr viel größeren Molekülen verschobenes Laufverhalten in der SDS-PAGE aufwiesen. Die Deglykosylierung von Immunpräzipitaten der FLAG- und HA-TSH-Rezeptormoleküle ließ diese Hypothese zumindest für die posttranslationelle N-Glykosylierung unwahrscheinlich erscheinen: beide hochmolekularen Formen wiesen nach Deglykosylierung vom Laufverhalten in der SDS-PAGE ein reduziertes Molekulargewicht auf. Jedoch wurde das Molekulargewicht nicht auf das eines einzelnen, nicht-glykosylierten TSH-Rezeptorproteins (84 kDa) reduziert, vielmehr blieben zwei hochmolekulare Banden weit oberhalb 100 kDa erhalten. Ein etwas anderes Verhalten beobachtete die Arbeitsgruppe um Ban (*Ban et al. 1992*) für deren oben erwähnte hochmolekulare TSH-Rezeptor-Antigene (180 und 230 kDa), die sie nach Auftrennung verschiedener Membranfraktionen mittels Ultrazentrifugation in der Mikrosomen-Fraktion lokalisierten. Während die 180 kDa-Bande für die Deglykosylierung mit N-Glykosidase F empfindlich war, blieb das Wanderungsverhalten der größeren von beiden Banden unbeeinflusst. Die Deletion des vermuteten Signalpeptids (Aminosäuren 1-21 der Peptidkette) führte zum Verlust der 180 kDa-, nicht aber der 230 kDa-Bande. Die Autoren der genannten Arbeit zogen aus ihren Ergebnisse den Schluss, dass es sich bei diesen Antigenen um intermediäre Produkte in der Synthese eines einzelnen Rezeptorproteins handelt. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten widersprechen dieser Auffassung.

Ebenfalls in Betracht gezogen wurde die Möglichkeit, dass das Wanderungsverhalten von Proteinen in der SDS-PAGE durch andere posttranslationelle Modifikationen als N-Glykosylierung derart verändert werden kann, z.B. durch O-Glykosylierung oder auch Myrilistierung (*Goldstein et al. 1985*). Die Möglichkeit einer O-Glykosylierung des TSH-Rezeptormoleküls erschien allerdings ebenso wie die einer Myrilistierung unwahrscheinlich, da beide Modifikationen im funktionellen TSH-Rezeptor bisher nicht nachgewiesen wurden.

Beide in der vorliegenden Arbeit beschriebenen hochmolekularen Formen wurden somit als N-Glykosid-haltige Komplexe aus mindestens einem markierten TSH-Rezeptorprotein und möglicherweise anderen Bestandteilen aufgefasst. Der Nachweis von FLAG-Antigen in den hochmolekularen Banden von mit anti-HA-Antikörper immunpräzipitiertem Antigen aus Cos-7-Zellen, die beide Rezeptorformen (FLAG- und HA-TSH-Rezeptor) koexprimierten, erlaubte schließlich die Schlussfolgerung, dass in diesen Komplexen mehrere TSH-Rezeptormoleküle vorlagen: mindestens ein HA-TSH-Rezeptor, der die Präzipitation des Komplexes mit dem anti-HA-Antikörper erlaubte, und mindestens ein FLAG-TSH-Rezeptor als Antigen zur Detektion des Komplexes auf dem Western Blot mit anti-FLAG-Antikörper. Das komplementäre Experiment mit jeweils vertauschten Antikörpern für Immunpräzipitation und Western Blot-Detektion bestätigte diese Vermutung.

Eine noch nähere Charakterisierung der Zusammensetzung dieser Komplexe lassen die bisher gewonnenen Erkenntnisse nicht zu, weitere Experimente sind notwendig. Einige Vermutungen sollen jedoch angestellt werden. Gegen die Auffassung, dass es sich bei Komplex 1 um ein Dimer aus zwei 95 kDa-Rezeptoren und bei Komplex 2 um ein Dimer aus zwei 120 kDa-Rezeptoren handelt, spricht, dass auch in Cos-7-Zellen beide Komplexe nachgewiesen wurden, obwohl in diesen Zellen nur der Nachweis einer einzelnen 100 kDa-Bande für den TSH-Rezeptor gelang. Möglich erscheint dagegen trotz der in den oberen Bereichen eines SDS-PAGE-Gels sehr ungenauen Auflösung der Molekulargewichte, dass es sich z.B. um Di- bzw. Trimere eines einzelnen Rezeptormoleküls handelt. In diesem Sinne äußerten sich z.B. die Autoren einer Arbeit über den porcinen TSH-Rezeptor. Sie isolierten aus Schweine-Schilddrüsenmembranen hochmolekulare Antigene (160-210 kDa), die sie als Rezeptor-Dimere charakterisierten (*Graves et al. 1996*).

Für das Zustandekommen und die relative Widerstandsfähigkeit solcher Komplexe gegen thermische und chemische Denaturierung (Detergentien, Reduktionsmittel) müssen keine kovalenten Bindungen angenommen werden: vielmehr wurden nicht-kovalente, assoziative Protein-Protein-Wechselwirkungen beschrieben, die der Auflösung durch Detergentien widerstehen können (*Pelham 1989*).

Aus der Physiologie von Rezeptoren ist bekannt, dass bestimmte Rezeptormoleküle in der Zellmembran als Aggregate aus mehreren Einzelmolekülen vorliegen, oder aber erst durch Aggregation, z.B. über einen gemeinsam von mehreren Rezeptormolekülen gebundenen Liganden, aktiviert werden. Für den TSH-Rezeptor wird derzeit eine Aktivierung einzeln vorliegender Rezeptormoleküle durch einzelne Liganden angenommen, gute experimentelle Daten zur Stützung dieser Hypothese liegen jedoch nicht vor. Es ist durchaus denkbar, dass auch TSH-Rezeptoren zur Erfüllung ihrer physiologischen Aufgabe in irgendeiner Form in der Zellmembran interagieren. Zur Aufklärung dieser Frage bieten sich z.B. Cross-Linking-Studien an, bei denen TSH kovalent an FLAG- oder HA-TSH-Rezeptoren gebunden wird.

In Betracht gezogen werden muss andererseits, dass es sich beim Nachweis der hochmolekularen Komplexe um präparationsbedingte Artefakte handelt. Insbesondere große, glykosylierte Membranproteine scheinen aufgrund ihrer verschiedenen hydrophoben und hydrophilen Anteile besonders zur Aggregation in wässrigen Lösungsmitteln zu neigen, wie in Arbeiten zur Aufreinigung von Membranproteinen beschrieben wird (*Guellaen et al. 1984*). Zur weiteren Bearbeitung dieser Fragestellung würde es sich anbieten, alternative Detergentien und Lösungsmittel einzusetzen.

Zusammenfassend legen die erhobenen Daten nahe, dass es sich bei den nachgewiesenen hochmolekularen Expressionsprodukten um Komplexe aus mehreren glykosylierten TSH-Rezeptormolekülen handelt. Über das Vorliegen hochmolekularer Rezeptorkomplexe in Schilddrüsen-Zellmembranen in vivo sind noch keine ausreichenden experimentellen Daten verfügbar. Andererseits können solche Aggregate als Artefakte bei der Präparation von glykosylierten Membranproteinen in wässrigen Lösungsmitteln auftreten. FLAG- und HA-markierte TSH-Rezeptormoleküle bieten sich an, um in weitergehenden Experimenten das Zustandekommen der hochmolekularen Rezeptorformen besser aufzuklären.

4.4.3 TSH-Rezeptor-Untereinheiten

Die Expression der FLAG- und HA-markierten TSH-Rezeptorkonstrukte in Cos-7- und in Hela-Zellen im Rahmen dieser Arbeit erbrachte überwiegend Hinweise auf ein Vorliegen des TSH-Rezeptormoleküls als glykosylierte Protein-Einzelkette mit einem Molekulargewicht von 95 bis 120 kDa. In verschiedenen Arbeiten wurden jedoch neben diesen Formen zusätzlich Antigene niedrigeren Molekulargewichts nachgewiesen. Diese Formen veranlassten manche Autoren dazu, eine physiologische Spaltung des TSH-Rezeptormoleküls in eine extrazelluläre α - und eine transmembranäre β -Untereinheit zu postulieren. Aufgrund der Lokalisation der Markerpeptide in der vorliegenden Arbeit entzogen sich eventuelle α -Untereinheiten dem Nachweis im Western Blot, da sie die zur Detektion verwendeten FLAG- und HA-Epitope am C-Terminus der Proteinkette nicht enthalten würden. Eine transmembranäre β -Untereinheit des Rezeptors sollte diese Markerpeptide jedoch enthalten und damit nachweisbar sein. Bei der Immunpräzipitation von markiertem TSH-Rezeptorprotein wurde tatsächlich ein niedermolekulares Antigen (ca. 40 kDa) nachgewiesen, welches sich als unempfindlich für die Deglykosylierung mittels N-Glykosidase F erwies. Aufgrund dieser Eigenschaften könnte dieses Antigen einer nichtglykosylierten, transmembranären β -Untereinheit des TSH-Rezeptors entsprechen. Ein Vergleich der Signalintensitäten der verschiedenen in dieser Arbeit nachgewiesenen TSH-Rezeptorformen legt jedoch nahe, dass eine mögliche β -Untereinheit nur einen geringen Anteil der nachweisbaren Immunreaktivität darstellt.

Bereits vor Aufklärung der Primärstruktur des TSH-Rezeptors wurde aus den Ergebnissen von Crosslinking-Studien mit I¹²⁵-markiertem TSH abgeleitet, dass der funktionelle TSH-Rezeptor als Dimer aus einer extrazellulären α - und einer transmembranären β -Untereinheit vorliegt (*Rees-Smith et al. 1987*). Ähnliche Studien mit rekombinant exprimierten TSH-Rezeptoren in CHO-Zellen stützten diese Annahme (*Chazenbalk et al. 1994*).

Mit Antikörpern gegen den extrazellulären Anteil des TSH-Rezeptors wurden sowohl in Schilddrüsenmembranen als auch bei der Expression von rekombinantem TSH-Rezeptor in verschiedenen eukaryoten Zellsystemen unter anderem ein ca. 54 kDa schweres Protein gefunden (*Ban et al. 1992, Grossman et al. 1995, Graves et al. 1996*), welches der extrazellulären α -Untereinheit entsprechen könnte.

Mit monoklonalen Antikörpern gegen den extrazellulären und den transmembranären Anteil des TSH-Rezeptors wurden in humanen Schilddrüsenmembranen zwei 53 kDa bzw. 33-42 kDa schwere Proteine detektiert (*Loosfelt et al. 1992*). Unter nicht-reduzierenden Bedingungen stellte sich mit beiden Antikörpern nur eine Bande bei 95 kDa dar. Die Autoren folgerten, dass die beiden Untereinheiten durch Disulfidbindungen verbunden würden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit widersprechen allerdings dieser Auffassung.

Verschiedene Autoren beobachteten in mit rekombinanter TSH-Rezeptor-cDNA transfizierten Zellen (*Endo et al. 1992, Ban et al. 1992, Harfst et al. 1994, Misrahi et al. 1994*), in Ratten-FRTL5-Zellen (*Furmaniak et al. 1987*) und auch in humanen Schilddrüsenmembranen (*Grossman et al. 1995*) ausschließlich ungespaltene, einkettige Moleküle. Sie argumentierten, dass die beobachtete Spaltung des Rezeptorproteins artifiziell bei der Aufbereitung von Membranen und der nachfolgenden Proteinpräparation zustande kommt (*Harfst et al. 1994, Endo et al. 1992*).

Allerdings konnte das Auftreten der niedermolekularen Rezeptor-Untereinheiten mittels Immunpräzipitation auch in schonend gewonnenen Proteinpräparationen belegt werden (*Chazenbalk et al. 1996a*). Eventuelle an einer Spaltung des TSH-Rezeptors beteiligten molekularen Vorgänge konnten darüber hinaus in jüngster Zeit charakterisiert werden. Die enzymatische Spaltung soll von einer Matrix-Metalloprotease katalysiert werden (*Couet et al. 1996b*) und findet wahrscheinlich nicht an einer, sondern an zwei Stellen nahe des Übergangs von der extrazellulären zur Transmembrandomäne statt (*Chazenbalk et al. 1997*). Die Spaltstellen sind noch nicht vollständig charakterisiert, das verlorengehende C-Peptid entspricht jedoch aller Voraussicht nach einer Region von etwa 50 Aminosäuren (317-362) (*Kakinuma et al. 1997*, *Tanaka et al. 1998*), die nur im TSH-Rezeptor vorkommt und keine Homologie zu den beiden anderen Glykoproteinhormonrezeptoren FSHR und LH/CGR aufweist - letztere werden nicht gespalten und liegen als einzelsträngige Moleküle vor.

Neuen Erkenntnissen zufolge kann die extrazelluläre α -Untereinheit des TSH-Rezeptors durch enzymatisches Lösen der Disulfidbrücken von der Verankerung in der Plasmamembran getrennt und in das umgebende Medium abgegeben werden ("shedding"), möglicherweise im Rahmen eines regulierten Prozesses (*Couet et al. 1996a*). Diese Besonderheit des TSH-Rezeptors könnte die Beobachtung eines löslichen Faktors in menschlichem Serum erklären, der TSH- (*Hunt et al. 1992*) und TSH-Rezeptor-Antikörper (*Murakami et al. 1992*) bindet. Allerdings könnte es sich bei diesem Faktor auch um lösliche Rezeptorvarianten handeln, die durch differentielles Splicing der Rezeptor-RNA zustande kommen (*Hunt et al. 1995*).

Es konnte gezeigt werden, dass die Spaltung des Rezeptors für die korrekte Lokalisation in der Plasmamembran und die TSH-Bindung nicht notwendig ist (*Chazenbalk et al. 1996b*). Derselbe Autor spekulierte, dass die Spaltung des Rezeptors ein der Hormonbindung nachgeordneter Vorgang ist und möglicherweise eine physiologische Degradation von Rezeptormolekülen darstellt. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Rezeptorstruktur vor und nach Bindung von TSH widersprechen allerdings dieser Auffassung.

Der relative Anteil gespaltener TSH-Rezeptormoleküle schwankt je nach Untersuchung. Während manche Autoren nur Einzelketten beobachten (s.o.), werden in anderen Arbeiten ausschließlich Untereinheiten nachgewiesen (*Chazenbalk et al. 1994*), dazwischen liegen Anteile von gering bis dominant (Übersicht bei *Chazenbalk et al. 1996b*).

Zur weiteren Klärung sollte die Methode zur Proteingewinnung modifiziert und eventuell eine Membranpräparation vorgenommen werden, um den Anteil an Rezeptor-Spaltprodukten zu erhöhen, da der Vorgang erst nahe der Plasmamembran stattfindet (*Couet et al. 1996b*). Bei Verwendung von Gesamtzell-Lysaten dominiert bei Überexpression des rekombinanten TSH-Rezeptors ein hoher Anteil von intrazellulären, einzelkettigen Rezeptorformen, die zu einem großen Teil nicht vollständig prozessiert werden und die Plasmamembran nicht erreichen (*Misrahi et al. 1994*), aber im Western Blot zur Darstellung gelangen. Nicht auszuschließen ist, dass die verwendeten Cos-7- und Hela-Zellen die benötigten Enzyme und Kofaktoren für eine Prozessierung des Rezeptors zu α - und β -Untereinheiten nicht oder nur in einem geringen Umfang besitzen und deshalb im Vergleich zu anderen Expressionssystemen und nativen Schilddrüsenzellen diesen Vorgang nicht nachvollziehen können.

4.5 Herstellung von Antiseren gegen Fusionsproteine mit konkatemerisierten FLAGund HA-Epitopen

Zum Zeitpunkt der hier durchgeführten Experimente musste die Technik des "Epitope tagging" als noch junge Technik bezeichnet werden. Die zur Durchführung von Experimenten mit markierten Molekülen notwendigen Antikörper, aber z.B. auch Peptidmoleküle für Kompetitionsexperimente, wurden nur von wenigen Herstellern zur Verfügung gestellt und waren dementsprechend sehr teuer. Beispielhaft hierfür gestaltete sich die Schwierigkeit, eine geeignete Alternative zu dem zunächst verwendeten anti-HA-Antikörper zu bekommen, nachdem dieser sich als ungeeignet erwies: schließlich konnte nach langem Suchen ein polyklonales anti-HA-Serum von einer kleinen Konkurrenzfirma bezogen werden.

Um für weitere Versuche mit den markierten TSH-Rezeptoren, aber auch für einen breiteren Einsatz der Markierungstechnik auf andere Moleküle im Labor von teuren Einkäufen unabhängig zu werden, wurde versucht, mit selbst hergestellten Antigenen Antikörper gegen die verwendeten Epitope zu generieren.

Das verwendete Prinzip eines Fusionsproteins aus einem Trägeranteil und mehreren konkatemerisierten Epitop-Peptiden versprach aus den im folgenden genannten Gründen Vorteile, beinhaltete aber möglicherweise einen entscheidenden Nachteil, auf den später noch eingegangen wird. Die nacheinander notwendigen Schritte zum "Zusammenbau" Leserasters mit den entsprechenden Sequenzinformationen eines in einem expressionsfähigen Vektorsystem erwiesen sich als unerwartet einfach und konnten ohne größere methodische Probleme abgearbeitet werden. Die Verwendung des eher hydrophoben Proteins Ketosteroidisomerase vereinfachte eine Grob-Abscheidung des exprimierten Fusionsproteins mit wasser-unlöslichen Bakterienproteinen. Als Immunogen wurde der Trägeranteil bei der Immunisierung nicht wesentlich wirksam, wie die fehlende Kreuzreaktivität der gewonnenen Immunseren untereinander (anti-FLAG-7mer- versus anti-HA-5mer-Fusionsprotein-Immunseren) zeigt.

Die an das Trägerprotein fusionierten Peptidkonkatemere erzeugten eine hohe Dichte des gewünschten Antigens auf einem für die Generierung einer Immunantwort vorteilhaft großen Molekül. Die Anwesenheit der FLAG- und HA-Antigene auf den Fusionsproteinen wurde durch den Nachweis mit kommerziell erhältlichen Antiseren dargestellt. Wie sich zeigen ließ, führte eine Immunisierung mit diesen Antigenen bereits nach wenigen Wochen zu einer zuverlässigen Immunantwort bei allen Tieren.

Auf die überragende Bedeutung des C-terminalen Hexahistidins (His-Tag) zur Aufreinigung großer Mengen Fusionsproteins in hoher Reinheit muss nicht näher eingegangen werden, sie erklärt sich durch die angewandte Vorgehensweise von selbst.

Leider erwies sich, dass die auf diesem Wege gewonnenen Antiseren zwar zuverlässig zwischen den zur Immunisierung eingesetzten Antigenen unterscheiden, in einem ersten Versuch mit einem anti-FLAG-7mer-Immunserum jedoch nicht ein einzelnes FLAG-Epitop am C-Terminus des TSH-Rezeptormoleküls detektieren konnten. Für eine endgültige Bewertung der erzeugten Immunseren ist es notwendig, dass zunächst alle Seren gegen möglichst rein vorliegendes Antigen, wie dies in Immunpräzipitaten von FLAG- bzw. HA-TSH-Rezeptorprotein der Fall ist, getestet werden. Für einen Vergleich mit den kommerziell erworbenen Antiseren müssten die erzeugten Immunseren überdies einer Affinitätsreinigung unterzogen werden, wie sie bei ersteren zur Gewährleistung einer spezifischen Anreicherung üblicherweise durchgeführt wird.

Sollten diese Maßnahmen keinen Erfolg erbringen, müsste das Vorliegen eines bereits erwähnten methodischen Problems erwogen werden. Die Anordnung des Immunogens zu Konkatemeren ergibt zwar eine hohe Ausbeute an exprimiertem Antigen und eine hohe Antigen-Dichte auf dem Trägermolekül. Es muss jedoch beachtet werden, dass bei der Prozessierung des Fusionsproteins zu niedermolekularen Immunogen-Partikeln (diese sind nur wenige Aminosäuren groß), wie dies bei der Erzeugung einer Immunantwort mittels Antikörpern geschieht, eine Zerlegung in andere als die gewünschten Epitope auftreten kann, ähnlich einer Verschiebung des Leserasters eines DNA-Moleküls, wie die Zeichnung verdeutlicht.

Mögliche Antikörperspezifitäten bei Immunisierung mit einem Fusionsprotein.



Abbildung 35

Als Immunantwort resultieren Antikörper, die sehr wohl das zur Immunisierung vorgegebene Antigen erkennen können, nicht aber ein einzelnes Markerpeptid (das gewünschte Epitop) in einer anderen Proteinumgebung. Dieses Problem ist ein generelles bei der Erzeugung von Antiseren gegen definierte Epitope: bei der ebenfalls schwierigen und (wie im Fall des TSH-Rezeptors) nicht immer erfolgreichen Generierung von Antiseren gegen Makromoleküle tritt es nicht auf, da es hierbei im Ergebnis nicht wichtig ist, welches Epitop letztendlich im immunisierten Organismus die Immunantwort auslöst. Grundsätzlich kann es sich dabei, wie in der Einleitung bereits erwähnt, um lineare oder konformationelle Epitope handeln, dies ist im einzelnen nicht vorhersagbar.

Die gute Detektion von denaturierten (d.h. linearisierten) Fusionsproteinen durch die erzeugten Antiseren macht das Vorliegen gegen konformationelle Epitope gerichteter Antikörper unwahrscheinlich. Um die Erzeugung von gewünschten anti-FLAG- bzw. anti-HA-Antikörpern in den immunisierten Organismen besser zu steuern, böte es sich an, von einem weiteren Vorteil der erzeugten Fusionsproteine Gebrauch zu machen: die

Kopplung der Markerpeptide im Fusionsprotein über die Aminosäure Methionin erlaubt mittels einer chemischen Reaktion die Aufspaltung der im Fusionsprotein konkatemerisierten FLAG- und HA-Peptide zu Einzelpeptiden (Näheres siehe im Literaturverzeichnis: pET System Manual). Ein verändertes Immunisierungsprotokoll zur Erzeugung von zuverlässigen anti-FLAG- und anti-HA-Antiseren würde dann die Immunisierung von Tieren mit den Einzelpeptiden oder, in zeitlicher Abfolge, mit dem Fusionsprotein und nachfolgend Einzelpeptiden enthalten.

Zusammenfassend ergibt sich, dass mit einer Kombination von PCRund Klonierungstechniken die Herstellung von Leserastern für Fusionsproteine mit Konkatemeren der linearen Epitope FLAG und HA gelang. Deren prokaryote Expression und nachfolgende Aufreinigung ergab große Mengen eines reinen Proteins, in dem das Vorliegen der konkatemerisierten Epitope durch deren Nachweis mit kommerziellen Antiseren aufgezeigt werden konnte. Durch Immunisierung von Ratten mit den genannten Fusionsproteinen wurden Immunseren gewonnen, die das zur Immunisierung verwendete Antigen zuverlässig detektieren konnten. Vorläufig gelang mit diesen Immunseren jedoch nicht der Nachweis des jeweiligen Epitops in anderen Proteinumgebungen. Wege zur Weiterentwicklung und Lösung dieses Problems wurden aufgezeigt. Ob diese Wege in Zukunft jedoch beschritten werden, muss aus praktischen Erwägungen angezweifelt werden, da der rasante Fortschritt der Biotechnologie in den wenigen zurückliegenden Jahren zu einem breiten Angebot von preiswerten Werkzeugen rund um die Technik des "Epitope tagging" geführt hat, die eine aufwendige Eigenentwicklung dieser Werkzeuge zunehmend weniger attraktiv erscheinen lassen.

5 Zusammenfassung

Mit Hilfe von molekularbiologischen Techniken wurde ein vollständiges cDNA-Leseraster des humanen Rezeptors für Thyroidea-stimulierendes Hormon (TSH, Thyrotropin) durch Anfügen von Basensequenzen so modifiziert, dass ein aus dieser cDNA exprimiertes TSH-Rezeptorprotein am intrazellulären, carboxyterminalen Ende der Aminosäurekette die Markerpeptide FLAG (synthetisches Peptid) bzw. HA (Influenza-Hämagglutinin) enthielt.

Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem TSH zeigten, dass die mit den Markerpeptiden modifizierten TSH-Rezeptoren ähnliche Bindungseigenschaften wie der Wildtyp-Rezeptor aufwiesen. Auch die Aktivierung der cAMP-Signalkaskade nach Stimulation mit TSH war vergleichbar mit der Wildtyp-Antwort, so dass die markierten Rezeptoren sich funktionell identisch zu einem transfizierten Wildtyp-TSH-Rezeptor verhielten.

Die Expression des markierten TSH-Rezeptormoleküls wurde durch Western Blot und Immunpräzipitation von Proteinlysaten transfizierter Zellen untersucht. Der Nachweis von Expressionsprodukten der modifizierten TSH-Rezeptor-cDNA gelang hochsensitiv und -spezifisch mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Antikörpern gegen das FLAGbzw. das HA-Epitop aus geringen Mengen Proteinlysat weniger Zellen. Bei der Expression in Cos-7-Zellen wurde ein Hauptprodukt bei ca. 100 kDa, in Hela-Zellen zwei Hauptprodukte bei 95 bzw. 120 kDa nachgewiesen, die verschiedenen Glykosylierungsvarianten des TSH-Rezeptors entsprechen. Diese Formen stellen wahrscheinlich den funktionellen, TSH-bindenden Holo-Rezeptor dar. Detektiert wurden daneben spezifische Expressionsprodukte bei 40 kDa und oberhalb 200 kDa, deren Struktur anhand eigener Ergebnisse und Daten aus der Literatur diskutiert wurde.

Durch Transfektion und Selektion wurden Hela-Zellinien etabliert, die die markierten TSH-Rezeptoren stabil exprimieren. Diese Zellinien können von großem Nutzen sein, um Hormon-Rezeptor- bzw. Autoantikörper-Rezeptor-Interaktionen zu untersuchen. So wurden diese Zellinien bereits erfolgreich zu Untersuchungen über die Biochemie der TSH-Bindung an den TSH-Rezeptor eingesetzt. Außerdem wurde die Technik des "Epitope tagging" von Mitarbeitern des Instituts für Hormonund Fortpflanzungsforschung auf andere Rezeptorproteine erweitert. Die Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen sind mittlerweile Teil einer Patentschrift (Deutsches Patentamt, Patentschrift DE 197 09 168 C1). Vielfältige weitere Anwendungen, z.B. die Verbesserung von cAMP-Bioassays zur Detektion von Thyreoidea-stimulierenden Faktoren in Seren von Basedow-Patienten, sind denkbar.

Um die erfolgreiche Arbeit mit den Markerpeptiden ausweiten zu können, wurde begonnen, die notwendigen Werkzeuge selbst zu entwickeln. Im Rahmen dieser Arbeit gelang die Expression eines Fusionsproteins, das mehrere konkatemerisierte FLAG- bzw. HA-Epitope enthält. Die direkte Herstellung von Antiseren der entsprechenden Spezifität mit Hilfe dieser Fusionsproteine misslang zwar, die notwendigen Schritte zu einer erfolgreichen Fortsetzung dieses Wegs wurden jedoch bereits skizziert. Ob der zu betreibende Aufwand jedoch angesichts sinkender Kosten für die Produkte kommerzieller Hersteller noch lohnenswert ist, muss vor der Durchführung weiterer Experimente überprüft werden.

Ergebnisse dieser Arbeit wurden auf dem 40. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie in Marburg (1996), dem Symposium "Recent advances in thyroid autoimmunity" in Leipzig (1996) und der Tagung "Molecular Aspects in the Pathogenesis and Diagnostics of Thyroid Diseases" der Sektion Schilddrüse der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (1996, *Hunt et al. 1996*) vorgestellt.

6 Literaturverzeichnis

- "BCA Protein Assay Reagent Instructions.", Pierce Inc.
- "Bio-Rad Protein Assay", Bio-Rad Inc.
- "ECL Western Blotting Protocols.", Amersham Life Sciences Inc.
- "Epitope Tagging: Basic Laboratory Methods.", Boehringer Mannheim
- "IBI FLAG Epitope", International Biotechnologies Inc.
- "pET System Manual", Novagen Inc.
- "pMOSBlue T-vector kit", Amersham Life Sciences Inc.
- Akamizu T., Ikuyama S. et al. (1990) "Cloning, chromosomal assignment, and regulation of the rat thyrotropin receptor: expression of the gene is regulated by thyrotropin, agents that increase cAMP levels, and thyroid autoantibodies." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87/15:5677-81
- Akamizu T., Inoue D. et al. (1993) "Chimeric studies of the extracellular domain of the rat thyrotropin (TSH) receptor: amino acids (268-304) in the TSH receptor are involved in ligand high affinity binding, but not in TSH receptor-specific signal transduction." *Endocrine Journal* 40/3:363-72
- Akamizu T., Kosugi S. et al. (1990) "Thyrotropin receptor processing and interaction with thyrotropin." *Biochemical and Biophysical Research Communication* 169/3:947-52
- Ambesi-Impiombato F.S., Parks L.A. et al. (1980) "Culture of hormone-dependent functional epithelial cells from rat thyroids." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77/6:3455-9
- Bahn R.S., Dutton C.M. et al. (1998) "Thyrotropin receptor expression in Graves' orbital adipose/connective tissues: potential autoantigen in Graves' ophthalmopathy" *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83/3:998-1002
- Baldwin J.M. (1994) "Structure and function of receptors coupled to G proteins" Current Opinion in Cell Biology 6/2:180-90
- Ban T., Kosugi S. et al. (1992) "Specific antibody to the thyrotropin receptor identifies multiple receptor forms in membranes of cells transfected with wild-type receptor complementary deoxyribonucleic acid: characterization of their relevance to receptor synthesis, processing, structure, and function." *Endocrinology 131/2:815-29*
- Boniface J.J. und Reichert L.E.J. (1990) "Evidence for a novel thioredoxin-like catalytic property of gonadotropic hormones" *Science* 247/4938:61-4
- Bray G.A. (1968) "Increased sensitivity of the thyroid in iodine-depleted rats to the goitrogenic effects of thyrotropin" *Journal of Clinical Investigation* 47/7:1640-7

- Chazenbalk G.D., Kakinuma A. et al. (1996a) "Evidence for negative cooperativity among human thyrotropin receptors overexpressed in mammalian cells." *Endocrinology* 137/11:4586-91
- Chazenbalk G.D., McLachlan S.M. et al. (1996b) "Is receptor cleavage into two subunits necessary for thyrotropin action?" *Biochemical and Biophysical Research Communication* 225/2:479-84
- Chazenbalk G.D., Nagayama Y. et al. (1990) "Functional analysis of the cytoplasmic domains of the human thyrotropin receptor by site-directed mutagenesis." *Journal of Biological Chemistry* 265/34:20970-5
- Chazenbalk G.D. und Rapoport B. (1994) "Cleavage of the thyrotropin receptor does not occur at a classical subtilisin-related proprotein convertase endoproteolytic site." *Journal of Biological Chemistry* 269/51:32209-13
- Chazenbalk G.D., Tanaka K. et al. (1997) "Evidence that the thyrotropin receptor ectodomain contains not one, but two, cleavage sites." *Endocrinology* 138/7:2893-9
- Chiovato L., Vitti P. et al. (1990) "Incidence of antibodies blocking thyrotropin effect in vitro in patients with euthyroid or hypothyroid autoimmune thyroiditis" *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 71/1:40-5
- Chung C.T., Niemela S.L. et al. (1989) "One-step preparation of competent Escherichia coli: Transformation and Storage of bacterial cells in the same solution." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:2172-5
- Couet J., de Bernard S. et al. (1996a) "Cell surface protein disulfide-isomerase is involved in the shedding of human thyrotropin receptor ectodomain." *Biochemistry 35/47:14800-5*
- Couet J., Sar S. et al. (1996b) "Shedding of human thyrotropin receptor ectodomain. Involvement of a matrix metalloprotease." *Journal of Biological Chemistry* 271/8:4545-52
- Cullen B.R. (1987) "Use of Eukaryotic Expression Technology in the Functional Analysis of Cloned Genes." *Methods in Enzymology* 152:684-704
- Darnell, Lodish et al (1990) "Molecular cell biology", Scientific American Books.
- Duprez L., Parma J. et al. (1994) "Germline mutations in the thyrotropin receptor gene cause non- autoimmune autosomal dominant hyperthyroidism." *Nature Genetics* 7/3:396-401
- Endo T., Ikeda M. et al. (1992) "Single subunit structure of the human thyrotropin receptor." *Biochemical and Biophysical Research Communication* 187/2:887-93
- Farid N.R., Shi Y. et al. (1994) "Molecular basis of thyroid cancer." *Endocrine Reviews* 15/2:202-32
- Felgner P.L., Gadek T.R. et al. (1987) "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84/21:7413-7

- Frazier A.L., Robbins L.S. et al. (1990) "Isolation of TSH and LH/CG receptor cDNAs from human thyroid: regulation by tissue specific splicing." *Molecular Endocrinology* 4/8:1264-76
- Furmaniak J., Hashim F.A. et al. (1987) "Photoaffinity labelling of the TSH receptor on FRTL5 cells." *FEBS Letters 215/2:316-22*
- Furmaniak J. und Smith B.R. (1990) "The structure of thyroid autoantigens." Autoimmunity 7/1:63-80
- Gey (1952) Cancer Research 12:264
- Gluzman Y. (1981) "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants" *Cell 23/1:175-82*
- Goldstein J.L., Brown M.S. et al. (1985) "Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system" *Annual Reviews in Cell Biology 1:1-39*
- Goretzki P., Simon D. et al. (1996) "Schilddrüsenmalignome"; In: "Praktische Endokrinologie"; Hrsg: Allolio, B. und Schulte, H.M.; Urban und Schwarzenberg
- Graves P.N., Vlase H. et al. (1996) "Multimeric complex formation by the thyrotropin receptor in solubilized thyroid membranes." *Endocrinology* 137/9:3915-20
- Green N., Alexander H. et al. (1982) "Immunogenic Structure of the Influenza Virus Hemagglutinin." *Cell* 28:477-87
- Gross B., Misrahi M. et al. (1991) "Composite structure of the human thyrotropin receptor gene." *Biochemical and Biophysical Research Communication* 177/2:679-87
- Grossman R.F., Ban T. et al. (1995) "Immunoprecipitation isolates multiple TSH receptor forms from human thyroid tissue." *Thyroid* 5/2:101-5
- Grußendorf M. (1996) "Hyperthyreose"; In: "Praktische Endokrinologie"; Hrsg: Allolio, B. und Schulte, H.M.; Urban und Schwarzenberg
- Gu W.X., Du G.G. et al. (1995) "The thyrotropin (TSH) receptor transmembrane domain mutation (Pro556- Leu) in the hypothyroid hyt/hyt mouse results in plasma membrane targeting but defective TSH binding." Endocrinology 136/7:3146-53
- Guellaen G., Goodhardt M. et al. (1984) In: "Receptor Purification Procedures.", S. 125-37.; Hrsg: Venter, J.C. und Harrison, L.C.; Alan R. Liss, New York
- Güssow D. und Clackson T. (1989) "Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction." *Nucleic Acids Research* 17/10:4000-
- Harfst E., Ross M.S. et al. (1994) "Production of antibodies to the human thyrotropin receptor and their use in characterising eukaryotically expressed functional receptor." *Molecular and Cellular Endocrinology* 102/1-2:77-84
- Hepler J.R. und Gilman A.G. (1992) "G proteins." *Trends in Biochemical Sciences* 17/10:383-7
- Hopp T.P., Prickett K.S. et al. (1988) "A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification." *Biotechnology 6:1205-10*

- Hunt N., Ruppert J. et al. (1996) "Epitope tagging of the human TSH receptor; structure function studies." *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes 104* Suppl 4:52-5:52-5
- Hunt N., Willey K.P. et al. (1995) "Novel splicing variants of the human thyrotropin receptor encode truncated polypeptides without a membrane-spanning domain." *Endocrine 3:233-40*
- Hunt N., Willey K.P. et al. (1992) "Multiple forms of thyroid stimulating hormone receptor associated with Graves' disease." *Experimental and Clinical Endocrinology 100/1-2:22-7*
- Hüfner M. und Emrich D. (1996) "Funktionelle Schilddrüsenautonomie"; In: "Praktische Endokrinologie"; Hrsg: Allolio, B. und Schulte, H.M.; Urban und Schwarzenberg
- Kahaly G. (1996) "Endokrine Orbitopathie"; In: "Praktische Endokrinologie"; Hrsg: Allolio, B. und Schulte, H.M.; Urban und Schwarzenberg
- Kakinuma A., Chazenbalk G.D. et al. (1997) "An N-linked glycosylation motif from the noncleaving luteinizing hormone receptor substituted for the homologous region (Gly367 to Glu369) of the thyrotropin receptor prevents cleavage at its second, downstream site" *Journal of Biological Chemistry* 272/45:28296-300
- Kohn L.D., Shimura H. et al. (1995) "The thyrotropin receptor." Vitamines and Hormones 50:287-384:287-384
- Kosugi S., Akamizu T. et al. (1991) "The extracellular domain of the TSH receptor has an immunogenic epitope reactive with Graves' IgG but unrelated to receptor function as well as determinants having different roles for high affinity TSH binding and the activity of thyroid-stimulating autoantibodies." *Thyroid* 1/4:321-30
- Kosugi S., Ban T. et al. (1992) "Role of cysteine residues in the extracellular domain and exoplasmic loops of the transmembrane domain of the TSH receptor: effect of mutation to serine on TSH receptor activity and response to thyroid stimulating autoantibodies." *Biochemical and Biophysical Research Communication* 189/3:1754-62
- Kosugi S., Kohn L.D. et al. (1994a) "The middle portion in the second cytoplasmic loop of the thyrotropin receptor plays a crucial role in adenylate cyclase activation." *Molecular Endocrinology* 8/4:498-509
- Kosugi S. und Mori T. (1994b) "The amino-terminal half of the cytoplasmic tail of the thyrotropin receptor is essential for full activities of receptor function." *Biochemical and Biophysical Research Communication 200/1:401-7*
- Kosugi S. und Mori T. (1994c) "The intracellular region adjacent to plasma membrane (residues 684-692) of the thyrotropin receptor is important for phosphoinositide signaling but not for agonist-induced adenylate cyclase activation." *Biochemical and Biophysical Research Communication 199/3:1497-503*

- Kosugi S., Okajima F. et al. (1992) "Mutation of alanine 623 in the third cytoplasmic loop of the rat thyrotropin (TSH) receptor results in a loss in the phosphoinositide but not cAMP signal induced by TSH and receptor autoantibodies." *Journal of Biological Chemistry* 267/34:24153-6
- Kosugi S., Okajima F. et al. (1993) "Substitutions of different regions of the third cytoplasmic loop of the thyrotropin (TSH) receptor have selective effects on constitutive, TSH- , and TSH receptor autoantibody-stimulated phosphoinositide and 3',5'- cyclic adenosine monophosphate signal generation." *Molecular Endocrinology* 7/8:1009-20
- Kress B.C. und Spiro R.G. (1986) "Studies on the glycoprotein nature of the thyrotropin receptor: interaction with lectins and purification of the bovine protein with the use of Bandeiraea (Griffonia) simplicifolia I affinity chromatography." *Endocrinology 118/3:974-9*
- Kriegler (1990) "Immunoprecipitation"; In: "Gene Transfer and Expression A Laboratory Manual", S. 213-6.; Stockton Press
- Laugwitz K.L., Allgeier A. et al. (1996) "The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93/1:116-20
- Laurent E., Mockel J. et al. (1987) "Dual activation by thyrotropin of the phospholipase C and cyclic AMP cascades in human thyroid." *Molecular and Cellular Endocrinology* 52/3:273-8
- LeGouill C., Prent J.L. et al. (1994) "Analysis of Recombinant Plasmids by a Modified Alkaline Lysis Method." *Analytical Biochemistry* 219:164-
- Levine M.A., Ahn T.G. et al. (1988) "Genetic deficiency of the alpha subunit of the guanine nucleotide- binding protein Gs as the molecular basis for Albright hereditary osteodystrophy." *Proceedings of the National A cademy of Sciences of the United States of America* 85/2:617-21
- Libert F., Lefort A. et al. (1989) "Cloning, sequencing and expression of the human thyrotropin (TSH) receptor: evidence for binding of autoantibodies." *Biochemical and Biophysical Research Communication 165/3:1250-5*
- Libert F., Parmentier M. et al. (1990a) "Molecular cloning of a dog thyrotropin (TSH) receptor variant." *Molecular and Cellular Endocrinology* 68/1:R15-R17
- Libert F., Passage E. et al. (1990b) "Localization of human thyrotropin receptor gene to chromosome region 14q3 by in situ hybridization." *Cytogenetics and Cell Genetics* 54/1-2:82-3
- Loosfelt H., Pichon C. et al. (1992) "Two-subunit structure of the human thyrotropin receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89/9:3765-9*
- Minegishi T., Nakamura K. et al. (1991) "Cloning and sequencing of human FSH receptor cDNA [published erratum appears in Biochem Biophys Res Commun 1994 Jun 15;201(2):1057]" Biochemical and Biophysical Research Communication 175/3:1125-30

- Minegishi T., Nakamura K. et al. (1990) "Cloning and sequencing of human LH/hCG receptor cDNA [published erratum appears in Biochem Biophys Res Commun 1994 Jun 15;201(2):1057]" *Biochemical and Biophysical Research Communication 172/3:1049-54*
- Misrahi M., Ghinea N. et al. (1994) "Processing of the precursors of the human thyroidstimulating hormone receptor in various eukaryotic cells (human thyrocytes, transfected L cells and baculovirus-infected insect cells)." *European Journal of Biochemistry* 222/2:711-9
- Misrahi M., Loosfelt H. et al. (1990) "Cloning, sequencing and expression of human TSH receptor." *Biochemical and Biophysical Research Communication* 166/1:394-403
- Mullis K.B. und Faloona F.A. (1987) "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction." *Methods in Enzymology* 155:335-50
- Murakami M., Miyashita K. et al. (1992) "Characterization of human thyrotropin receptor-related peptide-like immunoreactivity in peripheral blood of Graves' disease." *Biochemical and Biophysical Research Communication* 186/2:1074-80
- Nagayama Y., Kaufman K.D. et al. (1989) "Molecular cloning, sequence and functional expression of the cDNA for the human thyrotropin receptor." *Biochemical and Biophysical Research Communication 165/3:1184-90*
- Nagayama Y., Russo D. et al. (1990) "Extracellular domain chimeras of the TSH and LH/CG receptors reveal the mid-region (amino acids 171-260) to play a vital role in high affinity TSH binding." *Biochemical and Biophysical Research Communication 173/3:1150-6*
- Okamura H., Sigal C.T. et al. (1995) "Rapid High-Resolution Western Blotting" Methods in Enzymology 254:535-50
- Parma J., Duprez L. et al. (1993) "Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas [see comments]" *Nature* 365/6447:649-51
- Parmentier M., Libert F. et al. (1989) "Molecular cloning of the thyrotropin receptor." *Science* 246/4937:1620-2
- Paschke R., Teuber J. et al. (1986) "[Immune phenomena in autoimmune hyperthyroidism and their pathophysiologic and diagnostic value]" *Med.Klin.* 81/24:811-5
- Paschke R., van Sande J. et al. (1996) "The TSH receptor and thyroid diseases." Baillieres Clinical Endocrinology and Metabolism 10/1:9-27
- Paschke R., Vassart G. et al. (1995) "Current evidence for and against the TSH receptor being the common antigen in Graves' disease and thyroid associated ophthalmopathy." *Clinical Endocrinology* 42/6:565-9
- Pelham H.R. (1989) "Control of protein exit from the endoplasmic reticulum" Annual Reviews in Cell Biology 5:1-23

- Perret J., Ludgate M. et al. (1990) "Stable expression of the human TSH receptor in CHO cells and characterization of differentially expressing clones." *Biochemical and Biophysical Research Communication 171/3:1044-50*
- Persani L., Tonacchera M. et al. (1993) "Measurement of cAMP accumulation in Chinese hamster ovary cells transfected with the recombinant human TSH receptor (CHO-R): a new bioassay for human thyrotropin." *Journal of Endocrinological Investigation 16/7:511-9*
- Pfannenstiel, Saller et al (1997) "Schilddrüsenkrankheiten: Diagnose und Therapie", BMV Berliner Medizinische Verlagsanstalt, Berlin.
- Powell-Jones C.H., Thomas C.G.J. et al. (1980) "Thyrotropin receptors in normal human thyroid. Nonclassical binding kinetics not explained by the negative cooperativity model." *Journal of Biological Chemistry* 255/9:4001-10
- Pötter E., Horn R. et al. (1994) "Western blot analysis of thyrotropin receptor expression in human thyroid tumours and correlation with TSH-binding." *Biochemical and Biophysical Research Communication* 205/1:361-7
- Ransone L.J. (1995) "Detection of Protein-Protein Interactions by Coimmunoprecipitation and Dimerization" *Methods in Enzymology* 254:491-7
- Rees-Smith B., Furmaniak J. et al. (1987) "The subunit structure of the thyrotropin receptor." *Biochemical Society Transactions* 15/1:51-5
- Rees-Smith B., McLachlan S.M. et al. (1988) "Autoantibodies to the thyrotropin receptor." *Endocrine Reviews 9/1:106-21*
- Russo D., Arturi F. et al. (1997) "Molecular insights into TSH receptor abnormality and thyroid disease." *Journal of Endocrinological Investigation* 20/1:36-47
- Russo D., Arturi F. et al. (1995) "Activating mutations of the TSH receptor in differentiated thyroid carcinomas." *Oncogene 11/9:1907-11*
- Russo D., Chazenbalk G.D. et al. (1991a) "Site-directed mutagenesis of the human thyrotropin receptor: role of asparagine-linked oligosaccharides in the expression of a functional receptor." *Molecular Endocrinology* 5/1:29-33
- Russo D., Chazenbalk G.D. et al. (1991b) "A new structural model for the thyrotropin (TSH) receptor, as determined by covalent cross-linking of TSH to the recombinant receptor in intact cells: evidence for a single polypeptide chain." *Molecular Endocrinology 5/11:1607-12*
- Ryan R.J., Charlesworth M.C. et al. (1988) "The glycoprotein hormones: recent studies of structure-function relationships" *FASEB Journal 2/11:2661-9*
- Samama P., Cotecchia S. et al. (1993) "A mutation-induced activated state of the beta 2adrenergic receptor. Extending the ternary complex model" *Journal of Biological Chemistry* 268/7:4625-36
- Sambrook, Fritsch et al (1989) "Molecular Cloning A Laboratory Manual.", Cold Spring Harbor.
- Sanders J., Oda Y. et al. (1997) "Understanding the thyrotropin receptor functionstructure relationship [In Process Citation]" *Baillieres Clinical Endocrinology* and Metabolism 11/3:451-79
Scherer W.F., Syverton J.T. et al. (1953) Journal of Experimental Medicine 97:695

- Schleusener H., Schwander J. et al. (1989) "Prospective multicentre study on the prediction of relapse after antithyroid drug treatment in patients with Graves' disease [published erratum appears in Acta Endocrinol (Copenh) 1989 Aug;121(2):304]" Acta Endocrinologica 120/6:689-701
- Seetharamaiah G.S., Kurosky A. et al. (1994) "A recombinant extracellular domain of the thyrotropin (TSH) receptor binds TSH in the absence of membranes." *Endocrinology* 134/2:549-54
- Shiio Y., Itoh M. et al. (1995) "Epitope Tagging" Methods in Enzymology 254:497-502
- Spitzweg C., Joba W. et al. (1997) "Analysis of human thyrotropin receptor gene expression and immunoreactivity in human orbital tissue." *European Journal of Endocrinology* 136/6:599-607
- Stadlmayr W., Spitzweg C. et al. (1997) "TSH receptor transcripts and TSH receptorlike immunoreactivity in orbital and pretibial fibroblasts of patients with Graves' ophthalmopathy and pretibial myxedema." *Thyroid* 7/1:3-12
- Strader C.D., Fong T.M. et al. (1994) "Structure and function of G protein-coupled receptors." *Annual Reviews in Biochemistry* 63:101-32:101-32
- Takebe Y., Seiki M. et al. (1988) "SR-alpha promotor: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promotor and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat." *Molecular and Cellular Biology* 8/1:466-72
- Tanaka K., Chazenbalk G.D. et al. (1998) "Thyrotropin receptor cleavage at site 1 does not involve a specific amino acid motif but instead depends on the presence of the unique, 50 amino acid insertion" *Journal of Biological Chemistry* 273/4:1959-63
- Tanaka K., Nagayama Y. et al. (1996) "Epitope-tagging of a functional thyrotropin receptor: detection of the native receptor on intact cells." *Biochemical and Biophysical Research Communication* 228/1:21-8
- Tate R.L., Holmes J.M. et al. (1975) "Characteristics of a solubilized thyrotropin receptor from bovine thyroid plasma membranes." *Journal of Biological Chemistry* 250/16:6527-33
- Tonacchera M., van Sande J. et al. (1996) "TSH receptor and disease." *Clinical Endocrinology* 44/6:621-33
- van Sande J., Parma J. et al. (1995) "Somatic and germline mutations of the TSH receptor gene in thyroid diseases." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80/9:2577-85
- Vassart G. und Dumont J.E. (1992) "The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth." *Endocrine Reviews* 13/3:596-611
- Vitti P., Chiovato L. et al. (1994) "Failure to detect thyroid growth-promoting activity in immunoglobulin G of patients with endemic goiter [see comments]" *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 78/5:1020-5
- Weetman A.P. und McGregor A.M. (1994) "Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding." *Endocrine Reviews* 15/6:788-830

- Weinstein L.S., Shenker A. et al. (1991) "Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune- Albright syndrome [see comments]" New England Journal of Medicine 325/24:1688-95
- Wenger R.H., Moreau H. et al. (1994) "A Comparison of Different Promoter, Enhancer, and Cell Type Combinations in Transient Transfections." Analytical Biochemistry 221:416-8
- Willey K.P., Hunt N. et al. (1993) "Serum unmasks the binding of thyroid-stimulating hormone to endogenous and transfected receptors: evidence for a soluble form of the receptor in human thyroid." *Journal of Endocrinology* 139/2:317-28
- Yoshimura M. und Hershman J.M. (1995) "Thyrotropic action of human chorionic gonadotropin." *Thyroid* 5/5:425-34

7 Abkürzungen

Aufgeführt sind häufig vorkommende Abkürzungen, soweit sie nicht im darauffolgenden Anhang erklärt sind (z.B. Kurznamen von Chemikalien).

bp	DNA-Basenpaare
bTSH	bovines TSH
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementär-DNA (Komplement zu einer mRNA)
CG	Choriongonadotropin (hCG humanes CG)
C-Terminus	Carboxyterminus (eines Proteins)
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleotide; Gemisch von dATP, dCTP, dGTP, dTTP
dsDNA	Doppelstrang-DNA
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
FLAG	artifizieller Name eines synthetischen Peptids
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon, Follitropin
HA	Influenza-Hämagglutinin
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
IgG	Immunglobulin G
kb	DNA-Kilobasen (1000 Basenpaare, bp)
kDa	kilo-Dalton, 1000 Dalton (Molekulargewichts-Einheit)
KSI	Ketosteroidisomerase
LH	Luteinisierendes Hormon, Lutropin
MJT	Monojodo-Tyrosin
mRNA	messenger-RNA (DNA-Transskriptionsprodukt)
N-Terminus	Aminoterminus (eines Proteins)
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion

RIA	Radio-Immuno-Assay
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RRA	Radio-Rezeptor-Assay
rT ₃	reverses Trijodthyronin
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
ssDNA	Einzelstrang-DNA
T ₃	Trijodthyronin
T_4	Thyroxin
TBG	Thyroxin-bindendes Globulin
TBII	TSH binding inhibition immunoglobulines,
	TSH-Bindung inhibierende Antikörper
Tg	Thyreoglobulin
TPO	thyreoidale Peroxidase
TRAK	TSH-Rezeptor-Antikörper(-Assay)
TRH	TSH-Releasing-Hormon
TSAb	thyroid stimulating antibodies,
	Schilddrüsen-stimulierende Antikörper
TSBAb	thyroid stimulation blocking antibodies,
	Schilddrüsen-Stimulation blockierende Antikörper
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon, Thyrotropin
TTR	Transthyretin

8 Anhang

8.1 Tabellen

Tabelle A-1

Protokoll der Polymerasekettenreaktion zur Synthese eines FLAG/HA-TSHR-cDNA-Fragments.

PCR-Protokoll 1						
5'-Primer	TSHR-5', aus TSH-Rezer	ptor-Sequenz, Annealing-	Femp. ca 58°C			
3'-Primer	FLAG-TSHR-3' oder HA-	TSHR-3', Annealing-Temp	o. ca 38°C			
Polymerase	Pfu					
Thermocycler- Programm	Temperatur (°C)	Zeit (Min.)	Anzahl Zyklen			
HotStart	80	5				
	Zugabe der Musterstran	g-DNA (template)				
Touch Down	$95 \rightarrow 57 \rightarrow 72$	$1 \rightarrow 1 \rightarrow 1$	2			
	$95 \rightarrow 53 \rightarrow 72$	$1 \rightarrow 1 \rightarrow 1$	2			
	$95 \rightarrow 49 \rightarrow 72$	$1 \rightarrow 1 \rightarrow 1$	2			
	$95 \rightarrow 45 \rightarrow 72$	$1 \rightarrow 1 \rightarrow 1$	2			
	$95 \rightarrow 41 \rightarrow 72$	$1 \rightarrow 1 \rightarrow 1$	2			
	$95 \rightarrow 38 \rightarrow 72$	$1 \rightarrow 1 \rightarrow 1$	2			
	$95 \rightarrow 35 \rightarrow 72$	$1 \rightarrow 1 \rightarrow 1$	2			
hohe Stringenz	$95 \rightarrow 55 \rightarrow 72$	$1 \rightarrow 1 \rightarrow 1$	10			
Abschluss	72	10				
Zugabe von Taq	72	2				

Die Pfeile geben den Temperaturverlauf eines PCR-Zyklus wieder. linke Zahl - Denaturierungs-Temperatur; mittlere Zahl - Annealing-Temperatur; rechte Zahl - Polymerisierungs-(Synthese)-Temperatur. Zum Abschluss wurde der PCR-Block 10 Minuten auf 72°C eingestellt, um die Vervollständigung der Synthese eventuell unfertiger PCR-Produkte zu ermöglichen. Durch Zugabe von Taq-Polymerase am Ende der Reaktion entstehen die für die Klonierung in den Vektor pMOSblue notwendigen A-Überhänge (s. Text)

PCR-Protokoll 2						
5'-Primer	TSHR-5', aus TSH-Rezep	otor-Sequenz, Erläuterung	S.O.			
3'-Primer	FLAG-TSHR-3' oder HA-	TSHR-3', Erläuterung s.o.				
Polymerase	Pfu					
Thermocycler- Programm	Temperatur (°C)	Zeit (Min.)	Anzahl Zyklen			
HotStart	80	5				
Zugabe der Musterstrang-DNA (template)						
Touch Down	$95 \rightarrow 57 \rightarrow 72$	$1 \rightarrow 1 \rightarrow 1$	2			
	$95 \rightarrow 54 \rightarrow 72$	$1 \rightarrow 1 \rightarrow 1$	2			
	$95 \rightarrow 51 \rightarrow 72$	$1 \rightarrow 1 \rightarrow 1$	2			
	$95 \rightarrow 48 \rightarrow 72$	$1 \rightarrow 1 \rightarrow 1$	2			
	$95 \rightarrow 45 \rightarrow 72$	$1 \rightarrow 1 \rightarrow 1$	2			
	$95 \rightarrow 42 \rightarrow 72$	$1 \rightarrow 1 \rightarrow 1$	2			
	$95 \rightarrow 40 \rightarrow 72$	$1 \rightarrow 1 \rightarrow 1$	2			
hohe Stringenz	$95 \rightarrow 55 \rightarrow 72$	$1 \rightarrow 1 \rightarrow 1$	10			
Abschluss	72	10				
Zugabe von Taq	72	2				

Alternatives Protokoll der Polymerasekettenreaktion.

Bei diesem alternativen PCR-Protokoll wurde ΔT des Touch Downs verkleinert, der Touch Down wurde nur bis 40°C durchgeführt. Ansonsten entspricht dieses Protokoll dem vorherigen.

Protokoll der PCR zur Überprüfung der Orientierung des FLAG/HA-TSHR-cDNA-PCR-Produkts im Vektor pMOSblue.

PCR-Protokoll			
5'-Primer TSHR-5'	aus TSH-Rezeptor-Sequ	enz, s.o.	
Sequenz	5 ' GAACAGCACTGATAT	ICAGG 3'	
Annealing-Temp.	58°C (geschätzt)		
3'-Primer U19	aus Vektor pMOSblue		
Sequenz	5 ' GTTTTCCCAGTCACGA	ACGT 3'	
Annealing-Temp.	58°C (geschätzt)		
Polymerase	Таq		
Thermocycler-	Temperatur (°C)	Zeit (Min.)	Anzahl Zyklen
Programm			
HotStart	80	5	
	Zugabe der Musterstran	g-DNA (template)	
Touch Down	$95 \rightarrow 60 \rightarrow 72$	$1 \rightarrow 1 \rightarrow 1$	2
	$95 \rightarrow 58 \rightarrow 72$	$1 \rightarrow 1 \rightarrow 1$	2
	$95 \rightarrow 56 \rightarrow 72$	$1 \rightarrow 1 \rightarrow 1$	2
	$95 \rightarrow 54 \rightarrow 72$	$1 \rightarrow 1 \rightarrow 1$	2
	$95 \rightarrow 52 \rightarrow 72$	$1 \rightarrow 1 \rightarrow 1$	2
	$95 \rightarrow 50 \rightarrow 72$	$1 \rightarrow 1 \rightarrow 1$	22
Abschluss	72	10	

Die Pfeile geben den Temperaturverlauf eines PCR-Zyklus wieder. linke Zahl - Denaturierungs-Temperatur; mittlere Zahl - Annealing-Temperatur; rechte Zahl - Polymerisierungs-(Synthese)Temperatur. Zum Abschluss wurde der PCR-Block 10 Minuten auf 72°C eingestellt, um die Vervollständigung der Synthese eventuell unfertiger PCR-Produkte zu ermöglichen.

Tabelle A-4

Radio-Rezeptor-Assay mit transfizierten Cos-7-Zellen

			Tasashia				
			Tracerbing	dung (% Gesan	nt-Tracer)		
Kompetitor-Konz.	0 ng/ml	10 ^⁰ ng/ml	10 ¹ ng/ml	10 ² ng/ml	10 ³ ng/ml	10⁴ ng/ml	10 ⁵ ng/ml
FLAG-TSHR	10,5 ± 0,8	$10,4 \pm 0,5$	$10,4 \pm 0,2$	9,3 ± 0,1	6,8 ± 0,5	$4,9 \pm 0,2$	4,1 ± 0,5
HA-TSHR	$10,6 \pm 0,4$	$10,8 \pm 0,3$	$10,3 \pm 0,2$	8,7 ± 0,3	$6,1 \pm 0,3$	$4,7 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,8$
Wildtyp-TSHR	$10,9 \pm 0,4$	$10,9 \pm 0,7$	$11,8 \pm 0,4$	10,5 ± 1,0	$6,6 \pm 0,1$	$5,9 \pm 0,5$	$4,7 \pm 0,3$
Vektor	$3,9 \pm 0,2$	$4,2 \pm 0,2$	$4,5 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,4$	$4,1 \pm 0,3$	$4,7 \pm 0,2$	$3,9 \pm 0,1$
untransfiziert	$4,4 \pm 0,6$	$4,7 \pm 0,3$	$4,6 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,2$	$4,7 \pm 0,2$	$4,9\pm0,4$	$4,5 \pm 0,1$

Kompetition von unmarkiertem bTSH (0 - 10⁵ ng/ml) mit jodmarkiertem TSH (Tracer) an transient exprimierten TSH-Rezeptor-Konstrukten 72 Stunden nach Transfektion. Die Werte in den Spalten entsprechen dem Mittelwert von 3 Messungen ± Standardfehler des Mittelwerts.

Tabelle	e A-5
---------	-------

		cAMP-Ko	onzentration	n (pMol/1000	0 Zellen)	
TSH-Konzentration	kein	TSH	500 ng/	/ml TSH	100000 n	g/ml TSH
Stimulationszeit	6 Std.	24 Std.	6 Std.	24 Std.	6 Std.	24 Std.
FLAG-TSHR HA-TSHR Wildtyp-TSHR Vektor untransfiziert	5,3 4,6 3,9 2,1 3,9	12,8 12,0 13,3 n/b n/b	20,2 21,0 17,8 2,8 3,1	61,9 59,0 40,0 n/b n/b	32,4 25,0 24,5 3,0 5,9	118,9 81,8 82,5 n/b n/b

cAMP-Bioassay mit transfizierten Cos-7-Zellen

Mit den TSH-Rezeptorkontrukten FLAG-TSHR und HA-TSHR transient transfizierte Cos-7-Zellen wurden über 6 und 24 Stunden mit bovinem TSH stimuliert. Als Positivkontrolle wurden mit Wildtyp-Rezeptor-cDNA transfizierte Cos-7-Zellen stimuliert. Als Negativkontrollen dienten sowohl mit dem Insert-Iosen Vektor (pCDL-SR α 296) transfizierte als auch untransfizierte Cos-7-Zellen. Die akkumulierte cAMP-Konzentration im Überstand wurde radioimmunometrisch bestimmt. Die Werte in der Tabelle entsprechen dem Mittelwert von Doppelbestimmungen. n/b = nicht bestimmt.

FLAG-Klone				HA-K	lone		
Klon #	Δ TSH-Bindung	Klon #	Δ TSH-Bindung	Klon #	Δ TSH-Bindung	Klon #	Δ TSH-Bindung
1	0,2	25	0,7	1	0,3	25	0
2	0,8	26	0,5	2	0,1	26	4,2
3	0,6	27	1,4	3	0,1	27	0,2
4	0,7	28	0,9	4	-0,3	28	0,4
5	0,7	29	0,4	5	0,5	29	6,2
6	0,6	30	14,4	6	0,2	30	2,5
7	0,8	31	0,9	7	2,4	31	-0,2
8	0,6	32	0,2	8	0,3	32	0,6
9	-0,3	33	0,7	9	0,2	33	1,1
10	2,0	34	0,5	10	0,6	34	1,7
11	0,5	35	1,0	11	0,1	35	1,3
12	7,2	36	0	12	0,8	36	0,7
13	-0,4	37	0,9	13	0,8	37	1,0
14	4,4	38	0,7	14	1,7	38	-0,3
15	0,4	39	-0,2	15	0,4	39	0,5
16	0,8	40	1,0	16	0,1	40	0
17	-0,1	41	0,9	17	-0,3	41	5,9
18	1,3	42	0	18	0,5	42	-0,9
19	0, 1	43	1,0	19	0,7	43	0,7
20	0	44	0,4	20	0,5	44	4,5
21	0,8	45	0,6	21	0,7	45	Ő
22	0,7	46	1,0	22	8,1	46	0,7
23	-0, 1	47	0,3	23	1,1	47	0,2
24	0,8			24	0,7		
Positiv-Ko	ntrolle 6,9)					
Negativ-Ko	ontrolle 0,0)					

RRA-Screening der selektierten Hela-Klone.

Eingetragen ist die Differenz der Tracerbindung (Δ TSH-Bindung) der untersuchten Klone (Klon #) ohne und mit Zugabe von nicht-markiertem TSH (Kompetitor) (%bound _{0 ng/ml TSH} - %bound _{10000 ng/ml TSH}). Hohe Differenzwerte zeigen das Vorhandensein spezifischer Bindungsstellen (TSH-Rezeptoren) in den untersuchten Klonen an. Die Werte der für weitere Untersuchungen ausgewählten Klone sind in Fettdruck dargestellt.

rauio-rezeptoi-Assay.							
			Tracerbindung (% Gesamt-Trace	er)		
Kompetitor-Konz.	0 ng/ml	10 ¹ ng/ml	10 ² ng/ml	10 ³ ng/ml	10 ⁴ ng/ml	10 ⁵ ng/ml	
FLAG-TSHR 12	17,5 ± 0,4	17,3 ± 0,1	14,9 ± 0,2	9,6 ± 0,2	5,8 ± 0,1	5,1 ± 0,3	
FLAG-TSHR 30	16,1 ± 0,3	$15,9 \pm 0,1$	$14,2 \pm 0,4$	$10,3 \pm 0,1$	$6,4 \pm 0,1$	$5,5 \pm 0,5$	
HA-TSHR 22	$13,3 \pm 0,3$					$5,2 \pm 0,4$	
HA-TSHR 41	$11,0 \pm 0,4$	$10,5 \pm 0,2$	$9,6 \pm 0,2$	7,3 ± 0,1	$5,9 \pm 0,4$	5,1 ± 0,2	
HA-TSHR 44	$12,4 \pm 0,8$	$12,0 \pm 0,6$	$9,7 \pm 0,3$	$7,0 \pm 0,5$	$5,4 \pm 0,3$	$4,8 \pm 0,2$	
Wildtyp-TSHR	$8,7 \pm 0,2$	$8,3 \pm 0,3$	$7,7 \pm 0,2$	$6,4 \pm 0,5$	$5,3 \pm 0,6$	$5,0 \pm 0,1$	
untransfiziert	5,1 ± 0,1	$5,3 \pm 0,3$	$5,2 \pm 0,5$	$5,2 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,5$	

TSH-Bindungskurve stabil transfizierter Hela-Klone, Radio-Rezentor-Assav

Kompetition von unmarkiertem bTSH (0 - 10⁵ ng/ml) mit jodmarkiertem TSH (Tracer) an stabil exprimierten TSH-Rezeptor-Konstrukten aus Zellmembranen. Die Werte in den Spalten entsprechen dem Mittelwert von 3 Messungen ± Standardfehler des Mittelwerts.

Tabelle A-8

6h-Messung pmol cAMP/10000 Zellen TSH-Konz. 0 ng/ml 10° ng/ml 10¹ ng/ml 10^2 ng/ml 10³ ng/ml 10⁴ ng/ml 10⁵ ng/ml FLAG-TSHR 12 $2,3 \pm 0,2$ $8,7 \pm 0,4$ $13,1 \pm 0,5$ $17,1 \pm 0,6$ $20,4 \pm 0,9$ $20,7 \pm 1,7$ $6,1 \pm 0,3$ FLAG-TSHR 30 $5,3 \pm 0,4$ $80,1 \pm 2,3$ 84,9 ± 3,3 $14,4 \pm 0,4$ $30,2 \pm 0,9$ $60,3 \pm 3,1$ 98,7 ± 5,2 HA-TSHR 22 $4,1 \pm 0,4$ $8,8 \pm 0,6$ $13,4 \pm 0,7$ $21,6 \pm 1,0$ 35,1 ± 0,8 47,9 ± 1,5 51,1 ± 1,7 HA-TSHR 41 25,5 ± 1,1 34,9 ± 2,5 $45,9 \pm 1,6$ $2,0 \pm 0,2$ $3,8 \pm 0,3$ $8,6 \pm 0,1$ 17,4 ± 1,1 HA-TSHR 44

 $7,4 \pm 0,4$

12,7 ± 1,5

 $1,0 \pm 0,1$

 $14,5 \pm 1,0$

19,7 ± 1,5

 $1,2 \pm 0,0$

 $21,9 \pm 0,4$

 $33,3 \pm 0,4$

 $1,3 \pm 0,1$

 $31,1 \pm 0,8$

 $40,8 \pm 2,7$

 $1,2 \pm 0,0$

 $32,6 \pm 1,0$

 $45,7 \pm 6,3$

 $1,4 \pm 0,1$

 $1,8 \pm 0,0$

 $3,1 \pm 0,0$

 $1,1 \pm 0,0$

Wildtyp-TSHR

untransfiziert

 $3,9 \pm 0,1$

7,6 ± 1,0

 $1,2 \pm 0,1$

Ergebnis cAMP-Bioassay, Teil 1 (6h-Messung).

Radioimmunometrische Messung der cAMP-Konzentration im Überstand von stabil mit TSH-Rezeptorkonstrukten transfizierten Hela-Klonen nach Stimulation mit TSH über 6 Stunden. Die eingetragenen Werte sind Mittelwerte von Dreifachbestimmungen ± Standardfehler des Mittelwerts.

24h-Messung							
_			pmol	cAMP/10000 2	Zellen		
TSH-Konz.	0 ng/ml	10 ⁰ ng/ml	10 ¹ ng/ml	10 ² ng/ml	10 ³ ng/ml	10 ⁴ ng/ml	10 ⁵ ng/ml
FLAG-TSHR 12	5,3 ± 0,1	14,5 ± 1,7	18,1 ± 1,8	31,2 ± 0,9	38,0 ± 2,5	$42,2 \pm 0,9$	41,6 ± 5,0
FLAG-TSHR 30	14,6 ± 0,8	38,8 ± 0,7	75,4 ± 3,3	152,4 ± 18,4	158,9 ± 1,1	221,3 ± 3,1	190,6 ± 12,6
HA-TSHR 22	8,1 ± 0,5	$15,3 \pm 0,8$	24,0 ± 1,1	48,1 ± 3,4	62,5 ± 1,5	84,9 ± 15,2	$80,8 \pm 5,4$
HA-TSHR 41	$3,8 \pm 0,1$	$7,7 \pm 0,4$	$15,7 \pm 0,9$	37,1 ± 3,8	$44,0 \pm 4,6$	62,1 ± 6,5	77,1 ± 8,9
HA-TSHR 44	$3,6 \pm 0,2$	$6,5 \pm 0,4$	$11,9 \pm 0,8$	$22,3 \pm 0,4$	40,9 ± 1,8	$50,6 \pm 0,2$	51,1 ± 1,4
Wildtyp-TSHR	$6,5 \pm 0,7$	$18,7 \pm 0,5$	$33,9 \pm 2,4$	$64,4 \pm 3,3$	$70,8 \pm 3,0$	83,2 ± 5,2	87,9 ± 1,0
untransfiziert	1,7 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,2	2,5 ± 0,1	1,8 ± 0,0	1,9 ± 0,1	1,9 ± 0,1

Ergebnis cAMP-Bioassay, Teil 2 (24h-Messung).

Radioimmunometrische Messung der cAMP-Konzentration im Überstand von stabil mit TSH-Rezeptorkonstrukten transfizierten Hela-Klonen nach Stimulation mit TSH über 24 Stunden. Die eingetragenen Werte sind Mittelwerte von Dreifachbestimmungen ± Standardfehler des Mittelwerts.

Tabelle A-10

Protokoll der PCR zur Überprüfung der Insertion von FLAG/HA-Konkatemeren in den Vektor pET-31b(+).

PCR-Protokoll							
5'-Primer KSI	aus KSI-Sequenz strom	aufwärts der Klonierung	sstelle				
Sequenz	5' GGC AAG GTG GTG	G AGC ATC 3'					
Annealing-Temp.	50,7°C						
3'-Primer T7terminator	im Vektor stromabwärts	der Klonierungsstelle					
Sequenz	5' GCT AGT TAT TG	C TCA GCG G 3'					
Annealing-Temp.	47,9°C						
Polymerase: Taq							
Thermocycler-	Temperatur (°C)	Zeit (Min.)	Anzahl Zyklen				
Programm							
	95	10					
Touch Down	$95 \rightarrow 58 \rightarrow 72$	$1 \rightarrow 1 \rightarrow 1$	2				
	$95 \rightarrow 56 \rightarrow 72$	$1 \rightarrow 1 \rightarrow 1$	2				
	$95 \rightarrow 54 \rightarrow 72$	$95 \rightarrow 54 \rightarrow 72$ $1 \rightarrow 1 \rightarrow 1$ 2					
	$95 \rightarrow 52 \rightarrow 72$	$1 \rightarrow 1 \rightarrow 1$	24				
Abschluss	72	10					

8.2 Materialauflistung

8.2.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Agarose-Gelelektrophorese-Kammern	MWG-Biotech
und Zubehör	
Bakterien-Inkubator	Heraeus
Elektroblot-Apparatur	Phase
Elektroblot-Spannungsquelle	Pharmacia
Eppendorf-Gefäße 1,5 ml	Eppendorf
Gammacounter	Beckman
Geltrockner	Höfer
Heizblöcke	Eppendorf
programmierbarer Heizblock	MWG Biotech
(Thermocycler)	
Hochspannungs-Elektrophorese-Apparatur	Gibco BRL
Mikrowellen-Ofen	Siemens
Wipptischvorrichtung, "Rocking Platform"	Biometra
Nutatorrad	
PVDF-Membran	Amersham
Röntgenfilm	KODAK Xomat-AR
	FUJI RX
SDS-PAGE-Apparatur	Biometra
SDS-PAGE-Spannungsquelle	Pharmacia
Spektrophotometer	Beckman
Tischzentrifuge	Eppendorf und Heraeus
UV-Transilluminator	Biometra
Ultraschall-Applikator	
Wasserbad	Julabo
Whatman-3MM-Papier	Whatman
8.2.2 Chemikalien	
Agarose	Serva oder Gibco BRL
Ammoniumpersulfat, APS	Gibco BRL
ATP	Pharmacia
α -S ³⁵ -ATP	Amersham
Borsäure	Merck
bovines Serumalbumin, BSA	New England Biolab, NEB
Bromphenolblau	Sigma
Casein Hydrolysat	Boehringer Mannheim
Chloroform	Merck
Coomassieblau-R250	Serva

Merck

Dimethylsulfoxid, DMSO

EDTA	Sigma
Essigsäure 96%	Merck
Ethanol 96%	Merck
Ethidiumbromid	Fluka
Glucose	Merck
Glycerol	Merck
Guanidinhydrochlorid	Merck
Harnstoff	Sigma
Imidazol	Sigma
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Merck
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid	Pharmacia
Kaliumphosphat K ₂ HPO ₄	Sigma
Magnesiumchlorid MgCl ₂	Promega
Maleinsäure	Merck
β-Mercaptorethanol	Merck
Mineralöl	Sigma
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid, NaCl	Merck
Natriumdodecylsulfat, SDS	Roth
Natriumhydroxid, NaOH	Merck
Natriumdihydrogenphosphat, NaH ₂ PO ₄	Sigma
Di-Natriumhydrogenphosphat, Na ₂ HPO ₄	Sigma
Nonidet P-40	Boehringer Mannheim
Nukleotide als dNTP-Mix	Pharmacia
Phenol	Merck
Polyacrylamid-Concentrate	National Diagnostics
Polyacrylamid-Diluent	National Diagnostics
Polyethylenglykol, PEG	Sigma
Primer-Oligonukleotide	versch. Hersteller,
	z.B. MWG Biotech, Pharmacia
Protein-A-Sepharose	Pharmacia
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin,	
TEMED	Sigma
Tris	Sigma
Triton-X	Boehringer Mannheim
Tween-20	Boehringer Mannheim
Xylencyanol FF	Sigma
100 bp-, 1 kb-DNA-Längenmarker	Gibco BRL
Proteinase-Inhibitor-Cocktail "Boehringer	
Complete"	Boehringer Mannheim, Kat.Nr. 1 697 498
Molekulargewichtsmarker Rainbow-	

Marker, 14,3-200 kDa	Amersham Life Science, Kat.Nr. RPN756
8.2.3 Häufig gebrauchte Reakt	tions- und Elektrophoresepuffer
Agarose-Gel-Ladepuffer	0,25% (w/v) Bromphenolblau
	0,25% (w/v) Xylencyanol FF
	50% (v/v) Glycerol
Blockierreagenz	1% (w/v) Casein Hydrolysat
	100 mM Maleinsäure pH 7,5
	150 mM NaCl
Chromatographiepuffer A	6 M Guanidinhydrochlorid
	100 mM Phosphatpuffer pH 8,0
	10 mM Tris-HCl pH 8,0
Chromatographiepuffer B	8 M Harnstoff
	100 mM Phosphatpuffer pH 8,0
	10 mM Tris-HCl pH 8,0
Chromatographiepuffer C	8 M Harnstoff
	100 mM Phosphatpuffer pH 6,0
	10 mM Tris-HCl pH 6,3
DNA-Miniprep-Lösung I	50 mM Glucose
	10 mM EDTA
	25 mM Tris/HCl pH 8,0
DNA-Miniprep-Lösung II	0,2 N NaOH
	1% (v/v) SDS
DNA-Miniprep-Lösung III	29,4 g Natriumacetat
	5 ml Essigsäure
	Aqua bidest ad 100 ml
Elektroblot-Transferpuffer	48 mM Tris-HCl
	39 mM Glycin
	0,037% SDS
	20% Methanol
PBS-Puffer	140 mM NaCl
	3 mM KCl
	8 mM Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM K ₂ HPO ₄
Proteinlysepuffer	150 mM NaCl
	25 mM Tris/HCl pH 7,6
	1% Nonidet P-40
	Proteinase-Inhibitor-Cocktail
SDS-PAGE-Ladepuffer (4-fach konz.)	15% (w/v) SDS
	100 mM Tris-HCl pH 6,8
	32% (v/v) Glycerol
	12% β-Mercaptorethanol
	Bromphenolblau

TAE	40 mM Tris/HCl
	40 mM Natriumacetat
	1 mM EDTA, pH 7,5
TBE	70 mM Tris/HCl
	70 mM Borsäure
	1,5 mM EDTA, pH 7,5
TBST	137 mM NaCl
	Tris/HCl pH 7,5
	0,05% (w/v) Tween
TE	10 mM Tris-HCl, pH 7,5
	1 mM EDTA, pH 8,0
TGS-Puffer	0,125 M Tris
	0,96 M Glycin
	0,5 % SDS, pH 8,5
TSS-Puffer	10% (w/v) PEG-4000
	5% (v/v) DMSO
	50 mM MgCl2, pH 6,5
	in flüssigem LB-Medium
Coomassie-Färbelösung	0,5% (w/v) Coomassieblau-R250
C	40% (v/v) Ethanol 96%
	10% (v/v) Essigsäure 96%
Coomassie-Entfärbelösung	40% (v/v) Ethanol 96%
C	10% (v/v) Essigsäure 96%
Phosphatpuffer pH 8.0	93.2 mM Di-Natriumhydrogenphosphat
	6.8 mM Natriumdihvdrogenphosphat
Phosphatpuffer pH 6.0	12 mM Di-Natriumhydrogenphosphat
	88 mM Natriumdihydrogenphosphat
Ultraschall-Puffer	50 mM Phosphatpuffer pH 8.0
	300 mM Natriumchlorid
	1% (v/v) Tween-20

8.2.4 Enzyme

Restriktionsenzyme BamH I, Hinc II	Stratagene
Xba	New England Biolabs
BstE II	Gibco BRL
Restriktionsenzympuffer	Stratagene, New England Biolabs
T4-Polynukleotid-Kinase, Kinase-Puffer	New England Biolabs, Katalog-Nr. 201S
Phosphatase (shrimp alkaline phosphatase),	Amersham/Pharmacia
Phosphatase-Puffer	Katalog-Nr. E70092Y
T4-DNA-Ligase, Ligase-Puffer	Gibco BRL, Katalog-Nr. 15224
thermostab. DNA-Polymerase Taq	exprimiert und gereinigt im IHF von
	Dr. Nicholas Hunt
thermostab. DNA-Polymerase Pfu	Stratagene

DNA-Polymerase-Puffer	Promega
RNAse A	Boehringer Mannheim
N-Glycosidase F, rekombinant	Boehringer Mannheim
	Katalog-Nr. 1365 177
8.2.5 Vorgefertigte "Kits"	
BCA-Protein-Assay	Pierce
	Katalog-Nr. 23225
BioRad-Protein-Assay	BioRad
	Katalog-Nr. 500-0001
ECL-Kit	Amersham Life Sciences
	Katalog-Nr. RPN2109
JetStar-Kit	Genomed
	Katalog-Nr. 220010
QIAEX II gel extraction kit	QIAGEN
	Katalog-Nr. 20021
T7 Sequencing Kit	Pharmacia

8.2.6 Antikörper

Erstantikörper:	
polyklonales Kaninchen-anti-FLAG-Serum	Santa Cruz Biotechnology Inc.
	Katalog-Nr. sc-807
	Zymed Laboratories
	Katalog-Nr. 71-5400
polyklonales Kaninchen-anti-HA-Serum	Berkeley Antibody Company BAbCO
	Katalog-Nr. PRB-101C
Zweitantikörper:	
Meerettich-Peroxidase-gekoppelter	Jackson Immuno Research / dianova, Kat
anti-Kaninchen-IgG _{Fc} -Antikörper	Nr. 111-036-006, oder Santa Cruz
	Biotechnology, Kat.Nr. sc-2004
Meerettich-Peroxidase-gekoppelter	Sigma
anti-Ratten-IgG _{Fc} -Antikörper	Katalog-Nr. A 9037
8.2.7 Vektoren	
pMOSblue	Amersham Life Sciences
	Katalog-Nr. RPN 1719
pcDL-SRa296	freundlicherweise zur Verfügung gestellt
	von Dr. Northemann, Elias
pSVneo	freundlicherweise zur Verfügung gestellt
	vom Pette-Institut, Hamburg
pET-31b(+)	Novagen
	Katalog-Nr. 69954-1

Katalog-Nr. 27-1682-01

8.2.8 Bakterienstämme und Kulturbedarf

Escherichia coli XL1-blue	Stratagene
	Katalog-Nr. 200249
Escherichia coli BL21(DE3)	Novagen
	Katalog-Nr. 69450-3
Escherichia coli BL21(DE3)pLysS	Novagen
	Katalog-Nr. 69451-3
LB-Medium	Gibco BRL
LB-Agar	Gibco BRL
Ampicillin	Sigma

8.2.9 Eukaryote Zellen und Kulturbedarf

Chloroquin	Sigma
Cos-7-Zellen	DSMZ (Deutsche Sammlung von
	Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH),
	Nr. ACC 60
DEAE-Dextran	Pharmacia
DMEM, 4.5 g/l Dextrose	ICN Biochemicals
	Katalog-Nr. 12-332-54
Fötales Kälberserum, FCS	Flow
Gefrierröhrchen	Nunc
Geneticin, G-418	Gibco BRL
	Katalog-Nr. 11811-064
Hela-Zellen	DSMZ
	Nr. ACC 57
L-Glutamin	Biochrom KG, Berlin
LipofectAMINE-Reagens	Gibco BRL
	Katalog-Nr 18324-012
PBS	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Biochrom KG, Katalog-Nr. A2213
Petrischalen, Zellkulturflaschen	Nunc, Greiner
Trypanblau-Lösung	Sigma
Trypsin/EDTA-Lösung [10x]	Biochrom KG
	Katalog-Nr. L2153
8.2.10 Radio-Rezeptor-Assav	

CAP-Puffer

Präzipitationsreagenz

10 mM KPO₄, pH 7,4 0,05% (w/v) bovines Serumalbumin Phenolrot 0,06% (w/v) PEG-6000 (Merck) 1% (v/v) Eselserum (Scottish Antibody Production Unit) in CAP-Puffer

I ¹²⁵ -markiertes, bovines TSH	freundlicherweise zur Verfügung gestellt
	von Dr. Kevan Willey, IHF
bovines TSH, 0,5 IU/mg	Organon

8.2.11 cAMP-RIA

Der verwendete cAMP-RIA wurde am Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung von Dr. M. Schumacher entwickelt. Alle Assaykomponenten wurden vom Institut zur Verfügung gestellt. Der Assay wurde inzwischen kommerzialisiert und ist bei IBL erhältlich, Katalog-Nr. RE 11021.

-	
9,7 % (w/v) Minimal Essential Medium	Flow
25mM HEPES Puffer, pH 7,4	
0,1% (w/v) bovines Serumalbumin	
3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin, IBMX	Sigma
Natriumacetat-Puffer	IHF
cAMP	IHF
125-Jod-cAMP	IHF
polyklonales Kaninchen-anti-cAMP-Serum	IHF
Stoplösung	IHF

9 Danksagung

Herrn **Professor Dr. med. Heinrich M. Schulte** danke ich für die Überlassung des wissenschaftlichen Themas und die Betreuung meiner Dissertation am Fachbereich Medizin der Universität Hamburg.

Herrn **Dr. Nicholas Hunt (PhD)** vom Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung an der Universität Hamburg (IHF) möchte ich ganz herzlich für die jahrelange praktische und theoretische Anleitung im Institut und die geduldige Ermutigung danken.

Aufgrund der Vielfalt der in dieser Arbeit eingesetzten Methoden habe ich Kontakt zu vielen Mitarbeitern des IHF gewonnen, die mich bei meiner Arbeit nach Kräften unterstützt und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Durch ihr praktisches Beispiel und ihre Anregungen in unzähligen Diskussionen und Gesprächen haben sie mein Verständnis für wissenschaftliche Arbeit geprägt - dafür danke ich allen. Besonders hervorheben möchte ich Herrn **Dr. Kevan Willey (PhD)** und Frau **Dr.rer.nat. Heike Obermann-Pleß**, die mich u.a. bei der Durchführung der Radio-Rezeptor-Assays und der cAMP-Bioassays angeleitet haben.

10 Lebenslauf

Name:	Jörg Dieter Ruppert.
Wohnort:	Heidberg 45, 22301 Hamburg.
geboren:	am 10. März 1970 in Würzburg.
Familienstand:	ledig.

Schulbildung:

1976 - 1980	Volksschule Würzburg-Versbach.
1980 - 1989	Siebold-Gymnasium Würzburg.

Zivildienst:

Medizinstudium:

1991 - 1993	Vorklinisches Studium, Universität Würzburg.
1993 - 1998	Klinisches Studium, Universität Hamburg.
1997 - 1998	Praktisches Jahr in Hamburg, Ljubljana (Slowenien) und Winchester
	(Großbritannien)
1998	3. Staatsexamen, Vorläufige Approbation

Wissenschaftliche Tätigkeit:

seit 2.1995	Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung (IHF) an der
	Universität Hamburg, Direktor: Prof. Dr. H. M. Schulte.

Ärztliche Tätigkeit:

seit 7.1998 Arzt im Praktikum in der Inneren Abteilung, Allgemeines Krankenhaus Eilbek, Chefarzt Prof. Dr. H. Heidemann.