

Kurzmitteilung

# Der FSH-Rezeptor von Equiden: Sequenzvergleich im Bereich von Exon 10

## The FSH receptor of equids: Sequence comparison of exon 10

B. Klauß-Perschke, H.-O. Hoppen und S. Schlote

Zentrumsabteilung für Chemische Analytik und Endokrinologie, Tierärztliche Hochschule Hannover

Die Gonadotropine sind wichtige Faktoren bei der Steuerung der Fortpflanzung von Säugetieren. Beim Pferd wurde bis dato die Rolle des Follikelstimulierenden Hormons FSH eher stiefmütterlich behandelt. Als Teil unserer Studien zu Struktur-Wirkungsbeziehungen equiner Gonadotropine beschäftigen wir uns seit einiger Zeit mit der Aktivität des FSH-Hormon-Rezeptorkomplexes. Der FSH-Rezeptor gehört wie auch der TSH-Rezeptor und der LH-Rezeptor in die Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. Der codierende Nukleinsäurestrang hat eine Länge von 2319 Basenpaaren (bp), von denen 2082bp für die 694 Aminosäuren codieren und ist in 10 Exons gegliedert. Exon 10 codiert mit einer Länge von 1233bp für den überwiegenden Teil des Rezeptors, während die ersten 9 Exons den extrazellulären Bereich bestimmen. Besonders im Transmembranbereich des letzten Exons dieser Rezeptorfamilie ist speziesübergreifend eine hohe Ähnlichkeit der Sequenzen zu finden. Für die FSH-Rezeptor-Sequenz des Menschen sind 6 meist heterozygot rezessiv vorliegende Mutationen bekannt, die einen Einfluss auf die biologische Funktion des FSH-Hormon-Rezeptor-Komplex haben, indem eine der Mutationen aktivierende und 5 weitere deaktivierende Wirkung zeigen (Huhtaniemi I. T. und Aittomäki K., 1998). Die deaktivierenden Mutationen sind als eine von mehreren Ursachen für eine Reihe von Fruchtbarkeitsstörungen beschrieben, wie primäre Amenorrhoe, das Fehlen der sekundären Geschlechtsmerkmale, der hypergonadotrope Hypogonadismus der Frau und eine verminderte oder ausbleibende Spermatogenese beim Mann. Der aktivierenden Mutation wird eine ursächliche Rolle für Granulosa-, Sertoli- und Leydig-Zelltumoren zugeschrieben. Die Mehrheit der bisher gefundenen Gonadotropin-Rezeptor-Mutationen sind in Exon 10 in der Nähe der sechsten extrazellulär liegenden Schleife, welche die sechste und siebte transmembrane Domäne verbindet (Themmen A.P.N., Martens J.W.M. und Brunner H.G., 1997). Auf Grund der beschriebenen Homologien ist anzunehmen, dass Änderungen in der Sequenz des equinen FSH-Rezeptors im Bereich des Exon 10 ebenfalls einen wesentlichen Einfluss auf die Fertilität haben. Dabei stellen die zu erwartenden Mutationen des FSH-Rezeptors eine von mehreren möglichen Ursachen für Fertilitätsstörungen und Tumore dar. Durch die Veränderung des Rezeptors kann die Hor-

monbindung reduziert oder ganz verhindert sein, oder es kann zur Unterbrechung der Signalweiterleitung des Hormon-Rezeptor-Komplexes kommen.

Im Verlauf einer noch andauernden Studie werden aus Blutproben Lymphozyten aufgereinigt aus denen genomische DNA gewonnen wird. Das Arbeiten mit genomischer DNA läßt nur Untersuchungen auf erblich bedingte Sequenzänderungen zu, hat aber den Vorteil des einfacheren Zugangs zum Probenmaterial, da Blut sehr viel leichter und unproblematischer zu gewinnen ist als Gonadengewebe. Weiterhin läßt sich der Schritt der reversen Transkription, der bei der Umschreibung von RNA in DNA eine potentielle Fehlerquelle darstellt, vermeiden. Für den Bereich des Exons 10 wurden anhand der veröffentlichten Sequenz des FSH-Rezeptors vom Pferd (Robert P., Amsellem S., Christophe S., Benifla J.-L., Bellet D., Komman A. and Bidart J.-M., 1994) Primer konstruiert, mit denen überlappende Bereiche des Exons mittels PCR vermehrt wurden. Diese PCR-Produkte wurden von beiden Seiten sequenziert. Bisher wurden von uns ausschließlich DNA von gesunden Tieren sequenziert, um Referenzsequenzen zu erstellen. Ein Vergleich der Sequenzen (siehe Tabelle 1) von Pferden verschiedener Rassen (Vollblut, Warmblut, Pony und Kreuzungen) zeigt keinerlei Sequenzunterschiede im Bereich von Exon 10 zwischen diesen Tieren, wonach rassetyypische Polymorphismen, wie sie für canide Rassen beim TSH-Rezeptor gefunden wurden (Täpper M., 2001), auszuschließen sind. Allerdings weisen alle diese Sequenzen gemeinschaftlich 3 Änderungen im Vergleich zu der veröffentlichten Ausgangssequenz auf. In Position 1063 finden wir ein T anstelle eines C was zu einer Änderung der Aminosäure 355 von Arg zu Cys führt. Die Positionen 1646 und 1647 sind CT anstelle von TC was zu einem Wechsel in Codon 549 von Ile zu Thr führt und die Positionen 1954 und 1955 sind AC statt CT, wodurch eine Änderung von Leu in Thr in Codon 652 bedingt ist. Ein Sequenzvergleich der Spezies Pferd, Esel und Zebra bestätigt diese 3 Änderungen. Zusätzlich zeigen sich Unterschiede im Vergleich der Sequenzen dieser 3 Spezies untereinander. Auffällig ist, dass es 6 Unterschiede zur Pferdesequenz gibt, die Esel und Zebra gemeinsam haben, wovon aber nur zwei in einem Aminosäurewechsel resultieren. In Position 948 ist ein C anstatt eines T, Position 999 zeigt ein C anstelle von G, was zu einer Änderung der Aminosäure Glu in Asp in Codon 333 führt. Bei Position 1179

**Tab. 1:** Sequenzänderungen im Bereich von Exon10 des FSH-Rezeptors der Spezies Pferd, Esel und Zebra, im Vergleich zur veröffentlichten Pferdesequenz (Bidart et al., 1994)

Sequence variations in exon 10 of the FSH receptor of the horse, donkey, and zebra, as compared with the published equine sequence (Bidart et al., 1994)

Sequenz- änderung	Spezi- es	Nukleinsäure			Aminosäure		
		Position	original	veränd.	Position	original	veränd.
1	Pferd	1063	C	T	355	Arg	Cys
	Esel						
	Zebra						
2	Pferd	1646/16477	TC	CT	549	Ile	Thr
	Esel						
	Zebra						
3	Pferd	1954/1955	CT	AC	652	Leu	Thr
	Esel						
	Zebra						
4	Esel	948	T	C			
	Zebra						
5	Esel	999	G	C	333	Glu	Asp
	Zebra						
6	Esel	1179	T	C			
	Zebra						
7	Esel	1218	C	T			
	Zebra						
8	Esel	1938	T	C			
	Zebra						
9	Esel	2031	T	C	678	Ile	Thr
	Zebra						
10	Zebra	1027	G	A	343	Val	Met
11	Esel	958-978	AGTTAC CCCAA GGATT GAC	fehlt	320-3- 26	Ser, Tyr, Pro, Lys, Gly, Phe, Asp	fehlt

haben Esel und Zebra ein C anstatt eines T, in Position 1218 ist ein C durch ein T getauscht, in Position 1938 findet sich ein C statt eines T und der Wechsel eines T zu einem C in Position 2031 führt zu einer Änderung der Aminosäure Ile in Thr in Codon 678. Das Zebra hat eine weitere Abweichung im Vergleich zu Pferd und Esel. In Position 1027 resultiert ein Austausch von G zu A in

einem Aminosäurewechsel des Codon 343 von Val zu Met. Der Verlust von 21 bp zwischen Position 958 und 978 und der entsprechenden 7 Aminosäuren von 320 bis 326 bei der Sequenz des Esel-FSH-Rezeptors (Richard F., Martinat N., Remy J.-J., Salesse R., Combarous Y., 1997) wird durch unsere Sequenz bestätigt.

Die vorliegenden Sequenzdaten zeigen, wie hoch konserviert der Bereich des Exon 10 bei den equinen Spezies ist. In einem zweiten Teil dieser Studie werden derzeit Tiere untersucht, die durch verschiedene Fertilitätsprobleme auffällig wurden. Dazu gehören nicht angelegte oder funktionslose Ovarien, Störungen in der Follikelentwicklung und Reifung bei Stuten und verminderte Spermienproduktion oder -qualität bei Hengsten. Ziel ist es, eine Diagnostik aufzubauen um fertilitätsrelevante Veränderungen des Erbguts früh zu erkennen und somit möglicherweise der Pferdezucht ein neues Auswahlkriterium zur Verfügung zu stellen. Möglicherweise lässt sich auch für das Pferd der Nachweis führen, dass Mutationen des FSH-Rezeptors eine mögliche Ursache für Tumore der Gonaden sind.

## Literatur

- Huhtaniemi I. T. and Aittomäki K. (1998): European Journal of Endocrinology 138, 473–481  
 Themmen A.P.N., Martens J.W.M. and Brunner H.G. (1997): Journal of Endocrinology 153, 179–183  
 Robert P., Amsellem S., Christophe S., Benifla J.-L., Bellet D., Komman A. and Bidart J.-M. (1994): Biochem Biophys Res Commun 201, 201–207  
 Tapper M. (2001): Der TSH-Rezeptor von Caniden. Dissertation Hannover 2001, im Druck  
 Richard F., Martinat N., Remy J.-J., Salesse R., Combarous Y. (1997): Journal of Molecular Endocrinology 18, 193–202

Prof. Dr. H.-O. Hoppen

Zentrumsabteilung für Chemische Analytik und Endokrinologie  
 Tierärztliche Hochschule Hannover  
 Bischofsholer Damm 15  
 30173 Hannover

Tel.: (49)-511-856 75 45  
 Fax: (49)-511-856 76 73