

Tanja Seiter  
Dr. med.

## **Entwicklung eines in-vitro-Bioassays zur Messung der Bioaktivität von Liganden am PTH1- bzw. PTH2-Rezeptor**

Geboren am 03.02.1973 in Heilbronn-Neckargartach  
Reifeprüfung am 19.05.1992  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1992/93 bis WS 1999/00  
Physikum am 07.09.1994  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Mannheim  
Staatsexamen am 03.11.1999 an der Universität Heidelberg/Mannheim

Promotionsfach: Innere Medizin  
Doktorvater: Prof. Dr.med. R.Ziegler

Ziel dieser Arbeit war es, einen sensitiven in-vitro-Bioassay zur Messung der biologischen Aktivität von Liganden des PTH1- und PTH2-Rezeptors zu entwickeln.

Der Assay basiert auf 293-Zelllinien, die stabil PTH1- bzw. PTH2-Rezeptoren exprimieren. Bei diesen Zelllinien sind die Rezeptoren mit einer hohen Dichte an der Zelloberfläche vorhanden und zudem besonders effizient an den Adenylatzyklase-Signalweg gekoppelt. Die Rezeptoraktivierung zieht eine von der Ligandenkonzentration abhängige Bildung von intrazellulären Second Messengern, cAMP und DAG/IP<sub>3</sub>, nach sich. Die entwickelte Methode beruht auf der Verwendung von Reportergenplasmiden mit  $\beta$ -Galactosidase und Luciferase als Reportergen. Diese Plasmide enthielten cAMP-Antwortelemente (CRE), die den Promotoren der Reporter gene als Transkriptionsregulatoren vorgeschaltet waren. Wie im Rahmen der Arbeit nachgewiesen werden konnte, ist vor allem die Erhöhung von cAMP durch die Rezeptoraktivierung für die CRE-abhängige Transkription der Reporterenzyme zuständig. Unter Substratsättigung diente dann die Bestimmung der Enzym-Reaktionsprodukte als Maß für die Liganden-induzierte Enzymaktivität und ließ damit Rückschlüsse auf die Konzentration der Liganden zu.

Zunächst wurde der Assay unter der Verwendung von  $\beta$ -Galactosidase als Reporter gen etabliert. Dazu wurden die verwendeten Zelllinien transient mit dem Reporter gen plasmid transfiziert. Eine Optimierung des Assays in Hinblick auf die Sensitivität (eben signifikanter Anstieg der Enzymaktivität im Vergleich zum Basalwert) und maximale Induzierbarkeit der gemessenen Enzymaktivität konnte vor allem durch die Anpassung der transfizierten Plasmidmenge, die Verwendung von IBMX im Versuchsmedium und die Wahl des sensibler meßbaren Substrates für die  $\beta$ -Galactosidase, CRPG, erreicht werden. In einer Reihe von Versuchen konnte die proportionale Abhängigkeit der induzierten Enzymaktivitäten von der Konzentration der stimulierenden Liganden nachgewiesen werden. Durch die Validierung des Assays mit verschiedenen Proteinkinaseinhibitoren und –aktivatoren sowie Ionophoren konnte die vermutete maßgebliche Rolle von cAMP bei der CRE-Aktivierung bestätigt werden. Durch die Testung von PTH- und PTHrP-Fragmenten anhand der Zelllinien 293-*hu*-PTH1 und –PTH2 ergab sich hinsichtlich der Bioaktivität der Peptide volle Übereinstimmung mit auf anderen Methoden basierenden Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen. Erwartungsgemäß konnte die Zelllinie 293-*hu*-PTH2 ausschließlich durch PTH stimuliert werden, nicht jedoch durch PTHrP, und eignet sich damit zur selektiven Erfassung von bioaktiven PTH-Fragmenten. Die Zellreihe 293-*hu*-PTH1 konnte durch PTH und PTHrP in gleichem Maße induziert werden. Der entwickelte  $\beta$ -Galactosidaseassay eignet sich damit zur Messung der Bioaktivitäten von Liganden des PTH1- bzw. PTH2-Rezeptors, insbesondere von PTH- und PTHrP-Fragmenten. Die Nachweisgrenze des Assays lag für PTH 1-34 bei 0,2 pmol/l und für PTHrP 1-34 bei 2 pmol/l .

Um eine weitere Steigerung vor allem der maximalen Induzierbarkeit des Reporter gens zu erreichen, wurde ein Assay im weiteren Verlauf mit einem Luciferase-Reporter gen etabliert. Zunächst wurden transient mit dem Reporter gen plasmid transfizierte Zellen verwendet. Die wichtigsten Optimierungsschritte des Assays waren zum einen Ermittlung der zu transfizierenden Plasmidmenge und Verbesserung des Lyseverfahrens. Eine proportionale Abhängigkeit der gemessenen Enzymaktivität von der stimulierenden Konzentration

der Liganden konnte durch Dosis-Wirkungs-Versuche mit PTH und PTHrP nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenzen im Luciferaseassay lagen im selben Bereich wie beim  $\beta$ -Galactosidaseassay, der Faktor der maximalen Induzierbarkeit konnte bei der Verwendung von 293-*hu*-PTH1-Zellen von 3,1 auf 5,8 und bei der Verwendung von 293-OK-PTH1-Zellen von 2,6 auf 9,3 im Vergleich zum  $\beta$ -Galactosidaseassay gesteigert werden. Die stabile Transfektion des Reportergenplasmids ergab zwar eine Steigerung der Induktionsraten mit Forskolin, die Sensitivität des Assays bei der Messung von PTH bzw. PTHrP wurde aber um den Faktor 100 vermindert und entsprach nach Optimierung der Sensitivität des radioaktiven cAMP-Assays.

Es gelang somit die Etablierung eines einfachen, nichtradioaktiven und zellbasierten in-vitro-Bioassays zur Messung der Bioaktivität natürlicher und synthetischer Liganden der PTH1- und PTH2-Rezeptoren.

