

## 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) enthält.

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 FLAG- bzw. das HA-Epitop aus geringen Mengen Proteinlysate 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-Zelllinien etabliert, die die markierten TSH-Rezeptoren stabil exprimieren. Diese Zelllinien können von großem Nutzen sein, um Hormon-Rezeptor- bzw. Autoantikörper-Rezeptor-Interaktionen zu untersuchen. So wurden diese Zelllinien 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 Hormon- und 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 Thyroidea-stimulierenden Faktoren in Serum 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 konkatemerierte 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.