



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 29 483 T2** 2006.04.27

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 012 241 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 29 483.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/15877**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 938 160.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/006535**

(86) PCT-Anmeldetag: **30.07.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **11.02.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.06.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **23.03.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **27.04.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 5/10** (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
903977 31.07.1997 US

(73) Patentinhaber:
The General Hospital Corp., Boston, Mass., US

(74) Vertreter:
Becker, Kurig, Straus, 80336 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:
**BRINGHURST, Richard, F., Walpole, US; TAKASU,
Hisashi, Cambridge, US**

(54) Bezeichnung: **Testverfahren für Gq Protein gekoppelter Rezeptur-Agonisten und Antagonisten**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**Hintergrund der Erfindung**

[0001] Angabe über Rechte an Erfindungen, die mit Hilfe von staatlich geförderter Forschung und Entwicklung gemacht worden sind

[0002] Ein Teil der Arbeit, die während der Entwicklung dieser Erfindung angefertigt wurde, nutzte US-Regierungsgelder. Die US-Regierung hat gewisse Rechte an dieser Erfindung.

Gebiet der Erfindung

[0003] Die vorliegende Erfindung betrifft G Protein gekoppelte Rezeptoren. Spezieller, Testverfahren für Gq Protein gekoppelte Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten werden bereitgestellt. Es werden auch stabil trans-fizierte Zelllinien bereitgestellt.

Verwandter Stand der Technik

[0004] Das Nebenschilddrüsenhormon (PTH) ist ein bedeutender systemischer Regulator der Knochenerneuerung und von dem nahe verwandten Peptid PTHrP, das weitgehend in erwachsenem und fötalem Gewebe exprimiert wird, wird angenommen, dass es wichtige parakrine Aktionen verursacht, besonders bei der Entwicklung von Knorpel und Knochen (Dempster, D. W., et al., *Endocrine Rev* 14, 690-709 (1993); Lanske, B., et al., *Science* 273, 663-666 (1996); Lee, K., et al., *Endocrinology* 137, 5109-5118 (1996); Rixon, R. H., et al., *J Bone Miner Res* 9, 1179-1189 (1994)). Exogen verabreichtes PTH übt beachtliche Effekte auf die Knochenmasse in vivo, auf die Art, von der die Dosis an PTH kritisch abhängt, und auf das sich ergebende zeitliche Profil der Konzentration des zirkulierenden Peptids aus (Dempster, D. W., et al., *Endocrine Rev* 14, 690-709 (1993)). Also führt die andauernde Belastung hoher PTH-Konzentrationen zur Nettoknochenresorption und Osteopenie, während eine zeitweilige Verabreichung kleiner Dosen zur verstärkten Nettoknochenbildung führt – ein Ergebnis, das großes Interesse an dem möglichen Nutzen von PTH, oder PTH-Analoga, als Anabolika zur Steigerung der Knochenmasse und zur Prävention oder Behandlung von metabolischen Knochenkrankheiten, einschließlich Osteoporose, schürte (Dempster, D. W., et al., *Endocrine Rev* 14, 690-709 (1993), Whitfield, J. F., and Morley, P., *Trends Pharmacol Sci* 16, 382-386 (1995)).

[0005] Sowohl PTH als auch PTHrP können denselben Rezeptor, den PTH/PTHrP-Rezeptor (PTHR), aktivieren, der von verschiedenen Arten, einschließlich Ratte, Opossum, Maus, Schwein und Mensch kloniert wurde, und von dem bewiesen wurde, dass er in Knochenzellen exprimiert wird (Abou-Samra, A. B., et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 2732-2736 (1992); Juppner, H., et al., *Science* 254, 1024-1026 (1991); Schneider, H., *Eur J Pharmacol* 246, 149-155 (1993); Bringham, F. R., et al., *Endocrinology* 132, 2090-2098 (1991); Pines, M., et al., *Endocrinology* 135, 1713-1716 (1994)). Aktivierung der PTHR in Osteoblasten ruft mehrere parallele Signalereignisse hervor, einschließlich der Aktivierung der Adenylatcyclase (AC), Phospholipase C (PLC) und zytosolische freie Kalziumübergänge bzw. Änderung der zytosolischen freien Kalziumkonzentration (Abou-Samra, A. B., et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 2732-2736 (1992), Juppner, H., et al., *Science* 254, 1024-1026 (1991), Bringham, F. R., et al., *Endocrinology* 132, 2090-2098 (1993), Dunlay, R., and Hruska, K., *Am J Physiol* 258, F223-231 (1990); Fujimori, A., et al., *Endocrinology* 128, 3032-3039 (1991); Yamaguchi, D. T., et al., *J Biol Chem* 262, 7711-7718 (1987)). Die Verknüpfungen zwischen den einzelnen dieser individuellen Signalereignisse und den endgültigen ganzheitlichen Gewebeantworten auf PTH, wie Veränderungen der Gesamtknochenmasse, bleiben größtenteils unbestimmt. Es wurde berichtet, dass PTH-Analoga, die AC selektiv zu aktivieren scheinen, einen vollständigen anabolischen Effekt auf Knochen erzeugen können, die der zeitweiligen Verabreichung in vivo folgen. (Rixon, R. H., et al., *J Bone Miner Res* 9, 1179-1189 (1994), Whitfield, J. F., and Morley, P., *Trends Pharmacol Sci* 16, 382-386 (1995), Whitfield, J. F., et al., *Calcif Tissue Int* 58, 81-87 (1996)). Solche Beobachtungen deuteten darauf hin, dass einzelne zweite Messenger der PTHR tatsächlich mit spezifischen Gewebeantworten verknüpft sein können und dass deshalb das Muster von PTHR-Signalereignissen, genau wie ihre Intensität, sowohl die qualitativen als auch die quantitativen Aspekte der Antwort in den Knochen vorschreiben können. Die Angelegenheit wird durch die Tatsache verkompliziert, dass man vermutet, dass in Knochen ausgereifte Osteoklasten nicht PTHRs exprimieren und sie darum diese Einflüsse des PTH nur indirekt über die Antworten wahrnehmen müssen, die von den benachbarten Zellen, wie Osteoblasten oder Knochenmarkbindegewebszellen, verursacht werden, die diese Rezeptoren exprimieren (Dempster, D. W., et al., *Endocrine Rev* 14, 690-709 (1993), McSheehy, P., and Chambers, T., *Endocrinology* 118, 824-828 (1986)). Die Weise, wodurch solche osteoblastischen oder Bindegewebs-PTH-Zielzellen den Nachbarzellen der osteoklastischen Linie komplexe Informationen übermitteln könnten, die feine Unterschiede in zeitlichen oder Kon-

zentrationenprofilen der PTH-Belastung widerspiegelt, bleibt unklar.

[0006] Auffällige Desensibilisierungen und Down-regulation von PTHR_Rs haben eine auf hohen Ligandkonzentrationen folgende Belastung beschrieben (Fujimori, A., et al., *Endocrinology* 128, 3032-3039 (1991), Abou-Samra, A-B, et al., *Endocrinology* 129, 2547-2554 (1991); Mitchell, J., und Goltzman, D., *Endocrinology* 126, 2650-2660 (1990); Fukayama, S., et al., *Endocrinology* 131, 1757-1769 (1992)) und es wurde kürzlich berichtet, dass das Muster von Signalereignissen, die durch Ratten-PTH_R erzeugt wurden, stark von dem Grad seiner Expression auf der Zelloberfläche beeinflusst wird (Guo, J., et al., *Endocrinology* 136, 3884-3891 (1995)). Speziell kam es vor, dass das Ausmaß der PLC-Anwort in direkter Beziehung zu der Dichte der erreichbaren PTHR_Rs auf der Oberfläche der stabil transfizierten LLC-PK1-Zellen über einen Expressionsbereich (40.000 bis 300.000 Rezeptoren pro Zelle), der nicht die maximale AC-Antwort beeinflusste, stand (Guo, J., et al., *Endocrinology* 136, 3884-3891 (1995)).

[0007] Der menschliche PTHR wurde bisher in Zellkulturen exprimiert (Pines, M., et al., *Endocrinology* 135, 1713-1716 (1994), Schneider, H., et al., *FEBS Lett* 351, 281-285 (1994), Pines, M., et al., *Bone* 18, 381-389 (1996)), aber seine Signaleigenschaften wurden noch nicht vollständig aufgeklärt. Insbesondere die Änderungseffekte in der Expression von menschlichen PTHR auf die Beschaffenheit der Signaltransduktionsantwort(en) hin wurden nicht systematisch analysiert. Bestimmte amino- oder carboxyl-terminal abgestumpfte PTH-Analoga, wie PTH(3-34), PTH(7-34) und PTH(1-31), wurden bisher gefunden, die eine selektive Aktivierung nur eines Teils der üblichen zweiten Messenger der PTHR aufweisen (Rixon, R. H., et al., *J Bone Miner Res* 9, 1179-1189 (1994), Whitfield, J. F., and Morley, P., *Trends Pharmacol Sci* 16, 382-386 (1995), Fujimori, A., et al., *Endocrinology* 128, 3032-3039 (1991), Abou-Samra, A. B., et al., *Endocrinology* 135, 2588-2594 (1994); Azarani, A., et al., *J Biol Chem* 271, 14931-14936 (1996); Chakravarthy, B. R., et al., *Biochem Biophys Res Commun* 171, 1105-1110 (1990); Fujimori, A., et al., *Endocrinology* 130, 29-36 (1992); Jouishomme, H., et al., *Endocrinology* 130, 53-60 (1992); Janulis, M., et al., *Endocrinology* 133, 713-719 (1993)). Das hPTH(1-31)-Analogon soll AC, aber nicht PKC aktivieren und sogar auffällige anabolische Effekte bei Ratten, deren Eierstöcke entfernt wurden, beibehalten (Rixon, R. H., et al., *J Bone Miner Res* 9, 1179-1189 (1994), Jouishomme, H., et al., *J Bone Miner Res* 9, 943-949 (1994)). Die Bestätigung solch selektiver Signalwirkung durch menschliche PTHR_Rs würde eine wichtige zusätzliche Begründung für die Entwicklung dieser signalspezifischen PTH-Peptide für den klinischen Gebrauch bereitstellen. Darum gibt es einen Bedarf in der Technik zur Charakterisierung der Antworten, die durch PTHR vermittelt werden.

Zusammenfassung der Erfindung

[0008] Die jetzigen Erfinder isolierten und charakterisierten zahlreiche Subklone von gut charakterisierten nierenepithelialen LLC-PK1-Zelllinien, die insgesamt einen breiten Bereich von stabil transfizierten menschlichen PTHR_Rs exprimieren. Es kam vor, dass, wie bei dem Ratten-PTH_R, der menschliche Rezeptor bei Rezeptorexpressionsgraden weit unter denen, die für die PLC-Aktivierung benötigt werden, AC maximal aktiviert. Weiter ist das zeitliche Muster und das Ausmaß der PLC-Aktivierung in diesen Zellen stark abhängig von der Dichte der menschlichen PTHR_Rs auf der Zelloberfläche jenseits eines Bereichs der Expression über dem, der eine maximale AC-Aktivierung auslöst. Überraschenderweise kam es vor, dass hPTH(1-31) und hPTH(1-34) PLC und zytosolisch freie Kalziumübergänge entsprechend per menschlicher PTHR aktivieren und zudem, dass hPTH(1-31) andere, eher zeitverzögerte biologische Antworten auf PTH in diesen Zellen vollständig induziert, was von cAMP-unabhängigen Signalwegen abhängt. Diese Entdeckungen weisen auf eine mögliche physiologische Funktion der PTHR-Regulation und unterschiedliche Signalwirkung in der Gestaltung der ganzheitlichen Zellantwort in Geweben wie Knochen oder Niere und sie lassen erkennen, dass die Ligandenselektivität der menschlichen PTHR_Rs sich von der der PTHR_Rs anderer Arten unterscheiden kann.

[0009] Auch haben die jetzigen Erfinder einen komfortablen und sensitiven spektrophotometrischen Biotest entwickelt, der auf die Aktivierung von entweder AC oder PLC per menschliche PTHR in diesen Zellen antwortet, und haben ihn, zusammen mit anderen Messmethoden, angewendet, um zu zeigen, dass Analoga wie PTH(3-34) und PTH(1-31), vorher entdeckt als signalselektive Agonisten in Rattenzellen, verschiedene Spektren biologischer Aktivitäten per menschliches PTHR aufweisen können.

[0010] Die jetzigen Erfinder stellen ein Verfahren bereit zum Bestimmen, ob eine interessierende Verbindung ein Agonist oder Antagonist eines Gq Protein gekoppelten Rezeptors ist, umfassend:

- a) Bereitstellen einer Zelllinie, die Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (u-PA) exprimiert und welche eine inhibierte Proteinkinase A (PKA) Aktivität aufweist;
- b) Bereitstellen eines Expressionsvektors, umfassend eine Nukleotidsequenz, die für einen Gq Protein gekoppelten Rezeptor kodiert, wobei der Rezeptor normalerweise nicht in der Zelllinie von Schritt a) exprimiert

wird.

- c) Einbringen des Expressionsvektors in die Zelllinie, dabei Bereitstellen von stabil transfizierten Zellen;
- d) Kontaktieren der stabil transfizierten Zellen mit der interessierenden Verbindung; und
- e) Messen der u-PA-Aktivität des Zellkulturenüberstandes der Zellen des Schritts d).

[0011] Die vorliegende Erfindung umfasst weiter ein Verfahren zur Bestimmung, ob die interessierende Verbindung ein Agonist oder Antagonist eines Gq gekoppelten Rezeptors ist, unter Verwendung von LLC-PK1-Zellen, die eine inhibierte Proteinkinase A (PKA) Aktivität aufweisen, mit dem oben beschriebenen Verfahren. Die vorliegende Erfindung stellt weiter ein Verfahren zur Bestimmung, ob eine interessierende Verbindung ein Agonist oder Antagonist von menschlichen PRHR ist, mit dem oben beschriebenen Verfahren bereit.

Kurzbeschreibung der Abbildungen

[0012] [Abb. 1A–Abb. 1B](#). Kompetitive Radioligand-Bindung an menschliche PTH/PTHrp-Rezeptoren, die in LLC-PK1-Zellen stabil exprimiert werden. LLC-PK1-Zellen, die ([Abb. 1A](#)) 950.000 Rezeptoren/Zelle (HKRK B7) oder ([Abb. 1B](#)) 280.000 Rezeptoren/Zelle (HKRK B28) stabil exprimieren, wurden mit ^{125}I -[Nle^{8,18}, Tyr³⁴]bPTH(1-34) in Bindepuffer für 6 Std. bei 15°C in der Gegenwart oder Abwesenheit von steigenden Konzentrationen an nicht radioaktiven Liganden inkubiert. Scatchard-Plots werden in den Einsätzen gezeigt. Jeder Punkt stellt den Mittelwert $\pm$ [SEM] der dreifachen Bestimmungen dar. Die Gesamtbindung der Radioliganden bewegt sich von 15.000-30.000 cpm/Vertiefung, und die nichtspezifische Bindung war 2-5 % der Gesamtbindung.

[0013] [Abb. 2A–Abb. 2B](#). Stimulierung der cAMP-Anreicherung in LLC-PK1-Zellen, menschliche PTH/PTHrp-Rezeptoren exprimieren. Zyklisches AMP wurde in sauren Extrakten von Zellen gemessen, die nach der Zugabe von gekennzeichneten Peptiden und einer Inkubation bei 37°C für 20 min präpariert wurden. [Abb. 2A](#) zeigt die Antworten auf hPTH(1-34), bei den angegebenen Konzentrationen, in HKRK B7 Zellen (•; 950.000 Rezeptoren pro Zelle) und HKRK B28 Zellen (o; 280.000 Rezeptoren pro Zelle). [Abb. 2B](#) zeigt die Antworten in HKRK B28 Zellen auf: hPTH(1-34) (o), hPTH(1-31) (Δ), hPTH(3-34) ($\blacksquare$), hPTH(7-34) ($\square$), PTHrp(1-36) ($\blacksquare$) und sCT ($\blacktriangle$). Ergebnisse werden als Mehrfaches des Grundwerts dargestellt. Jeder Punkt stellt den Mittelwert $\pm$ SEM der dreifachen Bestimmungen dar.

[0014] [Abb. 3](#). Einfluss der PTH/PTHrp-Rezeptordichte auf die Maximalaktivierung von PLC durch PTH in LLC-PK1-Zellen, menschliche Rezeptoren exprimieren. Der Maximalanstieg der IP_3 -Produktion, dargestellt als Prozentanteil eines Grundwerts, wird für LLC-PK1-Zellen, die verschiedene Dichten von menschlichen ($\blacksquare$) und Ratten- ($\square$) PTH/PTHrp-Rezeptoren exprimieren, gezeigt. Zellen wurden für 30 min mit hPTH(1-34) bei einer Konzentration von 1000 nM stimuliert, welche die Maximalaktivierung dieser Antwort auslöst (s. [Abb. 4B](#)). Jeder Punkt stellt den Mittelwert $\pm$ SEM von drei Experimenten, dreifach ausgeführt, dar. Das Verhältnis zwischen PLC-Aktivität und Rezeptorexpression wird schematisch durch die gestrichelten Linien für die Ratten- (links) und die menschlichen (rechts) Rezeptoren gezeigt.

[0015] [Abb. 4A–Abb. 4B](#). Vergleich von Zeit- und Dosis-Abhängigkeit der IP_3 -Produktion zwischen HKRK B7 und HKRK B28 Zellen. [Abb. 4A](#) zeigt HKRK B7 Zellen (•) und HKRK B28 Zellen (o), die mit hPTH(1-34) (1000 nM) für die angegebene Zeit stimuliert wurden. [Abb. 4B](#) zeigt Zellen, die mit hPTH(1-34) bei den angegebenen Konzentrationen für 30 min (HKRK B7) oder 4 min (HKRK B28) stimuliert wurden. Ergebnisse werden als Prozent des Grundwerts dargestellt und jeder Punkt ist der Mittelwert $\pm$ SEM von drei Experimenten, dreifach ausgeführt.

[0016] [Abb. 5A–Abb. 5D](#). Antwort von zytosolischem freiem Kalzium auf hPTH in LLC-PK1-Zellen, die menschliche PTH/PTHrp-Rezeptoren exprimieren. Zytosolisches freies Kalzium wurde in Fura-2-AM-angereicherten zusammenfließenden einschichtigen Zellrasen gemessen. Antworten wurden gemessen in HKRK B7 Zellen nach Zugabe von hPTH(1-34) ([Abb. 5A](#)) oder hPTH(1-31) ([Abb. 5B](#)); in HKRK B28 Zellen nach hPTH(1-34) ([Abb. 5C](#)); und in AB45 Zellen nach hPTH(1-34) ([Abb. 5D](#)). Grundkonzentrationen an zytosolischem freiem Kalzium und diejenigen nach Zugabe von sCT in diesen Zelllinien waren nahezu identisch – z. B. 20-50 nM bzw. 400-500 nM. Diese gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens 5 unabhängige Versuche mit jeder Zelllinie.

[0017] [Abb. 6A–Abb. 6B](#). Stimulierung von Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (u-PA) Sekretion durch LLC-PK1 Zellen. Urokinase-Typ Plasminogenaktivator-Aktivität wurde im aufbereiteten Medium von ([Abb. 6A](#)) HKRK B7 Zellen oder ([Abb. 6B](#)) HKRK B28 Zellen gemessen, 16 Std. nach Zugabe von Agonisten wie folgt:

hPTH(1-34) (Konzentration angegeben in nM), 8BrcAMP (1 mM), TPA (100 nM) oder sCT (1000 nM). Ergebnisse sind in Ploug units/Vertiefung angegeben, wobei gereinigte menschliche Urokinase als Standard benutzt wird. Jeder Balken stellt den Mittelwert $\pm$ SEM von einem repräsentativen Experiment dar, das dreifach ausgeführt wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden in über 10 Einzelexperimenten erreicht.

[0018] Abb. 7. Stimulierung von u-PA-Aktivität in LLC-PK1-Zellen, die dominant-negative Inhibierung von Proteinkinase A exprimieren. Sekretion von u-PA wurde nach 16 Std. nach Zugabe von Agonist zu AB45 Zellen gemessen, welche menschliche PTHRs und REV AB, ein dominant-negativer Inhibitor von PKA, co-exprimieren. Ergebnisse sind in Ploug units/Vertiefung angegeben, wobei gereinigte menschliche Urokinase als Standard benutzt wird. Jeder Punkt stellt den Mittelwert $\pm$ SEM von einem repräsentativen Experiment dar, das dreifach ausgeführt wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden in mindestens 5 Einzelexperimenten erreicht.

[0019] Abb. 8. Regulierung der Phosphataufnahme durch PTH in HKRK B7 und HKRK B28 Zellen. Phosphataufnahme wurde in HKRK B7 Zellen (ausgefüllte Balken) und HKRK B28 Zellen (leere Balken) nach einer Inkubation für 6 Std. in serumfreiem Medium, enthaltend Vehikel, hPTH/PTHrp-Peptide (1000 nM), BBrcAMP (1 mM), TPA (100 nM) oder sCT (1000 nM), gemessen. Vorbereitende Experimente (nicht gezeigt) zeigten Maximalantworten auf hPTH/PTHrp-Peptide bei Konzentrationen von 1000 nM oder darüber. Ergebnisse sind als Prozentanteil des Grundwerts dargestellt und jeder Balken repräsentiert den Mittelwert $\pm$ SEM eines repräsentativen Experiments, das dreifach ausgeführt wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden in mindestens 5 Einzelexperimenten erreicht.

[0020] Abb. 9. Stimulierung von u-PA-Sekretion durch hPTH(1-31) und hPTH(1-34) in HKRK B7 Zellen. Urokinase-Typ PA Aktivität wurde 16 Std. nach Zugabe von hPTH(1-34) (•) oder hPTH(1-31) (Δ) bei den angegebenen Konzentrationen gemessen und sind in Ploug units/Vertiefung angegeben, wobei gereinigte menschliche Urokinase als Standard benutzt wird. Jeder Punkt ist der Mittelwert $\pm$ SEM eines repräsentativen Experiments, das dreifach ausgeführt wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden in mindestens 6 Einzelexperimenten erreicht.

[0021] Abb. 10. Stimulierung der Anreicherung von zyklischem AMP durch hPTH(1-31) und hPTH(1-34) in LLC-PK1 Zellen, die Ratten-PTHRs exprimieren. Anreicherung von zyklischem AMP wurde als Antwort auf hPTH(1-34) (•) oder hPTH(1-31) (Δ) in EWS Zellen gemessen, die 320.000 Ratten-PTHRs pro Zellen exprimieren. Ergebnisse sind als Mehrfaches des Grundwertes dargestellt.

[0022] Die obigen Abbildungen sind hilfreich zum Verständnis der Erfindung und beziehen sich auf die Referenzbeispiele 1-3.

Detaillierte Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

[0023] Die jetzigen Erfinder haben LLC-PK1-Zelllinien entwickelt, welche menschliches PTHR exprimieren. Die vorliegenden Untersuchungen von klonierten LLC-PK1-Zelllinien, die insgesamt einen breiten Bereich der Expression von stabil transfizierten menschlichen PTHRs umspannen, haben abhängig von der Rezeptordichte Unterschiede in hPTH-Signalwirkung und biologischer Aktivität gezeigt, die eine wichtige Funktion für die Regulierung der Expression menschlicher Rezeptoren beim Anpassen der Art, als auch des Ausmaßes, der Zellantwort auf das Hormon erkennen lassen.

[0024] Eine stabil transfizierte Zelllinie wird verwendet, umfassend LLC-PK1 Zellen, welche menschliche PTHR exprimieren. Eine Zelllinie ist eine Population von Zellen desselben Typs, die zum unbestimmten Überleben in Kultur imstande ist. Mit „stabil transfizierter Zelllinie“ ist gemeint, dass die Zelllinie in einer Weise geändert worden ist, um ein Polypeptid zu exprimieren, welches es normalerweise nicht exprimiert. Mit „exprimieren“ ist gemeint, dass ein Strukturgen in mRNA transkribiert wird und dass diese mRNA translatiert wird, um ein Polypeptid zu produzieren. LLC-PK1-Zellen sind Schweinenierenepithelzellen, welche Calcitonin- und Vasopressinrezeptoren exprimieren, aber normalerweise nicht PTHR exprimieren und von der American Type Culture Collection, ATCC Nr. CL-101, erhältlich sind. Der menschliche PTHR ist ein Rezeptor, welcher sowohl menschliches PTH als auch menschliches PTHrP binden kann. Der menschliche PTHR ist bisher kloniert worden (Schneider et al., Eur. J. Pharmacol. 246, 149-155 (1993); Adams et al., Biochem. 34, 10553-10559 (1995)). Darum werden LLC-PK1-Zellen, die menschliche PTHR exprimieren, "stabil transfiziert" genannt.

[0025] Es wurde bereits gezeigt, dass u-PA von LLC-PK1-Zellen als Antwort auf die Aktivierung von sowohl PKA- als auch PKC-Wegen durch Calcitonin abgesondert wird (Jans, D. A., und Hemmings, B. A., FEBS Lett 205:127-131 (1986)). Die jetzigen Erfinder haben noch einmal bestätigt, dass, in LLC-PK1-Zellen, sowohl

PKA- als auch PKC-Wege mit der u-PA-Produktion verknüpft sind. Die jetzigen Erfinder haben einen spektrophotometrischen Biotest entwickelt, der die u-PA-Produktion, und damit die PKA- oder PKC-Aktivierung, in diesen Zellen misst. Gs und Gq Proteine aktivieren den PKC-Weg und steigern damit die u-PA-Produktion in LLC-PK1-Zellen. Ein Agonist eines Gs oder Gq Protein gekoppelten Rezeptors steigert die u-PA-Produktion in Zellen, welche u-PA exprimieren. Ein Antagonist eines Gs oder Gq Protein gekoppelten Rezeptors inhibiert die Aktivität eines Gs oder Gq Protein gekoppelten Rezeptoragonisten, dabei nimmt die u-PA-Produktion in Zellen, die u-PA exprimieren, bezüglich allein zugegebenen Agonisten ab.

[0026] Andere Zelllinien als LLC-PK1 exprimieren u-PA. Diese Zelllinien könnten, wenn sie inhibierte Proteinkinase A (PKA) Aktivität aufweisen, unter Verwendung des Verfahrens der vorliegenden Erfindung genutzt werden, um zu bestimmen, ob eine Verbindung ein Agonist oder Antagonist eines Gq Protein gekoppelten Rezeptors ist. Beispiele von Zelllinien, die u-PA exprimieren, schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf: HE-LU (Rifkin) (ATCC Nr. CRL-7717); LLC-MK2 (ATCC Nr. CCL-7); NMR (ATCC Nr. CRL 1743); LLC-RK1 (ATCC Nr. CCL-106); und MIA PaCa-2 (CRL-1420).

[0027] Daher schließt eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung, ob eine interessierende Verbindung ein Agonist oder Antagonist eines Gq Protein gekoppelten Rezeptors ist, ein, umfassend:

- a) Bereitstellung einer Zelllinie, die Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (u-PA) exprimiert und die eine inhibierte Proteinkinase A (PKA) Aktivität aufweist;
- b) Bereitstellung eines Expressionsvektors, umfassend eine Nukleotidsequenz, die für einen Gq Protein gekoppelten Rezeptor kodiert, wobei der Rezeptor normalerweise nicht in der Zelllinie von Schritt a) exprimiert wird;
- c) Einbringen des Expressionsvektors in die Zelllinie, wodurch stabil transfizierte Zellen bereitgestellt werden;
- d) Kontaktieren der stabil transfizierten Zellen mit der interessierenden Verbindung; und
- e) Messen der u-PA-Aktivität des Zellkulturüberstands der Zellen von Schritt d).

[0028] Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Bestimmung, ob eine interessierende Verbindung ein Agonist oder Antagonist eines Gq Protein gekoppelten Rezeptors ist, unter Verwendung des oben beschriebenen Verfahrens. Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Bestimmung, ob eine interessierende Verbindung ein Agonist oder Antagonist eines Gq Protein gekoppelten Rezeptors ist, unter Verwendung von LLC-PK1-Zellen im oben beschriebenen Verfahren, die eine inhibierte Proteinkinase (PKA) A Aktivität aufweisen. Eine andere besonders bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Bestimmung, ob eine interessierende Verbindung ein Agonist oder Antagonist von menschlichen PTHR ist, unter Verwendung des oben beschriebenen Verfahrens.

[0029] Eine „interessierende Verbindung“ könnte ein Peptid, ein Polypeptid, ein Fragment eines Polypeptids, ein biologisch neutrales Molekül oder ein synthetisches Molekül sein. Beispiele von Verbindungen, die Agonisten oder Antagonisten von Gq Protein gekoppelten Rezeptoren sein könnten, sind Hormone, Hormonanaloga und Antikörper.

[0030] Ein „Agonist eines Gq Protein gekoppelten Rezeptors“ ist eine Verbindung, die mit einem Gq Protein gekoppelten Rezeptor wechselwirkt und den Gq Protein gekoppelten Rezeptor aktiviert. Ein „Antagonist eines Gq Protein gekoppelten Rezeptors“ ist eine Verbindung, die die agonistinduzierte Aktivierung eines Gq Protein gekoppelten Rezeptors inhibiert.

[0031] Ein „Gq Protein gekoppelter Rezeptor“ ist ein Rezeptor, der, wenn er an seinen dazugehörigen Liganden gebunden ist, ein Gq Protein aktiviert. Einige Rezeptoren können sowohl Gs als auch Gq Proteine aktivieren, während einige nur Gq Proteine aktivieren. Vorzugsweise sollten die Gq Protein gekoppelten Rezeptoren, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, imstande sein, Gq Proteine der Zellen zu aktivieren, die in dem Verfahren der vorliegenden Erfindung genutzt werden. Beispiele von Gq Protein gekoppelten Rezeptoren schließen ein, aber sind nicht beschränkt auf, das TRH-, Thrombin- und PGF_{2α}-Rezeptoren. Ein Beispiel eines Rezeptors, der sowohl Gs als auch Gq Proteine aktiviert, ist der Calcitonin-Rezeptor.

[0032] Wie hier verwendet ist ein „Expressionsvektor“ ein Vektor umfassend ein Strukturgen, das mit einer Expressionskontrollsequenz betriebsfähig gekoppelt ist, so dass das Strukturgen exprimiert werden kann, wenn der Expressionsvektor in einer geeigneten Gastzelle stabil transfiziert ist. Zwei DNA-Sequenzen werden „betriebsfähig gekoppelt“ genannt, wenn die Art der Kopplung zwischen den Nukleinsäuremolekülen nicht (1)

zu der Einleitung einer Rasterverschiebungsmutation führt, (2) die Fähigkeit der Promotorregionsequenz, die Transkription der gewünschten Sequenz zu steuern, beeinträchtigt oder (3) die Fähigkeit der gewünschten Sequenz, durch die Promoterregionsequenz transkribiert zu werden, beeinträchtigt. Darum würde eine Promotorregion mit einer gewünschten Nukleinsäuresequenz betriebsfähig gekoppelt sein, wenn der Promotor imstande wäre, eine Transkription dieser Nukleinsäuresequenz hervorzurufen. Bevorzugte Promotoren schließen den Promotor des Mäuse-Metallothionein-I-Gens (Hamer, D. et al., J. Mol. Appl. Gen. 1, 273-288 (1982)), den HSV-Thymidin-Kinase Promoter (McKnight, S. Cell 31, 355-365 (1982)) oder den frühen Promotor des SV40 (Benoist, C. et al., Nature 290, 304-310 (1981)) ein.

[0033] Die Expression von Gq Protein gekoppelten Rezeptoren in Zellen kann durch Einführung einer Verstärkersequenz in den Expressionsvektor gesteigert werden. Verstärker sind cis-acting-Elemente der DNA, allgemein mit einer Größe von ungefähr 10 bis 300 bp, die wirken, um die Transkriptionsaktivität eines Promotors zu steigern. Erläuternde Beispiele von Verstärkern schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf, den SV40-Verstärker, der auf der späten Seite des Replikationsstartpunkts bei 100 bis 270 bp gelegen ist; der Verstärker des frühen Promotors des Zytomegalie-Virus; der Verstärker des Polyomavirus auf der späten Seite des Replikationsstartpunkts; und den Verstärker des Adenovirus.

[0034] Die Expressionsvektoren können eine induzierbare Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Bevorzugt von diesen Vektoren sind Vektoren, die eine Expression ermöglichen, die durch Umweltfaktoren induzierbar ist, die leicht zu manipulieren sind, wie Temperatur oder Nährstoffzusätze.

[0035] Die Expressionsvektoren können auch einen selektierbaren Marker zur Vermehrung in stabil transfizierten Zellen enthalten. Repräsentative Beispiele selektierbarer Marker schließen Dihydrofolatreductase-, Hygromycin- oder Neomycin-Resistenz ein.

[0036] Ein Expressionsvektor kann kommerziell bereitgestellt werden oder er kann durch irgendein Klonierungsverfahren, das auf dem Gebiet gut bekannt ist, hergestellt werden. Bevorzugte Expressionsvektoren schließen ein, aber sind nicht beschränkt auf, pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 und pSG erhältlich bei Stratagene; psVK3, pBPV, pMSG und pSVL erhältlich bei Pharmacia und pcDNA1neo erhältlich bei Invitrogen. Andere geeignete Vektoren werden dem Fachmann leicht ersichtlich sein.

[0037] Der Expressionsvektor kann in die Gastzelle durch eine geeignete Methode eingeführt werden, die die Infektion, Transduktion, Transfektion, Transvektion, Elektroporation und Transformation einschließen. Solche Verfahren werden in vielen Standardlaborhandbüchern, wie Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986), beschrieben.

[0038] Mit „nicht normalerweise in der Zelllinie exprimiert“ ist gemeint, dass der Gq Protein gekoppelte Rezeptor nicht in einer feststellbaren Höhe in der Zelllinie, die in dem Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendet wird, exprimiert wird.

[0039] Mit „Kontaktieren der stabil transfizierten Zellen mit einer interessierenden Verbindung“ ist gemeint, dass die interessierende Verbindung zu den stabil transfizierten Zellen in irgendeinem geeigneten Verfahren zugegeben werden. Dies kann das exogene Zugabe der Verbindung in vitro oder in vivo oder zudem die Transfektion der Zellen, um die Verbindung zu exprimieren, einschließen. Wenn die Verbindung exogen zugegeben wird, kann ein Carrier verwendet werden. Der Carrier sollte kompatibel mit der Lebensfähigkeit der Zelle sein. Beispiele für Carrier schließen ein, aber sind nicht beschränkt auf, DMSO, MeOH/EtOH, Wasser, Tris und HEPES.

[0040] Die interessierende Verbindung kann hoch aufgereinigt, teilgereinigt oder ungereinigt sein. Interessierende Verbindungen können allein oder in Kombination zu stabil transfizierte Zellen zugefügt werden. Beim Zufügen der Verbindungen in Kombination können synergistische Effekte auf den Gq gekoppelten Rezeptor festgestellt werden.

[0041] Mit „Messen der u-PA-Aktivität“ wird qualitatives oder quantitatives Messen oder Abschätzen des Grades der u-PA-Aktivität entweder direkt (z. B. durch Bestimmen oder Abschätzen der absoluten u-PA-Aktivität) oder relativ (z. B. durch Vergleich der u-PA-Aktivität der stabil transfizierten Zelllinie, die mit einer interessierenden Verbindung kontaktiert wurde, mit einer stabil transfizierten Kontrollzelllinie, die nicht mit der interessierenden Verbindung kontaktiert wurde) angestrebt. Vorzugsweise wird die u-PA-Aktivität in der stabil transfizierten Zelllinie, die mit einer interessierenden Verbindung kontaktiert wurde, mit der u-PA-Aktivität von entweder einer stabil transfizierten Zelllinie, die nicht mit der interessierenden Verbindung kontaktiert wurde, oder einer

untransfizierten Zelllinie, die mit der gleichen interessierenden Verbindung kontaktiert wurde, oder mit beiden verglichen werden.

[0042] Ein bevorzugtes Verfahren zur Messung der u-PA-Aktivität wird unten in Beispiel 3 beschrieben. In Kürze, ein Aliquot des Überstandes von stabil transfizierten Zellen wird auf eine saubere Mikroplatte übertragen. Ein „Überstand“ ist das flüssige Medium, das von den Zellen entfernt wurde. Ein Puffer zum Testen der u-PA-Aktivität wird zugegeben. Die Mikroplatte wird für eine geeignete Zeitdauer inkubiert und die Reaktionen werden mit dem Beendigungspuffer gestoppt. Das Absorptionsvermögen des kolorimetrischen Produkts wird gemessen.

[0043] Vorzugsweise wird bei der Bestimmung, ob die interessierende Verbindung ein Agonist ist, die Verbindung zu einer stabil transfizierten Zelllinie zugefügt und der Grad der u-PA-Aktivität wird gemessen oder abgeschätzt und mit dem Grad der u-PA-Aktivität in stabil transfizierten Zelllinien, die nicht in Kontakt mit der interessierenden Verbindung gekommen sind, verglichen.

[0044] Bei der Bestimmung, ob eine interessierende Verbindung ein Antagonist ist, sollten sowohl die interessierende Verbindung als auch ein bekannter Agonist zu den stabil transfizierten Zellen zugefügt werden. Der Agonist und der potentielle Antagonist können in irgendeiner Reihenfolge (z. B. der Agonist zuerst und dann der potentielle Antagonist oder der potentielle Antagonist zuerst und dann der Agonist) sowie gleichzeitig zugefügt werden. Nach Kontaktieren der Zellen mit sowohl einem Agonisten als auch der interessierenden Verbindung, wird der Grad der u-PA-Aktivität in den stabil transfizierten Zellen gemessen oder abgeschätzt und mit dem Grad der u-PA-Aktivität in stabilen transfizierten Zellen verglichen, die allein mit dem Agonisten kontaktiert wurden.

[0045] Nachdem die Erfindung allgemein beschrieben wurde, wird das Gleiche leichter in Bezug auf die folgenden Beispiele verstanden werden, die nur zur Verdeutlichung beigebracht werden.

Beispiel 1

Plasmid-Transfektion und Isolation von Klonen

[0046] Die klonierte Zelllinie LLC-PK1, die aus der Schweineniere abgeleitet wurde, (Brighurst, F. R., et al., Endocrinology 132, 2090-2098 (1993)) und Subklone, die nach der stabilen Transfektion mit menschlicher PTH/PTHrP-Rezeptor-cDNA isoliert wurden, wurden in DMEM, das mit 7 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin mit oder ohne 1000µg/ml G418 (alle von GIBCO-BRL, Grand Island, N.Y.) ergänzt wurde, bei 5 % CO₂ in Luft aufbewahrt. Um Zelllinien zu präparieren, die die menschlichen PTH/PTHrP-Rezeptoren exprimieren, wurde der zusammenfließende einschichtige Zellrasen mit einer menschlichen PTH/PTHrP-Rezeptor-cDNA in ganzer Länge, die in dem Expressionsvektor pcDNA1neo von Säugetieren (Invitrogen, Sand Diego, Calif.) aufgebaut wurde, transfiziert (Schipani, E., et al., Science 268, 98-100 (1995)). In einigen Fällen wurden die Zellen mit der Rezeptor-cDNA und einem Plasmid, der für eine dominant-negative PKA-regelnde Untereinheit-Mutante, „REV AB“, kodiert, co-transfiziert (Clegg, C. H., et al., J. Biol Chem 262, 13111-13119 (1987)). Transfektionen wurden unter Verwendung der Kalziumphosphat-Ausfällungstechnik, wie bereits beschrieben (Brighurst, F. R., et al., Endocrinology 132, 2090-2098 (1993)), durchgeführt.

[0047] Elf klonierte Zelllinien wurden aus einer Gesamtmenge von über 100 unabhängigen Subklonen ausgewählt, um ein breites Angebot an Rezeptorexpression beizubringen (Tabelle 1).

Tabelle 1. Expression des menschlichen PTH/PTHrP-Rezeptors und Signalwirkung in klonierten LLC-PK1-Zellen

[0048] Subklone von LLC-PK1-Zellen, die mit hPTHr-cDNA stabil transfiziert wurden, wurden mit kompetitiver Radioliganden- (Scatchard) Bindungsanalyse und bei maximalen Signalantworten (Mittelwert ± SD Mehrfaches oder Prozent des Grundwertes) auf hPTH(1-34) (1000 nM) analysiert. Alle Werte wurden von mindestens zwei oder drei Experimenten, die dreifach ausgeführt wurden, erhalten. Anhäufung zyklischer AMP und IP₃-Bildung in Kontrollversuchen bewegten sich von 3 bis 10 pmol/Vertiefung bzw. von 1000 bis 1500 cpm/Vertiefung.

Tabelle 1

Subklone	Rezeptor Anzahl/Zelle ($\cdot 10^3$)	Sichtbarer K_d (nM)	cAMP- Anreicherung	IP ₃ -Bildung (% des Grundwertes)
Menschlicher Rezeptor				
HKRK B64	90	1,3	13 ± 2	116 ± 18
HKRK C53	120	1,2	58 ± 16	112 ± 4
HKRK B28	280	1,8	103 ± 17	107 ± 1
HKRK C101	330	1,6	94 ± 1	114 ± 11
HKRK C27	340	2,2	64 ± 8	113 ± 10
HKRK C30	600	2,8	--	192 ± 44
HKRK B5	840	3,9	--	462 ± 47
HKRK B57	900	5,6	--	243 ± 31
HKRK B7	950	4,5	99 ± 10	298 ± 21
HKRK B54	1020	6,4	--	287 ± 19
HKRH C58	1030	3,6	--	642 ± 106
Rattenrezeptor				
EW29	190	2,5	148 ± 16	289 ± 16
EW5	320	2,3	130 ± 6	480 ± 14

Beispiel 2

Radioligandenbindung

[0049] Eine spezifische Bindung an den PTH/PTHrP-Rezeptor wurde mit einigen Modifikationen wie bereits beschrieben (Brighurst, F. R., et al., Endocrinology 132, 2090-2098 (1993)) gemessen. In Kürze, die Zellen wurden in Platten mit 24 Vertiefungen bzw. 24-well-Platten bei einer Dichte von $2,5 \cdot 10^5$ Zelle/Vertiefung verteilt und für weitere zwei Tage vor der Untersuchung kultiviert. Die Zellrasen wurden mit eiskaltem Puffer A [50 mM Tris-HCl (pH 7,7), 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 0,5 % FBS und 5 % heißenaktiviertes Pferdeserum] gespült und dann mit ¹²⁵I-gekennzeichnetem [Nle^{8,18}, Tyr³⁴] Rinder- (b) PTH(1-34) ($1 \cdot 10^5$ cpm/Vertiefung) mit oder ohne gekennzeichnetem Peptid in 0,5 ml Puffer A für 6 Std. in einem kalten Raum (2-8°C) inkubiert. Die Bindungsreaktion wurde durch Absaugen des Inkubationsgemischs beendet, wonach die Zellen zweimal mit 0,5 ml des eiskalten Puffers A gewaschen wurden. Nach Auflösen der Zellen mit 0,5 ml Lysis-Puffer (0,5 N NaOH + 0,1 % Triton X-100) wurden Messungen der Radioaktivität und Proteinmessungen durchgeführt, um die Rezeptoranzahl pro Zelle durch Scatchard-Analyse zu berechnen, wie bereits beschrieben (Brighurst, F. R., et al., Endocrinology 132, 2090-2098 (1993)). Alle Reagenzien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Sigma (St. Louis, MO) bezogen und alle Isotope wurden von Dupont-New England Nuclear (Boston, MA) erworben. Das [Nle^{8,18}, Tyr³⁴]bPTH(1-34) wurde durch das Chloramine-T-Verfahren radioiodiert und wie bereits beschrieben gereinigt (Brighurst, F. R., et al., Endocrinology 132, 2090-2098 (1993)).

[0050] Radioliganden-Konkurrenz-Tests und Scatchard-Analysen für zwei repräsentative Zelllinien, HKRK

B7 und HKRK B28, die 950.000 bzw. 280.000 hPTHrRs pro Zelle exprimieren, sind in **Abb. 1** gezeigt. Eine Scatchard-Analyse für alle der ausgewählten Zelllinien zeigte im Bereich der PTHR-Expression von 90.000 bis 1.000.000 aktive Stellen pro Zelle mit sichtbaren K_d 's zwischen 1 und 7 nM (Tabelle 1). In jedem einzelnen Fall war die Scatchard-Analyse linear, vereinbar mit einer einzigen Klasse von hochaffinen Bindungsstellen. Das nachfolgende Beispiel, das unten beschrieben wird, wurde an zwei Zelllinien durchgeführt, die als repräsentativ aus denen ausgesucht wurden, die relativ hohe (HKRK B7) bzw. niedrige (HKRK B28) Dichten an hPTHrRs exprimieren.

Beispiel 3

Signalwirkung menschlicher PTHR in LLC-PK1-Zellen

Verfahren

Peptide und andere Reagenzien

[0051] Alle Reagenzien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Sigma (St. Louis, MO) bezogen und alle Isotope wurden von Dupont-New England Nuclear (Boston, MA) erworben. [$\text{Nle}^{8,18}$, Tyr^{34}]bPTH(1-34), [Tyr^{34}]hPTH(1-34), hPTH(1-31), hPTH(3-34), hPTH(7-34) und PTHrp(1-36) wurden mit carboxyl-terminalen Amidgruppen synthetisiert. Das [$\text{Nle}^{8,18}$, Tyr^{34}]bPTH(1-34) wurde durch das Chloramine-T-Verfahren radioiodiert und wie bereits beschrieben gereinigt (Bringinghurst, F. R., et al., Endocrinology 132, 2090-2098 (1993))

Zelluläre cAMP-Anhäufung

[0052] Zellen wurden in 24-well-Platten mit einer Dichte von $2,5 \cdot 10^5$ Zellen/Vertiefung verteilt und für weitere zwei Tage vor der Untersuchung kultiviert. Die Zellen wurden mit 0,5 ml eiskaltem Puffer B [10 mM HEPES (pH 7,4), 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 1,2 mM Na_2HPO_4 , 5 mM Glucose und 0,1% heißinaktiviertes BSA], der mit 1 mM Isobutylmethylxanthin (IBMX) ergänzt wurde, gespült und auf Eis gelegt. Die Aufbereitungen wurden zu jeder Vertiefung in 0,25 ml IBMX-ergänzten Puffer zugefügt, nach denen die Platten bei 37°C für 15 Minuten inkubiert wurden. Der Puffer wurde dann schnell abgesaugt, die Platten wurden schnell in flüssigen Stickstoff gebracht und die gefrorenen einlagigen Schichten wurden nacheinander direkt in 0,5 ml 50 mM HCl aufgetaut. Das extrahierte cAMP wurde dann unter Verwendung eines handelsüblichen RIA-Kits (Dupont-New England Nuclear, Boston, MA) gemessen. Die Ergebnisse wurden als Mehrfaches des Grundwertes ausgedrückt, wobei die Basisgrade sich zwischen 38 und 128 pmol/mg Protein/15 min bewegten. Der Basisgrad der cAMP-Anhäufung in nativen LLC-PK1-Zellen wurde nicht einheitlich in Subklonen verändert, die Wildtypen des PTH/PTHrp-Rezeptors exprimieren.

Inositol-1,4,5-triphosphat- (IP_3) Produktion

[0053] Zellen wurden in 24-well-Platten mit einer Dichte von $2,5 \cdot 10^5$ Zellen/Vertiefung verteilt und für weitere zwei Tage vor der Untersuchung kultiviert. Die Zellen wurden bei 37°C für 16 Std. vor den Tests mit 3 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H]myo-Inositol im Versuchsmedium (serum- und inositolfreies DMEM (GIBCO-BRL, Grand Island, NY) ergänzt mit 0,1 % BSA) gekennzeichnet. Nach Waschen der Zellen mit vorgewärmtem Versuchsmedium, das 30 mM LiCl enthält, wurden sie mit 0,25 ml des Versuchsmediums, das 30 mM LiCl und Stimulatoren (oder Vehikel) enthält, bei 37°C für verschiedene Intervalle (1-30 min) inkubiert. IP_3 -Bildung wurde durch Absaugen und sofortige Zugabe von 0,5 ml eiskaltem 5 %igen TCA gestoppt. Die sauren Extrakte wurden dann zweimal mit zwei Raumteilen wassergesättigtem Ether extrahiert und mit konzentrierter NaOH und Tris-Base (Endkonzentration = 10 mM) vor der Chromatographie auf AG 1X8 Anionenaustauschsäulen (Bio-Rad, Richmond, CA) bei pH 7,4 eingestellt, wie beschrieben (Guo, J., et al., Endocrinology 136, 3884-3891 (1995)). Nach Eluieren der anderen Fraktionen (freies [^3H]myo-Inositol, Glycerophosphat-inositol, IP_1 und IP_2), wurden die IP_3 -Fraktionen gesammelt und ihr Gehalt an Radioaktivität wurde durch Flüssigszintillationsspektroskopie (Beckman, Modell LS 6000IC) bestimmt.

Messung von zytosolischem freiem Kalzium

[0054] Zytosolisches freies Kalzium wurde mittels dualer Fluoreszenz in Zellen gemessen, die mit dem Ca^{2+} -empfindlichen intrazellulären Prüfstoff Fura-2 beschickt wurden. Die Zellen wurden auf Deckgläser mit einer Dichte von 40.000-600.000/cm² verteilt und für zwei Tage wie oben beschrieben inkubiert. Die Deckgläser wurden vor dem Beschicken in phosphatfreiem Puffer B, der 4 μM Fura-2-AM (Molecular Probes, Eugene, OR) enthält, für 30 min bei Raumtemperatur (22°C) zweimal mit PBS gewaschen. Nach zweimaligem Waschen mit

furafreiem Puffer B wurden die Deckgläser in eine Küvette gesteckt, die 2 ml phosphatfreien Puffer B bei 37°C enthielt, und die Emission bei 510 nm wurde als Antwort auf die wechselnde Anregung bei 340 und 380 nm unter Verwendung eines ratiometrischen PTI Deltascan Fluoreszenzspektrometers mit einer Anregungs- und Emissionsbandbreite von 2 nm überwacht. Nach Erreichen einer stabilen Grundlinie wurden die Agonisten mittels Austausch in 2 ml frischen Puffer eingebracht, zu dem 10-20 µl des konzentrierten Agonisten-Vorrats (oder Vehikel allein) zugefügt wurden. Peptid-Vorräte wurden in 0,1 %-iger Trifluoressigsäure angesetzt, Ionomycin und Phorbol ester wurden in Dimethylsulfoxid gelöst und andere Additive wurden in Wasser angesetzt. Maximum und Minimum der Fluoreszenzsignale wurden durch Einwirkung der modifizierten Puffer, die 1 µM Ionomycin plus 20 mM Kalzium bzw. 2 mM EGTA in nomineller Abwesenheit von Kalzium enthalten, erhalten und die Autofluoreszenz wurde mit Hilfe der Signale, die in Gegenwart von Ionomycin plus 2,5 mM MnCl_2 erhalten wurden, abgeschätzt. Zytosolisches freies Kalzium wurden dann wie bereits beschrieben (Bringham, F. R., et al., Endocrinology 132, 2090-2098 (1993)) bestimmt.

Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (u-PA)

[0055] Zellen wurden in 96-well-Platten mit einer Dichte von $6 \cdot 10^4$ Zellen/Vertiefung verteilt und am folgenden Tag verwendet. Die Zellen wurden einmal mit 0,2 ml gewaschen und dann erneut mit 0,1 ml vorgewärmtem DMEM, das 0,05 % BSA enthält, versorgt. Nach dem Zugeben jedes Stimulators wurden die Platten zurück in den Inkubator bei 37°C für 16 Std. gebracht. Aufbereitetes Medium (5 µl) wurde dann aus jeder Vertiefung auf eine saubere Mikroplatte übertragen. Reaktionen wurden durch Zugabe von 50 µl u-PA-Test-Puffer [90 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,45 % Triton X-100, 14 µg/ml menschliches Plasminogen (Calbiochem, San Diego, CA) und 0,4 mg/ml S-2251 Plasminsubstrat (D-Val-Leu-L-Lys-NH-Np) (Sigma, St. Louis, MO)] initiiert. Die Platten wurden erst bei 37°C für 15 min und dann bei Raumtemperatur (22°C) für 30 min inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 10 µl eiskalter 25 %-iger Essigsäure gestoppt. Das Absorptionsvermögen des kolorimetrischen Produkts wurde bei 40 nm innerhalb 1 Std. gemessen. Die Aktivität wurde in Ploug units/Vertiefung angegeben, wobei gereinigte menschliche Urokinase (Calbiochem) als Standard benutzt wurde.

Zelluläre Phosphataufnahme

[0056] Zellen wurden in 24-well-Platten mit einer Dichte von $2,5 \cdot 10^5$ Zellen/Vertiefung verteilt und für weitere zwei Tage vor der Untersuchung kultiviert. 24 Stunden vor dem Versuch wurden die Zellen erneut mit 0,5 ml DMEM, das 0,1 % BSA enthält, versorgt. Am nächsten Tag wurden die Zellen erneut mit serumfreiem Medium (DMEM + 0,1 % BSA) versorgt, das Wirkstoffe oder Peptide enthält, und die Inkubationen wurden bei 37°C bei 5 % CO_2 in Luft für weitere 6 Std. fortgeführt. Die Zellen wurden dann mit vorgewärmten Puffer B ohne BSA und Na_2HPO_4 gewaschen und wurden dann bei 37°C für 5 min in 0,25 ml desselben Puffers, der [^{32}P]ortho-Phosphate (4 µCi/ml) und 0,1 mM Na_2HPO_4 enthält, inkubiert. Die Phosphataufnahme wurde durch Zugabe von 1 ml eiskaltem natriumfreiem „Stopp-Puffer“ [10 mM HEPES (pH 7,4), 140 mM Cholinchlorid und 5 mM Natriumarsenat] beendet, gefolgt von weiterem zweimaligem Waschen mit demselben Puffer. Die entwässerte Zellschicht wurde dann in 0,5 ml Lysis-Puffer aufgelöst und die mit den Zellen verbundene Radioaktivität wurde mittels Cerenkov-Zählung bestimmt, wie bereits beschrieben (Guo, J., et al., Endocrinology 136, 3884-3891 (1995)).

Ergebnisse

[0057] Die Untersuchungen der Eigenschaften von menschlichen PTHRs, die stabil in LLC-PK1-Zellen exprimiert werden, haben zwei wichtige Beobachtungen gezeigt. Die erste ist die Entdeckung, dass unabhängig von der Ligandenkonzentration die Dichte der menschlichen PTHR auf der Zelloberfläche ein Schlüsselfaktor des Ausmaßes der individuellen Signalantworten auf PTH ist und dass diese Veränderungen über ziemlich unterschiedliche, hauptsächlich nicht-überlappende, Bereiche der Rezeptordichte eintreten. Im Zuge dieser Untersuchungen wurden auch hPTHr-Dichte-abhängige Unterschiede im zeitlichen Profil der PLC-Antwort beobachtet, und ein Hinweis der Funktion für PKA beim Aufrechterhalten des anfänglichen Cytosol-Kalziumsignals, das durch PTH in diesen Zellen ausgelöst wird, wurde erfasst. Die zweite bedeutende Entdeckung ist, dass das mutmaßlich signalselektive PTH-Analogon hPTH(1-31) keinesfalls signalselektiv in Zellen ist, die menschliche PTHRs tragen, auch wenn seine PLC-Aktivierungskapazität in Zellen, die das Ratten-PTHr exprimieren, ziemlich reduziert ist. Diese Ergebnisse weisen auf feine Unterschiede in den Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen zwischen menschlichen PTHRs und den PTHRs anderer Arten und legen nahe, dass aus dem Rattenmodell abgeleitete Schlussfolgerungen mit Vorsicht auf das menschliche PTHR-Expressionssystem übertragen werden sollten.

[0058] Eine maximale PTH-abhängige cAMP-Anreicherung wurde in menschlichen PTHR-transfizierten LLC-PK1-Subklonen nach einer Inkubation für 15 min mit einer hohen Konzentration (1000 nM) an hPTH(1-34) bestimmt (Tabelle 1). Wie bereits für LLC-PK1-Zellen, die Ratten-PTHRs stabil exprimieren (Guo, J., et al., *Endocrinology* 136, 3884-3891 (1995)), berichtet, war die maximal Adenylatcyclase-Antwort von der Dichte der menschlichen PTHR auf der Oberfläche oberhalb eines relativ kleinen Schwellwerts relativ unabhängig (relativ zu dem, der für die PLC-Aktivierung erforderlich ist – s. unten). Im Fall des menschlichen PTHR jedoch scheint dieser Schwellwert zur Sättigung der maximalen AC-Aktivierung zwischen 120.000 und 280.000 (Tabelle 1) zu liegen, was mindestens 6- bis 10-fach höher ist als das, was vorher für die Ratten-PTHR beobachtet wurde (Guo, J., et al., *Endocrinology* 136, 3884-3891 (1995)). Wie erwartet war eine Aktivierung von AC durch hPTH(1-34) in hPTHR-exprimierenden LLC-PK1-Zellen konzentrationsabhängig und wie in [Abb. 2A](#) gesehen waren die EC_{50} 's (näherungsweise 1 nM) und die Maximalantworten in den Zelllinien HKRK B28 und HKRK B7 identisch.

[0059] In vorangehenden Untersuchungen, die die Expression von Ratten PTHR in LLC-PK1-Zellen einschlossen, kam es vor, dass eine maximale PLC-Aktivierung durch PTH, die als bei 30 min eingeführtes Gesamt- IP_3 gemessen wurde, in enger Beziehung mit der Dichte der Ratten-PTHRs über einen weiten Bereich der Expression (z. B. von 20.000 bis 400.000 Rezeptoren pro Zelle) stand, die klar den Schwellwert der Rezeptor-Dichte übertraf, der für die Sättigung der maximalen AC-Aktivierung erforderlich ist (Guo, J., et al., *Endocrinology* 136, 3884-3891 (1995)). Ebenso, wie in [Abb. 3](#) und in Tabelle 1 gezeigt, war die PLC-Aktivierung stark abhängig von der PTHR-Dichte in den LLC-PK1-Subklonen, die menschliche PTHR exprimieren. Wie im Fall der AC-Aktivierung war die relative Effizienz, mit der menschliches PTHR mit PLC gekoppelt ist, in diesen Zellen näherungsweise 3-5-mal weniger als die des Rattenrezeptors – z. B. ungefähr 3-5-mal mehr menschliche als Rattenrezeptoren waren für eine gleichwertige Aktivierung von PLC erforderlich.

[0060] In verschiedenen Zelllinien, die auf PTH reagieren, die eine geringere Anzahl an PTHR exprimieren – z. B. UMR 106 Zellen (näherungsweise 70.000 Rezeptoren pro Zelle) – wurde ein Muster einer sehr schnellen, aber kurzlebigen PLC-Aktivierung beschrieben (Yamaguchi, D. T., et al., *J Biol Chem* 262, 7711-7718 (1987)). Ein Versuch, zu bestimmen, ob solch ein kurzlebiges Muster der Abwesenheit einer fortwährenden PLC-Aktivierung in LLC-PK1-Zellen, die weniger als 400.000 menschliche PTHR exprimieren, unterliegen könnte, wurde in vorbereitenden Untersuchungen vorgenommen, die ansteigendes IP_3 an einem früheren Zeitpunkt (4 min) in HKRK C53, HKRK B28 und HKRK C101 Zellen (120.000, 280.000 bzw. 330.000 PTHR pro Zelle), aber nicht in HKRK B64 Zellen (90.000 aktive Stellen pro Zelle) gezeigt haben (Daten werden nicht gezeigt). Der Zeitverlauf der PLC-Aktivierung wurde dann detaillierter in HKRK B28 Zellen untersucht und mit dem in HKRK B7 Zellen verglichen. Wie in [Abb. 4A](#) gezeigt wurde kurzlebige PTH-stimulierte IP_3 -Bildung in HKRK B28 Zellen innerhalb der ersten wenigen Minuten der PTH-Einwirkung beobachtet. Diese Antwort erreichte ihren Höhepunkt bei 4 min und wurde gefolgt von einem schnellen Abfall zu Basisgraden in 10 min. Im Gegensatz dazu, wie bereits für LLC-PK1-Zellen, die 300.000 Ratten-PTHRs/Zelle exprimieren, berichtet wurde (Guo, J., et al., *Endocrinology* 136, 3884-3891 (1995)), stieg die IP_3 -Bildung in HKRK B7 Zellen weiterhin zwischen 10 und 30 Minuten an, obwohl eine schnellere Einleitungsphase auch in diesen Zellen offensichtlich war.

[0061] Die verschiedenen zeitlichen Muster der PTH-induzierten PLC-Aktivierung, die in HKRK B28 und HKRK B7 Zellen beobachtet wurde, wiesen auf verschiedene Möglichkeiten, einschließlich einer umfangreichen Desensibilisierung, die die schwächere PLC-Antwort in HKRK B28 Zellen schneller beseitigen könnten, oder mögliche Verstärkung, durch höhere Rezeptorexpression, einer schwächer gekoppelten, aber einem unterschiedlichen Mechanismus der IP_3 -Bildung in den HKRK B7 Zellen hin. In dem Bestreben diese zu unterscheiden, wurde abgeschätzt, ob, wie in anderen Systemen berichtet (Menniti, F., et al., *Mol Pharmacol* 40, 727-733 (1991)), die Konzentrationsabhängigkeit für die schnellen (z. B. 4 min) verglichen mit den anhaltenden (z. B. 30 min) PLC-Antworten in HKRK B28 bzw. HKRK B7 Zellen verschieden sein könnte. Wie in [Abb. 4B](#) gezeigt waren jedoch, obwohl die Ausdehnung der Maximalantworten bei 4 min in HKRK B28 und bei 30 min in HKRK B7 sehr verschieden waren, die EC_{50} 's der beiden Antworten identisch (näherungsweise 20-30 nM) und ähnelten dem, was bereits für den Ratten-PTHR in diesen Zellen berichtet wurde (Guo, J., et al., *Endocrinology* 136, 3884-3891 (1995)). Außerdem war auch, wie in Tabelle 2 gezeigt, die spezifische Wirksamkeit der Liganden beider Antworten ähnlich, insofern eine PLC-Aktivierung durch hPTH(1-34) und hPTHrP(1-36) innerhalb jeder Zelllinie übereinstimmend war, und weder hPTH(3-34) noch hPTH(7-34) zeigten in keinem Fall irgendeine einheitlich nachweisbare Aktivität. Insgesamt weisen diese Ergebnisse nicht auf wichtige Unterschiede in der Ligand-Rezeptor Kopplung oder -Selektivität zwischen der kurzlebigen PLC-Antwort in HKRK B28 und der anhaltenden Antwort in HKRK B7 hin.

Tabelle 2. Aktivierung von Phospholipase-C durch PTH- oder PTHrP-Peptiden in HKRK B7 und HKRK B28 Zellen.

[0062] HKRK B7 Zellen und HKRK B28 Zellen, vorher mit [³H]myo-Inositol beschickt, wurden mit jedem Peptid (1000 nM) für 30 min bzw. 4 min inkubiert. Die Bildung von IP₃ wird ausgedrückt als ein Prozentanteil der Menge, die in vehikelbehandelten Kontrollversuchen gemessen wurde.

Tabelle 2

Peptid (1000 nM)	HKRK B7 (30 min Stimulation)	HKRK B28 (4 min Stimulation)
Kontrollversuch	100 ± 5	100 ± 3
hPTH (1-34)	298 ± 24	172 ± 9
hPTH (1-31)	275 ± 21	170 ± 14
hPTH (3-34)	103 ± 1	85 ± 9
hPTH (7-34)	122 ± 7	92 ± 10
hPTHrP (1-36)	93 ± 6	160 ± 9

[0063] Unter den erwarteten Konsequenzen der PLC-Aktivierung durch die menschlichen PTHR in LLC-PK1-Zellen wäre eine Abgabe an von intrazellulären Vorräten abgesondertem Kalzium (Brinhurst, F. R., et al., Endocrinology 132, 2090-2098 (1993), Dunlay, R., und Hruska, K., Am J Physiol 258, F223-231 (1990), Yamaguchi, D. T., et al., J Biol Chem 262, 7711-7718 (1987), Pines, M., et al., Bone 18, 381-389 (1996)). Dem gemäß wurde zytosolisches freies Kalzium in HKRK B28 und HKRK B7 Zellen nach Einwirkung auf hPTH(1-34) gemessen. Wie in **Abb. 5** gezeigt verursacht eine Zugabe von hPTH(1-34) (100 nM) zu Zellrasen aus Fura-2-AM-beschickten Zellen einen schnellen Anstieg an zytosolischem freiem Kalzium, das seinen höchsten Punkt bei 400-600 nM innerhalb von 20 s erreicht und danach langsam abfällt. Kein signifikanter Unterschied im Ausmaß oder Zeitverlauf dieser Antwort wurde zwischen HKRK B7 und HKRK B28 (vgl. **Abb. 5A** und **Abb. 5C**) beobachtet, trotz der größeren IP₃-Antwort in den HKRK B7 Zellen (**Abb. 4A**).

[0064] Um die Möglichkeit zu untersuchen, dass eine Aktivierung des cAMP-Weges für die Antwort mit zytosolischem freiem Kalzium auf PTH in diesen Zellen verantwortlich sein könnte, wurden AB45-Zellen untersucht, in denen menschliche PTHR (370.000/Zelle) mit REV AB, einem dominant-negativer Inhibitor von sowohl basaler als auch hormonähnlicher Proteinkinase A (PKA), co-exprimiert werden (Clegg, C. H., et al., J Biol Chem 262, 13111-13119 (1987), Fukayama, S., et al., Endocrinology 134, 1851-1858 (1994)). Wie in **Abb. SD** gezeigt wurde weiterhin eine kräftige zytosolische Kalziumantwort auf hPTH(1-34) in diesen cAMP-resistenten Zellen beobachtet und war von vergleichbarem Ausmaß mit der, die in HKRK B28 Zellen, die auf cAMP reagieren und die eine ähnliche Anzahl an hPTHRs exprimieren beobachtet wurde. Darum wurde der schnelle Anstieg an zytosolisches freies Kalzium, der durch Aktivierung der hPTHR in diesen Zellen offenbar ausgelöst wurde, nicht durch cAMP vermittelt.

[0065] Interessanterweise wurde jedoch beobachtet, dass der Kalziumübergang schneller in den cAMP-resistenten AB45 Zellen abfiel als in HKRK B28 Zellen, die sich dem Basisgrad innerhalb von nur 2-3 min annähern (**Abb. SD**). Dies kam trotz der Tatsache vor, dass das Ausmaß und zeitliche Muster der IP₃-Bildung in AB45 Zellen fast identisch mit denen in HKRK B28 Zellen war (Daten nicht gezeigt). Weder 8BrcAMP (1 mM) noch der aktive Phorbol ester TPA (100 nM) riefen eine schnell Kalziumantwort hervor (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das Ausmaß der anfänglichen Antwort von zytosolischem freiem Kalzium in engster Beziehung mit einer PLC-Aktivierung stand, während die Dauer der Antwort überwiegend durch die Aktivierung des PKA-Wegs beeinflusst worden sein könnte, möglicherweise durch verstärktes Eindringen von extrazellulärem Kalzium (Yamaguchi, D. T., et al., J Biol Chem 262, 7711-7718 (1987)).

Regulation der biologischen Antworten durch PTH

[0066] Um zu bestimmen, ob die Veränderungen der Signaleffizienz und -selektivität, die bei verschiedenen

Graden der Expression an menschlichen PTHR- in LLC-PK1-Zellen beobachtet wurde, aus Änderungen der ganzheitlichen distalen biologischen Antworten auf PTH resultieren könnte, wurden zwei gut beschriebene hormonale Antworten in diesen Zellen untersucht -Absonderung von u-PA und natrium-abhängiger aktiver Transport von anorganischem Phosphat.

[0067] Eine Absonderung des Urokinase-Typ Plasminogenaktivators (u-PA) durch LLC-PK1-Zellen als Antwort auf eine Aktivierung von sowohl PKA- als auch PKC-Wegen mittels Calcitonin wurde bereits berichtet (Jans, D. A., und Hemmings, B. A., FEBS Lett 205, 127-131 (1986)). Dieser Test wurde variiert, um einen praktischen spektrophotometrischen Biotest bereitzustellen, zum Anzeigen der Aktivierung von AC oder PLC durch die menschlichen PTHR in diesen Zellen. Wie in **Abb. 6** gezeigt löste eine Inkubation mit hPTH(1-34) für 16 Std. einen Dosis-abhängig Anstieg der u-PA-Absonderung von sowohl HKRK B7 als auch HKRK B28 Zellen aus. In beiden Zelllinien, 8BrcAMP und TPA, verursachten auch auffälligerweise pharmakologische Aktivatoren von PKA bzw. PKC diese Aktivität, was noch einmal bestätigt, dass sowohl die PKA- als auch PKC-Wege mit der u-PA-Produktion gekoppelt sind. Die maximale Produktion von u-PA durch HKRK B7 als Antwort auf hPTH(1-34) war größer als die in HKRK B28, sowohl absolut gesehen als auch in Relation zu anderen Agonists wie Calcitonin oder 8BrcAMP (**Abb. 6**).

[0068] Weil die Empfindlichkeiten und Ausmaße der cAMP-Antworten auf PTH in diesen zwei Zelllinien identisch waren, schien es möglich, dass die größere maximale u-PA-Antwort auf PTH, die in HKRK B7 verglichen mit HKRK B28 Zellen beobachtet wurde, die anhaltende Aktivierung von PLC, die nur in den HKRK B7 Zellen beobachtet wurde, widerspiegeln könnte. Außerdem ähnelte die EC_{50} zur Stimulation der u-PA-Produktion durch hPTH(1-34) (10-20 nM) mehr dem zur Aktivierung der IP_3 -Bildung (20-30 nM) als zur cAMP-Anreicherung (1 nM), besonders in HKRK B7 Zellen. Auch die maximale u-PA-Antwort auf PTH war höher als die des 8BrcAMP in HKRK B7 (aber nicht in HKRK B28 Zellen), in Konsistenz mit der Aktivierung, durch die reichlicher vorhandenen hPTHRs in diesen Zellen, eines zusätzlichen, PKA-unabhängig Mechanismus. Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung eines cAMP-unabhängigen (vermutlich PKC-abhängigen) Mechanismus der PTH-induzierten u-PA-Absonderung in diesen Zellen wurde unter Verwendung cAMP-resistenter AB45 Zellen erreicht (**Abb. 7**). Wie erwartet war die u-PA-Antwort auf 8BrcAMP in diesen Zellen fast ausgelöscht, während die auf Phorbol ester gut erhalten war. Die PTH-Antwort, wie die auf Calcitonin, wurde drastisch abgeschwächt, aber blieb signifikant größer als die, die mit einer maximalen Konzentration an 8BrcAMP erreicht wurde. Dies Ergebnis bestätigt weiter eine Funktion für Mechanismen beim Vermitteln einer PTH-stimulierten u-PA-Absonderung in diesen Zellen unabhängig von PKA.

[0069] Es wurde bereits berichtet, dass eine Stimulation von natrium-abhängiger Phosphataufnahme nach Aktivierung der Ratten-PTHR in LLC-PK1-Zellen hauptsächlich durch den PLC/PKC-Weg vermittelt wurde (Guo, J., et al., Endocrinology 136, 3884-3891 (1995)). Ähnliche Beobachtungen wurden durch andere in CHO-Zellen berichtet (Kaufmann, M., Mol Cell Endocrinol 104, 21-27 (1994)). Die Regulation dieser Antwort durch PTH in HKRK B7 und HKRK B28 Zellen, die die menschlichen PTHR exprimieren, wurde deshalb untersucht. Wie in **Abb. 8** gezeigt wurde die Phosphataufnahme durch hPTH(1-34) in diesen Zellen signifikant stimuliert. Dieser PKC-abhängige Einfluss of PTH(1-34), der sowohl in HKRK B28 als auch in HKRK B7 Zellen beobachtet wurde, wies darauf hin, dass die kurzlebige PLC-Antwort, die in den HKRK B28 Zellen beobachtet wurde, ausreichend war, um diese länger anhaltende biologische Antwort hervorzurufen. Diese Schlussfolgerung wurde weiter durch die Beobachtung unterstützt, dass eine Phosphataufnahme auch mehr als zweifach durch PTH(1-34) in den cAMP-resistenten AB45 Zellen stimuliert wurde (Daten nicht gezeigt), in denen, wie oben angemerkt, das einzig messbare PTHR-Signal die kurzlebige Stimulation von PLC und der damit verbundene Anstieg an zytosolischem freiem Kalzium war.

[0070] Auswirkungen von Veränderungen der PTHR-Dichte auf eine ligandenabhängige Aktivierung der AC- und PLC-Effektoren wurden beobachtet, die, obwohl sie unter Verwendung eines nichthomologen Modellsystems in vitro erreicht wurden, wichtige physiologische Folgen haben könnten. Unterschiede in spezifischen Mustern und relativen Intensitäten der intrazellulären Signale der zweiten Messenger, die durch PTHR-Aktivierung erzeugt wurden, können besonders in Osteoblasten oder Knochenmarkbindegewebszellen beim Übertragen von Informationen über verschiedene zeitliche Muster und Konzentrationsprofile des zirkulierende PTH sowohl zu der unmittelbaren Zielzelle als auch zu den Nachbarzellen der osteoklastischen Linie kritisch sein, dass sie schlussendlich hochgradig verschiedene Auswirkungen auf Knochen haben könnten (Dempster, D. W., et al., Endocrine Rev 14, 690-709 (1993)). Dementsprechend können Einblicke in mögliche Mechanismen solcher verschiedenartiger Signalwirkung entscheidend für das Verstehen der unterschiedlichen Mechanismen sein, denen die anabolischen und katabolischen Auswirkungen von PTH auf Knochen in vivo zugrunde liegen müssen. Der Einfluss der Rezeptorexpression auf den „Signalphänotyp“ der PTHR könnte auch bei regulierenden Antworten der Knorpelzellen auf hohe lokale Konzentrationen von PTHrP im sich entwickelnden

Knochen wichtig sein (Lanske, B., et al., Science 273, 663-666 (1996), Lee, K., et al., Endocrinology 137, 5109-5118 (1996)).

[0071] Ein Mechanismus für solch verschiedenartige Signalwirkungen, der einfach auf Veränderungen der extrazellulären Ligandkonzentration basiert, ist aus früheren Untersuchungen ersichtlich, in denen erhebliche Unterschiede der Ligandenempfindlichkeit (EC_{50}) der AC- und PLC-Antworten auf PTH von einer anfänglichen Einwirkung der natürlichen Zellen auf PTH beobachtet worden sind (Schneider, H., Eur J Pharmacol 246, 149-155 (1993), Pines, M., et al., Endocrinology 135, 1713-1716 (1994), Guo, J., et al., Endocrinology 136, 3884-3891 (1995), Pines, M., et al., Bone 18, 381-389 (1996), Kaufmann, M., Mol Cell Endocrinol 104, 21-27 (1994)). Die jetzigen Erfinder berichten ähnlich auffällige Unterschiede in der Empfindlichkeit der AC- und PLC-Antworten auf PTH in LLC-PK1-Zellen, die hPTHrRs exprimieren – z. B. war die EC_{50} , die zur Aktivierung von AC beobachtet wurde, 10-100-fach geringer als die zur PLC-Stimulation.

[0072] Ein anderer Mechanismus von verschiedenartigen Signalwirkungen könnte eine unverhältnismäßige Desensibilisierung der PTHR-Kopplung auf verschiedene G Proteine einschließen, die der ersten Einwirkung auf den Liganden folgen. Die Desensibilisierung der PTHR-Signalwirkung wurde weit reichend beschrieben (Mitchell, J., und Goltzman, D., Endocrinology 126, 2650-2660 (1990), Abou-Samra, A. B., et al., Endocrinology 135, 2588-2594 (1994), Fukayama, S., et al., Endocrinology 134, 1851-1858 (1994) Yamamoto, I., et al., Endocrinology 122, 1208-1217 (1988), Freyaldenhoven, A. M., et al., Am J Physiol 262, E87-E95 (1992)), und Unterschiede, die unter den verschiedenen Transduktionswegen hinsichtlich der zeitlichen Muster und Ausmaße dieser Desensibilisierungsereignisse bekannt sind, könnten auch die relative Intensität der nachfolgenden Signalwirkung entlang jeder Route regulieren.

[0073] Ein dritter Mechanismus zum Erzeugen verschiedenartiger Signalwirkungen wurde aufgrund der früheren Entdeckung, dass die relativen Ausmaße der maximalen AC- und PLC-Signale auffällig verschieden waren, vorgeschlagen, der abhängig von der Anzahl der Ratten-PTHrRs ist, die auf der Zelloberfläche exprimiert wurden (Guo, J., et al., Endocrinology 136, 3884-3891 (1995)). Darum beeinflussten für jede gegebene extrazelluläre Ligandkonzentration Schwankungen der Anzahl der rPTHrRs auf der Zelloberfläche nicht nur das Ausmaß eines gegebenen intrazellulären Signals, sondern auch seine Intensität bezüglich der anderer Signale, die dadurch die Muster der intrazellulären Signaltransduktion unabhängig von den Veränderungen der Ligandkonzentration verändern. Die vorliegenden Untersuchungen weisen darauf hin, dass dieser unterschiedliche Einfluss der Rezeptorexpression auf die AC- verglichen mit der PLC-Signaleffizienz auch auf menschliche PTHrRs angewendet werden kann und ohne irgendeine Veränderung in den EC_{50} 's der individuellen Antworten auftreten kann. Analoge Ergebnisse wurden kürzlich für den Vergleich von AC-Signalwirkung und der Signalwirkung von zytosolischem freiem Kalzium in HEK-293 menschlichen Nierenzellen berichtet, die eine verschiedene Anzahl menschlicher PTHrRs exprimieren (Pines, M., et al., Bone 18, 381-389 (1996)). Diese Trennung der Veränderungen der Ligandenempfindlichkeit von den Veränderungen der Effizienz von G Protein- und/oder Effektor-Kopplung weist darauf hin, dass die strukturellen Faktoren des PTHR, die an Agonisterkennung und -aktivierung beteiligt sind, relativ unabhängig von denen, die an G Protein-Effektor-Wechselwirkung beteiligt sind, wirken können. Die physiologische Relevanz dieser Beobachtungen wird von den erheblichen Veränderungen der Expression der PTHR unterstützt, von denen bekannt ist, dass sie in Knochenzellen oder während wiederholter PTH-Einwirkung in vitro oder in vivo vorkommen (Mitchell, J., und Goltzman, D., Endocrinology 126, 2650-2660 (1990), Abou-Samra, A. B., et al., Endocrinology 135, 2588-2594 (1994), Fukayama, S., et al., Endocrinology 134, 51-1858 (1994), Yamamoto, I., et al., Endocrinology 122, 08-1217 (1988); Freyaldenhoven, A. M., et al., Am J Physiol 262, 7-E95 (1992); Forte, L., et al., Am J Physiol 242, 54-E163 (1982); Bellorin, F. E., et al., Kidney Int 47, -44 (1995)). Außerdem wurde die Veränderung der endogenen PTHR-Expression innerhalb des Bereichs, der bei LLC-PK1-Zellen untersucht wurde, in anderen Zellesystemen beschrieben, in denen endogene PTHR-Gene exprimiert werden (Yamamoto, I., et al., Endocrinology 122, 1208-1217 (1988), Shukunami, C., et al., J Cell Biol 133, 457-468 (1996)).

[0074] Verschiedene zusätzliche Aspekte der Signaleigenschaften von hPTHrRs, die hier beobachtet wurden, sind erwähnenswert. Erstens ist es von Interesse, dass die Effizienzen, mit denen der menschliche PTHR an die AC und PLC-Antworten in LLC-PK1-Zellen koppelt, erheblich und abgestimmt vermindert wurden, wenn sie mit denen für die entsprechenden Antworten in Zellen verglichen werden, die Ratten-PTHrRs exprimieren. Dies ist zum Beispiel sehr deutlich in [Abb. 3](#), wo ungefähr 3-5-fach mehr menschliche als Ratten-PTHrRs erforderlich waren, um eine vergleichbare Maximalaktivierung von PLC zu erhalten. Ein entsprechender Unterschied in der Effizienz der AC-Kopplung wurde nach Vergleich der Daten für die hPTHr in Tabelle 1 mit Ergebnissen vorgeschlagen, die bereits für Ratten-PTHrRs in diesen Zellen berichtet wurden (Guo, J., et al., Endocrinology 136, 3884-3891 (1995)). Diese „Bewegung nach rechts“ der Beziehung zwischen der Gesamtsignaleffizienz und der Rezeptordichte kann eine wesentliche Eigenschaft des menschlichen PTHR oder alter-

nativ eine relative Arteninkompatibilität zwischen dem menschlichen Rezeptor und den intrazellulären Signaltransducer, die durch die Schweinezellen exprimiert werden, die hier verwendet wurden, widerspiegeln. Effizienteres Koppeln von transfizierten menschlichen PTHRs mit einer Signalwirkung von PLC oder zytosolischem Kalzium wurde in Primaten-Zellen oder Zellen menschlichen Ursprungs beobachtet (Pines, M., et al., Bone 18, 381-389 (1996), Schipani, E., et al., Science 268, 98-100 (1995)). Direkte Vergleiche der Funktionen von transfizierten Ratten- und menschlichen PTHRs in Zellen, die von einem weiteren Artenbereich abgeleitet werden, werden gebraucht, um diese Angelegenheit zu klären.

[0075] Zweitens kam es vor, dass nicht nur das Ausmaß, sondern auch das zeitliche Profil der IP_3 -Antwort (bei maximalen Ligandkonzentrationen) mit der Rezeptordichte in Beziehung standen. Besonders die PLC-Antwort bei niedrigeren PTHR-Expression-Graden war kurzlebig, dauerte weniger als 10 min, während die, die bei höheren PTHR-Dichten ausgelöst wurden, erheblich länger anhaltend war. Die Erklärung für diesen Unterschied ist nicht unmittelbar klar. Der Mechanismus bzw. die Mechanismen des schnellen Abfalls vom Gipfel des gemessenen IP_3 , der in den HKRK B28 Zellen beobachtet wurde, was typisch für viele Rezeptorantworten ist (Berridge, M., und Irvine, R., Nature 341, 197-205 (1989)), ist möglicherweise komplex und könnte beinhalten

- (a) Beendigung des anfänglichen Reizes (durch Rezeptor-Desensibilisierung oder Internalisierung),
- (b) Verringerung eines begrenzten Reservoirs an Membran-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-Substrat, das für den PTHR zugänglich ist (beispielsweise in Gegenwart von Lithium (Nahorski, S. R., et al., Trends Pharmacol Sci 12, 297-303 (1991))), oder
- (c) schnelle Einführung von Enzymen, die Inositolpolyphosphate verstoffwechseln – besonders die Inositol-1,4,5-trisphosphat-5-phosphatase –, die teilweise durch Aktivierung von PKC vermittelt werden kann (Nahorski, S. R., et al., Trends Pharmacol Sci 12, 297-303 (1991), Shears, S. B., Biochem J 260, 313-324 (1989)).

[0076] Substratverringerung scheint eine unwahrscheinliche Erklärung in dem System zu sein, da eine Peak-Rate der Substrathydrolyse und IP_3 -Bildung bei 4 min sogar größer in den HKRK B7 Zellen mit der länger anhaltenden Antwort war. Es ist jedoch noch nicht bekannt, ob die Verteilung von exprimierten PTHRs über die Membranen dieser polarisierten Epithelzellen bei allen hPTHr-Expression-Graden, die untersucht wurden, gleich bleibend ist. Es ist zum Beispiel möglich, dass eine PTHR-Verteilung mehr auf niedrigere Raten der Rezeptorsynthese beschränkt werden könnte, die die Größe des Substratreservoirs, die für den Rezeptor in solchen Zellen erreichbar ist und eine „lokale“ Substratverringerung erlaubt, beschränken könnte. Es wurde überlegt, die länger anhaltende PLC-Antwort in HKRK B7 Zellen könnte einfach auf einer intensiveren und langwierigeren Aktivierung der Enzyme beruhen, die durch eine viel größere Anzahl an erreichbaren Rezeptoren gestärkt wurde, die in einer aktiven Konfiguration in diesen Zellen gehalten werden, was ausreichend war, die Phosphate, die im Verstoffwechseln des IP_3 eingebunden sind, nahezu zu sättigen (Shears, S. B., Biochem J 260, 313-324 (1989)). Die Ergebnisse scheinen meist konsistent mit dieser Möglichkeit zu sein, da kein Unterschied in der EC_{50} 's der Antworten festgestellt werden konnte, die bei 4 min verglichen mit 30 min gemessen wurden, noch gab es einen offensichtlichen Unterschied, der in der Ligandenselektivität festgestellt wurde, der auf verschiedene Mechanismen hinweisen könnte. Im Gegensatz zu diesen Unterschieden in den PLC-Antworten, erscheint eine Aktivierung von AC durch PTH, über die ersten 15 min in beiden Zelllinien identisch stattzufinden. Außerdem wurde in nicht gezeigten Experimenten auch durch direkte Messung von Enzymaktivität bei Intervallen bis zu 24 Std. nach Zugabe von 1000 nM pPTH(1-34) überprüft, dass dies das Wahre der länger anhaltenden PKA-Antworten in diesen Zellen ist.

[0077] Ein drittes interessantes Merkmal der hPTHr-Signalwirkung in diesen Zellen betrifft die Antworten des zytosolischen Kalziums, die beobachtet wurden. Angesichts der Unterschiede, die oben in PLC-Aktivierungsprofilen zwischen HKRK B28 und HKRK B7 Zellen diskutiert wurden, der weithin akzeptierten Meinung, dass IP_3 ein bedeutender Faktor der Kalzium-Abgabe aus intrazellulären Vorräten während einer Aktivierung von G Protein-gekoppelten Rezeptoren (Berridge, M. J., Nature 361, 315-325 (1993)) ist, und des jüngsten Beweises an permeabilisierten HEK-293 Zellen, die menschliche PTHRs exprimieren, dass PTH und IP_3 um eine Abgabe aus demselben intrazellulären Reservoir an Kalzium zu konkurrieren scheinen (Pines, M., et al., Bone 18, 381-389 (1996)), ist es vielleicht überraschend, dass die Übergänge von zytosolischem freiem Kalzium, die durch PTH in diesen beiden Zelllinien ausgelöst werden, so gut wie identisch sowohl in der Zeit als auch im Ausmaß waren. Die Ergebnisse mit cAMP-resistenten AB45 Zellen wiesen darauf hin, dass die anhaltende Phase der Erhöhung an zytosolischem freiem Kalzium mit einer Aktivierung des PKA in Beziehung stehen kann – möglicherweise durch Unterstützen des Eindringens von extrazellulärem Kalzium (Yamaguchi, D. T., et al., J Biol Chem 262, 7711-7718 (1987)) – aber die anfängliche Phase der Kalzium-Antwort schien unabhängig von PKA zu sein. Weiterhin lieferten andere Experimente, in denen auch Forskolin, 8-bromo-cAMP und Phorbol ester scheiterten Kalzium-Antworten auszulösen, keinen Hinweis für eine direkte Beteiligung von PKA oder

PKC beim Auslösen dieser Antwort. Es wurde gefolgert, dass die schnelle Antwort von zytosolischem Kalzium auf PTH in engster Beziehung zu dem anfänglichen Ansteigen an IP_3 in diesen Zellen steht und dass weiterhin die Menge an IP_3 , die akut in HKRK B28 Zellen erzeugt wird, obwohl weniger als die, die in HKRK B7 Zellen produziert wird, ausreichend sein muss, um eine maximale Abgabe an Kalzium von dem intrazellulären Reservoir, das auf IP_3 reagiert, zu erhalten.

Signalwirkung und biologische Aktivität von hPTH-Analoga

[0078] Verschiedene PTH-Analoga sollen eine Signalselektivität in Zellen nichtmenschlichen Ursprungs, die auf PTH ansprechen, zeigen. Diese schließen PTH(3-34) und PTH(7-34) ein, die in einigen Systemen gezeigt haben, dass sie PKC und/oder Übergänge an zytosolischem Kalzium selektiv aktivieren (Fujimori, A., et al., *Endocrinology* 128, 3032-3039 (1991), Abou-Samra, A. B., et al., *Endocrinology* 135, 2588-2594 (1994); Azarani, A., et al., *J Biol Chem* 271, 14931-14936 (1996); Chakravarthy, B. R., et al., *Biochem Biophys Res Commun* 171, 1105-1110 (1990); Fujimori, A., et al., *Endocrinology* 130, 29-36 (1992); Jouishomme, H., et al., *Endocrinology* 130, 53-60 (1992); Janulis, M., et al., *Endocrinology* 133, 713-719 (1993)), und PTH(1-31), das AC, aber nicht PKC in Ratten-Knochenkrebszellen und ursprünglich Ratten-Milzzellen aktivieren soll (Rixon, R. H., et al., *J Bone Miner Res* 9, 1179-1189 (1994), Whitfield, J. F., und Morley, P., *Trends Pharmacol Sci* 16, 382-386 (1995), Jouishomme, H., et al., *Endocrinology* 130, 53-60 (1992)). Weil solche Fragmente als Kandidaten für den klinischen Gebrauch in Betracht kamen (Dempster, D. W., et al., *Endocrine Rev* 14, 690-709 (1993), Whitfield, J. F., und Morley, P., *Trends Pharmacol Sci* 16, 382-386 (1995)), wurde bestimmt, ob diese Analoga die erwartete Signalselektivität mittels menschlicher PTHRs zeigen würde.

[0079] Wie in [Abb. 2B](#) gezeigt wurde eine Aktivierung von AC in HKRK B28 Zellen durch hPTH(3-34) bei Konzentrationen von 10 nM und darüber signifikant angeregt, obwohl die Antwort auf 1000 nM dieses Peptids nur 16 % der Maximalantwort auf hPTH(1-34) war. Menschliches PTH(7-34) scheiterte, AC zu aktivieren, bei allen getesteten Konzentrationen, während die Antworten auf hPTHrP(1-36) und hPTH(1-31) nicht von denen auf hPTH(1-34) zu unterscheiden waren. Ähnliche Versuche wurden in Experimenten mit HKRK B7 Zellen erhalten (Daten nicht gezeigt).

[0080] Bei Untersuchungen bei Konzentrationen von 1000 nM aktivierten weder hPTH(3-34) noch hPTH(7-34) PLC signifikant, selbst in HKRK B7 Zellen, die nahezu 1 Million Rezeptoren pro Zelle exprimieren (Tabelle 2). Im Gegensatz dazu stimulierten sowohl hPTHrP (1-36) als auch unerwarteterweise hPTH(1-31) PLC gleichermaßen wie hPTH(1-34) in sowohl HKRK B28 (bei 4 min) als auch HKRK B7 (bei 30 min). Menschliches PTH(1-31) (100 nM) aktiviert auch zytosolische freie Kalzium-Übergänge in HKRK B7 Zellen vollständig ([Abb. 5B](#)), während weder hPTH(3-34) noch hPTH(7-34) (100 nM) diese Antwort hervorrufen (nicht gezeigt).

[0081] Im u-PA-Biotest, der hauptsächlich von einer PKA-Aktivierung abhängig ist, aber auch eine PKA-unabhängige Signalwirkung widerspiegelt (wie oben beschrieben), waren die Aktivitäten von hPTH(3-34), hPTH(7-34) und hPTH(1-31) übereinstimmend in ihren Signaleigenschaften. Also war hPTH(3-34) teilweise aktiv (50-60 % oder maximale Antwort auf hPTH(1-34)), während hPTH(7-34) inaktiv war und hPTH(1-31) vollständig aktiv war (Tabelle 3, [Abb. 9](#)). Besonders eine maximale Aktivierung der u-PA-Sekretion durch hPTH(1-31) war identisch mit der von hPTH(1-34) selbst in HKRK B7 Zellen ([Abb. 9](#), Tabelle 3), wo eine maximale PTH-Aktivität diejenige, die mit maximaler pharmakologischer Aktivierung von PKA mit 8BrcAMP erhalten wird, übertrifft, und in AB45 Zellen ([Abb. 7](#)), wo PKA (und seine Wirkung von 8BrcAMP) fast komplett blockiert ist und die Restaktivität von PTH vermutlich fast vollständig durch PKA-unabhängige Signale vermittelt ist. Ebenso zeigten sowohl in HKRK B28 als auch in HKRK B7 Zellen hPTH(1-31) und hPTH(1-34) (wie auch hPTHrP(1-36)) vergleichbare maximale Aktivierung der Phosphataufnahme, die PKC-abhängig in diesen Zellen ist (Guo, J., et al., *Endocrinology* 136, 3884-3891 (1995)), während hPTH(3-34) und hPTH(7-34) wie erwartet inaktiv war ([Abb. 8](#)).

Tabelle 3. Stimulierung der u-PA-Sekretion von hPTH/PTHrP-Peptiden in HKRK B7 und HKRK B28 Zellen

[0082] Zellen wurden mit den gekennzeichneten Peptiden (1000 nM) für 16 Std. vor einer Messung von abgesondertem u-PA inkubiert, das im Medium vorlag, die als Prozentteil der Aktivität, die in vehikelbehandelten Kontrollversuchen gemessen wurde, ausgedrückt wird. Die gezeigten Werte sind die Mittelwerte $\pm$ SEM von dreifachen Bestimmungen.

Tabelle 3

Peptid (1000 nM)	HKRK B7	HKRK B28
hPTH (1-34)	100 ± 5	100 ± 8
hPTH (1-31)	101 ± 9	101 ± 6
hPTH (3-34)	57 ± 3	50 ± 1
hPTH (7-34)	1 ± 1	0 ± 2
hPTHrP (1-36)	88 ± 5	97 ± 9

[0083] Die vollständige Äquivalenz der Signalwirkung und biologischen Eigenschaften von hPTH(1-31) und hPTH(1-34), die mittels transfizierter menschlicher PTHRs in diesen LLC-PK1-Zellen beobachtet wurde, war recht unerwartet, da dieses Analogon ohne Aktivität in zellulären Biotests einer PKC-Aktivierung sein soll, trotz vollständiger Wirksamkeit in Bezug auf die Stimulation von AC in Rattensystemen (Rixon, R. H., et al., J Bone Miner Res 9, 1179-1189 (1994), Joishomme, H., et al., Endocrinology 130, 53-60 (1992), Neugebauer, W., et al., Biochemistry 34, 8835-8842 (1995)). Es wurde festgestellt, ob die offensichtliche Diskrepanz zwischen den Entdeckungen der jetzigen Erfinder und dem früheren Bericht in Beziehung mit dem Unterschied der Rezeptorarten stehen könnte. Dementsprechend wurden die Auswirkungen der hPTH(1-34) und hPTH(1-31) in LLC-PK1-Zellen (EWS), die Ratten-PTHRs exprimieren, verglichen. Beide Peptide aktivierten AC in EW 5 Zellen gleichwertig ([Abb. 10](#)). Wie in Tabelle 4 gezeigt war eine maximale IP_3 -Erzeugung durch hPTH(1-31) mittels dem Ratten-PTHr in EWS Zellen (und in 3 anderen rPTHr-exprimierenden Zelllinien) mit näherungsweise 70 % so groß wie die durch hPTH(1-34), während eine u-PA-Produktion bei 16 Std. identisch war in Bezug auf 100 nM beider Peptide. Eine Stimulation der Phosphataufnahme durch die zwei Peptide war auch identisch. Also war die Fähigkeit von hPTH(1-31), PLC und andere cAMP-unabhängigen Antworten mittels den PTHr zu aktivieren, nicht auf den menschlichen Rezeptor beschränkt, sondern wurde auch in LLC-PK1-Zellen beobachtet, die rekombinante Ratten-PTHRs exprimieren. Die PLC-Antwort auf hPTH(1-31) kann in Bezug auf hPTH(1-34), mittels den Ratten-PTHr, unauffällig beeinträchtigt sein, während der menschliche Rezeptor unfähig zu sein scheint, zwischen diesen beiden Liganden zu unterscheiden.

Tabelle 4. Vergleich von hPTH(1-34) und hPTH(1-31) in LLC-PK1-Zellen, die Ratten-PTHr exprimieren.

[0084] Antworten auf hPTH(1-34) oder hPTH(1-31) (1000 nM) wurden in EWS Zellen gemessen, die 320.000 Ratten-PTHRs pro Zelle exprimieren. Jeder Wert ist das Mittel ± SEM eines repräsentativen Experiments, das dreimal ausgeführt wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden in mindestens 3 Einzelexperimenten erhalten. Die unauffälligste Absenkung der IP_3 -Bildung, die mit hPTH(1-31) in Bezug auf hPTH(1-34) beobachtet wurde, wurde in 3 anderen LLC-PK1-Zelllinien bestätigt, die Ratten-PTHRs exprimieren (z. B. EW29, AR-C38 und AR-B44, die 190.000, 630.000 bzw. 800.000 PTHRs/Zelle), in denen eine maximale IP_3 -Bildung nach hPTH(1-31) (als % der hPTH(1-34)-Wirkung) 75 %, 77 % bzw. 64 % betrug.

Tabelle 4

Peptid (1000 nM)	IP_3 -Bildung (% des Grundwertes)	Phosphataufnahme (% des Grundwertes)	u-PA-Aktivität (units/Vertiefung)
Kontrollversuch	100 ± 5	100 ± 2	0,8 ± 0,3
hPTH (1-34)	444 ± 31	130 ± 2	43,5 ± 1,8
hPTH (1-31)	316 ± 35	134 ± 3	41,2 ± 1,2

[0085] Im Hinblick auf die weithin postulierte(n) Verbindung(en) zwischen spezifischer PTHr-erzeugter Signale der zweiten Messenger und bestimmten biologischen Wirkungen der Hormone in solchen Geweben wie

Knochen oder Niere (Dempster, D. W., et al., *Endocrine Rev* 14, 690-709 (1993), Rixon, R. H., et al., *J. Bone Miner Res* 9, 1179-1189 (1994), Whitfield, J. F., und Morley, P., *Trends Pharmacol Sci* 16, 382-386 (1995), Dunlay, R., und Hruska, K., *Am J. Physiol* 258, F223-231 (1990), Janulis, M. et al., *Endocrinology* 133, 713-719 (1993)), war es von großem Interesse, die Eigenschaften der verschiedenen gestutzten hPTH(1-34) Analoga in Zellen, die den menschlichen PTHR exprimieren, zu untersuchen.

[0086] Eine schwache, aber signifikante Aktivierung von AC (und u-PA-Sekretion) durch hPTH(3-34), aber keine Aktivierung, die durch PLC oder zytosolisches Kalzium stimuliert wurde, wurde beobachtet. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu anderen Berichten, die hauptsächlich auf Nagetiermodelle basieren, in denen PTH(3-34)-Peptide allgemein einen Verlust der AC-Aktivierung mit verhältnismäßiger Bewahrung der PLC/PKC- oder Kalzium-stimulierenden Aktivität gezeigt haben (Fujimori, A., et al., *Endocrinology* 128, 3032-3039 (1991), Abou-Samra, A. B., et al., *Endocrinology* 135, 2588-2594 (1994); Azarani, A., et al., *J Biol Chem* 271, 14931-14936 (1996); Chakravarthy, B. R., et al., *Biochem Biophys Res Commun* 171, 1105-1110 (1990); Fujimori, A., et al., *Endocrinology* 130, 29-36 (1992); Jouishomme, H., et al., *Endocrinology* 130, 53-60 (1992); Janulis, M., et al., *Endocrinology* 133, 713-719 (1993), Azarani, A., et al., *J Biol Chem* 270, 23166-23172 (1995)). In transfizierten HEK 293 Zellen, die 400.000 menschliche PTHR pro Zelle exprimierten, beobachtete Pines et al. schwache, aber signifikant Abfälle von sowohl AC als auch zytosolischem freiem Kalzium als Antwort bei 10 nM [Nle^{8,18}, Tyr³⁴]bPTH(3-34)amid (Pines, M. et al., *Bone* 18, 381-389 (1996)), während keine PLC- oder Kalzium-Antworten auf hPTH(3-34)amid bei 100 nM beobachtet wurden. Auf der anderen Seite scheiterten andere auch daran, eine Aktivierung von PKC oder zytosolischen Kalzium-Übergängen durch PTH(3-34)-Peptide in Ratten- und anderen nicht-menschlichen Zellsystemen nachzuweisen (Reid, I., et al., *Am J Physiol* 252, E45-E51 (1987); Civitelli, R., et al., *Endocrinology* 125, 1204-1210 (1989); Tamura, T., et al., *Biochem Biophys Res Commun* 159, 1352-1358 (1989)). Es scheint dadurch wahrscheinlich, dass diese Unterschiede den Unterschieden in den experimentellen Systemen oder in den Arten und der Struktur der PTHR, die beteiligt waren, oder der jeweiligen PTH(3-34)-Peptide, die verwendet wurden, zuzuschreiben sein können.

[0087] Überraschender war die Entdeckung, dass hPTH(1-31) völlig gleichwertig mit hPTH(1-34) bezüglich der Aktivierung von AC, PLC, zytosolischen Kalzium-Übergängen, u-PA-Sekretion und Phosphataufnahme in LLC-PK1-Zellen war, die hPTHRs exprimieren. Vorher soll hPTH(1-31) AC-Aktivität erhalten haben, aber ohne PKC-stimulierende Aktivität sein. (Rixon, R. H., et al., *J Bone Miner Res* 9, 1179-1189 (1994), Jouishomme, H., et al., *J Bone Miner Res* 9, 943-949 (1994), Neugebauer, W., et al., *Biochemistry* 34, 8835-8842 (1995)). Diese Beobachtungen bildeten die Basis des Vorschlags, dass das Region-hPTH (Jouishomme, H., et al., *J Bone Miner Res* 9, 943-949 (1994); Schipani, E., et al., *Science* 268, 98-100 (1995); Clegg, C. H., et al., *J Biol Chem* 262, 13111-13119 (1987); Menniti, F., et al., *Mol Pharmacol* 40, 727-733 (1991); Fukayama, S., et al., *Endocrinology* 134, 1851-1858 (1994)) eine zentrale Region zur Aktivierung von PKC mittels dem PTHR umfasst (Whitfield, J. F., und Morley, P., *Trends Pharmacol Sci* 16, 382-386 (1995), Jouishomme, H., et al., *J Bone Miner Res* 9, 943-949 (1994)). Darum wurden Experimente, in denen Ratten, deren Eierstöcke entfernt wurden und denen täglich hPTH(1-31)-Injektionen gegeben wurde, Steigerungen der Knochenmassen verglichen mit denen, die mit hPTH(1-34) durchgeführt wurden, zeigten, weithin interpretiert als Hinweis einer grundlegenden Funktion für die cAMP/PKA-Kaskade in der anabolischen Wirkung von PTH auf Knochen (Rixon, R. H., et al., *J Bone Miner Res* 9, 1179-1189 (1994), Whitfield, J. F., et al., *Calcif Tissue Int* 58, 81-87 (1996)). Obwohl PKC nicht direkt gemessen wurde, wurde sowohl eine Antwort von zytosolischem Kalzium auf hPTH(1-31), die durch cAMP-Analoga nachgeahmt werden konnte, als auch eine kräftige Stimulierung der Phosphataufnahme, eine biologische Antwort, von der bereits gezeigt wurde, dass sie in erster Linie mit einer Aktivierung von PKC in diesen Zellen gekoppelt ist, beobachtet (Guo, J., et al., *Endocrinology* 136, 3884-3891 (1995)). Darum ist der direkte Beweis der PLC-Aktivierung durch hPTH(1-31) mittels dem hPTHR bemerkenswert und erhöht die wichtige Möglichkeit, dass die Ligandenselektivität der menschlichen PTHR erheblich von denen der Ratten-PTHR abweichen können (angesichts all der früheren Arbeiten, die in Rattensystem durchgeführt wurden). Solch eine Schlussfolgerung würde wichtige Folgen für Bemühungen haben, die auf das Entwickeln klinisch nützlicher signal-selektiver PTH-Analoga auf der Basis von Biotest bei Ratten ausgerichtet sind (Whitfield, J. F., und Morley, P., *Trends Pharmacol Sci* 16, 382-386 (1995)).

[0088] Um auf die Frage weiter einzugehen, wurden die Aktivitäten von hPTH(1-34) und hPTH(1-31) in LLC-PK1-Zellen, die Ratten-PTHRs exprimierten, verglichen. Überraschenderweise kam es vor, dass die Aktivitäten der beiden Peptide auch in diesem System fast nicht zu unterscheiden waren, obwohl eine maximale PLC-Aktivierung durch hPTH(1-31) signifikant gesenkt wurde – auf 60 % der maximalen Antwort auf hPTH(1-34). Diese Entdeckungen sind unvereinbar mit früheren Beschreibungen von hPTH(1-31) als einem cAMP-selektiven Analogon in Rattenzellen und weisen darauf hin, dass die gesamte Breite der cAMP-unabhängigen Aktivitäten von hPTH(1-31), die mittels hPTHRs in LLC-PK1-Zellen beobachtet wurden, nicht ganz

auf den menschlichen PTHR beschränkt sind. Deshalb würde der Unterschied in PTHR-Arten an sich nicht ausreichen, den Unterschied zwischen den vorliegenden Entdeckungen in den HKRK Zellen und denen, von denen bereits von anderen unter Verwendung von Rattenzellen berichtet wurde, zu erklären (Rixon, R. H., et al., J Bone Miner Res 9, 1179-1189 (1994), Jouishomme, H., et al., J Bone Miner Res 9, 943-949 (1994), Neugebauer, W., et al., Biochemistry 34, 8835-8842 (1995)).

[0089] Es gibt verschiedene mögliche Erklärungen für die offensichtlichen Unterschiede zwischen den vorliegenden Entdeckungen und denen von früheren Untersuchungen des hPTH(1-31)-Peptids. Erstens wurden verschiedene Antworten gemessen. PLC, zytosolisches freies Kalzium und bestimmte distale biologische Auswirkungen, von denen bekannt ist, dass sie mit einer PLC/PKC-Aktivierung in LLC-PK1-Zellen gekoppelt sind, wurden gemessen, während Jouishomme et al. PKC an nicht-entnommenen Membranen, aber nicht an PLC oder zytosolischem freiem Kalzium gemessen hat (Rixon, R. H., et al., J Bone Miner Res 9, 1179-1189 (1994), Jouishomme, H., et al., J Bone Miner Res 9, 943-949 (1994)). Es ist bekannt, dass PKC durch andere als PLC vorgeschaltete Effektoren reguliert werden kann (Exton, J., J Biol Chem 265, 1-4 (1990)). Zweitens wurde die frühere Arbeit unter Verwendung von ROS 17/2 Knochenkrebszellen oder Primärkulturen von Ratten-Milzlymphozyten, die eher endogene als transfizierte Ratten-PTH-Rezeptor-Gene exprimieren, durchgeführt (Rixon, R. H., et al., J Bone Miner Res 9, 1179-1189 (1994), Jouishomme, H., et al., J Bone Miner Res 9, 943-949 (1994)). Die ROS 17/2 Zellen exprimieren fast zweifellos den gleichen rPTHr, der hier untersucht wurde, da sie die Quelle der ROS 17/2.8 Subklone waren, von denen die rPTHr-cDNA ursprünglich kloniert wurde, und die dann benutzt wurde, die rPTHr-exprimierenden LLC-PK1-Zellen zu schaffen, die in Experimenten verwendet wurden (Abou-Samra, A. B., et al., Proc Natl Acad Sci USA 89, 2732-2736 (1992), Bringham, F. R., et al., Endocrinology 132, 2090-2098 (1993), Guo, J., et al., Endocrinology 136, 3884-3891 (1995)). Auf der anderen Seite ist es durchaus möglich, dass ROS 17/2 Zellen und Milzzellen wechselnde Rezeptorenarten für PTH exprimieren, die die Antwort(en) auf hPTH(1-31) in diesen Zellen beeinflusst haben könnten. Zum Beispiel wurde ein PTH-Rezeptor mit offensichtlicher C-terminaler Spezifität, der noch nicht vollständig charakterisiert ist, in ROS 17/2.8 Zellen beschrieben (Inomata, N., et al., Endocrinology 136, 4732-4740). Drittens unterscheiden sich die ROS 17/2 und Rattenmilz-Zellsysteme in anderer Art von den rPTHr-transfizierten LLC-PK1-Zellen, die untersucht wurden:

- (a) von der Expression von PTHRs auf der Oberfläche ist bekannt oder wahrscheinlich, dass sie niedriger als die in den LLC-PK1-Zellen ist, die verwendet wurden,
- (b) rPTHrs sind eher an Ratten als an Schweine G Proteine gekoppelt, und
- (c) die relativen Mengen der verschiedenen Subtypen der exprimierten G Proteine und Effektorenzymen könnte sehr verschieden sein.

[0090] Die Angelegenheit der niedrigen PTHR-Expression kann besonders wichtig sein. Die Daten weisen darauf hin, dass die Wirksamkeit des hPTH(1-31)-Peptids für eine PLC/PKC-Aktivierung mittels dem Ratten-PTHr in Bezug auf die von hPTH(1-34) mäßig erniedrigt ist (bis 40 %). Angesichts des wichtigen Einflusses der Rezeptordichte auf eine PLC-Signalwirkung, die beschrieben wurde, scheint es möglich, dass dieser Unterschied in der Wirksamkeit für PLC zwischen hPTH(1-34) und hPTH(1-31) in Zellen verstärkt werden könnte, die weniger rPTHrs exprimieren, als es die hier verwendeten LLC-PK1-Zellen tun. Andererseits wurde kein Verlust der PLC-stimulierenden Wirksamkeit mittels dem menschlichen PTHR für hPTH(1-31) gefunden, selbst in Zellen (HKRK B28), in denen die Oberflächendichte des menschlichen PTHR nah am Minimum war, das zum Nachweis des Signals erforderlich ist.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Bestimmen, ob eine interessierende Verbindung ein Agonist oder ein Antagonist eines Gq Protein gekoppelten Rezeptors ist, umfassend:

- (a) Bereitstellen einer Zelllinie, die urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (u-PA) exprimiert und welche eine inhibierte Proteinkinase A (PKA) Aktivität aufweist;
- (b) Bereitstellen eines Expressionsvektors, umfassend eine Nukleotidsequenz, die für einen Gq Protein gekoppelten Rezeptor kodiert, wobei der Rezeptor normalerweise nicht in der Zelllinie von Schritt (1) exprimiert wird;
- (c) Einbringen des Expressionsvektors in die Zelllinie, wodurch stabil transfizierte Zellen geschaffen werden;
- (d) Kontaktieren der stabil transfizierten Zellen mit der interessierenden Verbindung; und
- (e) Messen der u-PA Aktivität des Zellkulturüberstandes der Zellen von Schritt (d).

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem die Zelllinie LLC-PK1 ist und eine inhibierte Proteinkinase A (PKA) Aktivität aufweist.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem der Gq Protein gekoppelte Rezeptor humanes PTHR ist.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

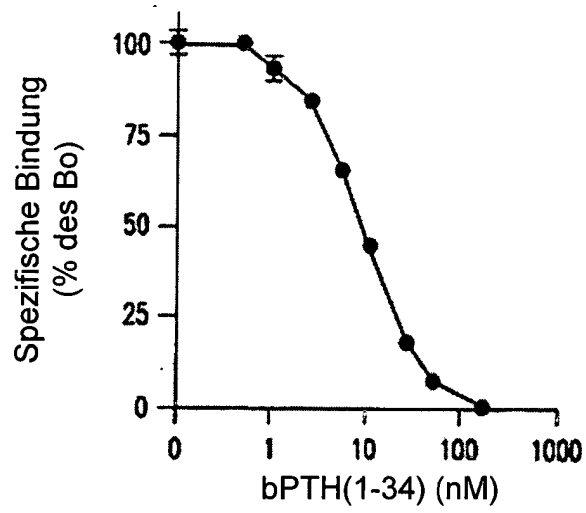


Abb. 1A

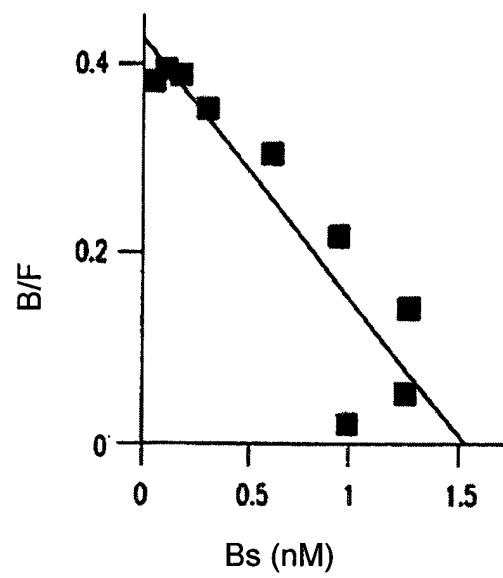


Abb. 1A-1

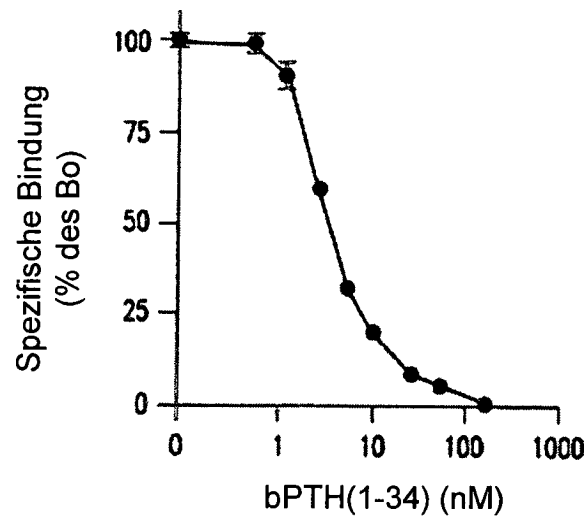


Abb. 1B

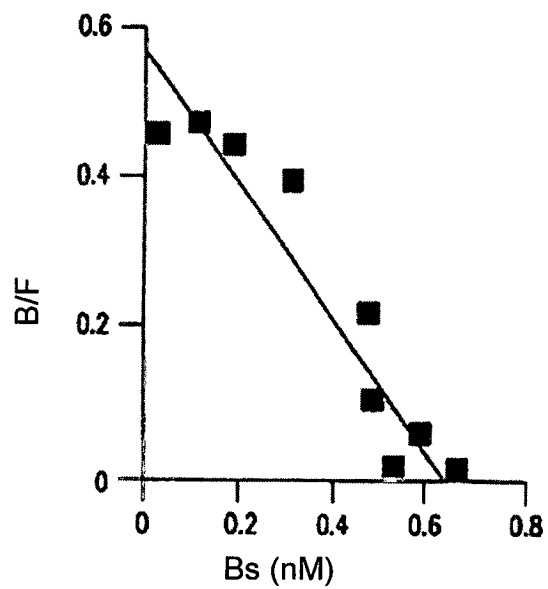


Abb. 1B-1

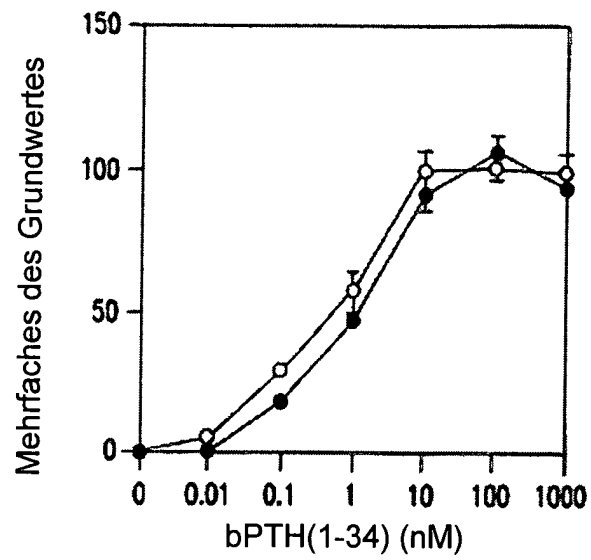


Abb. 2A

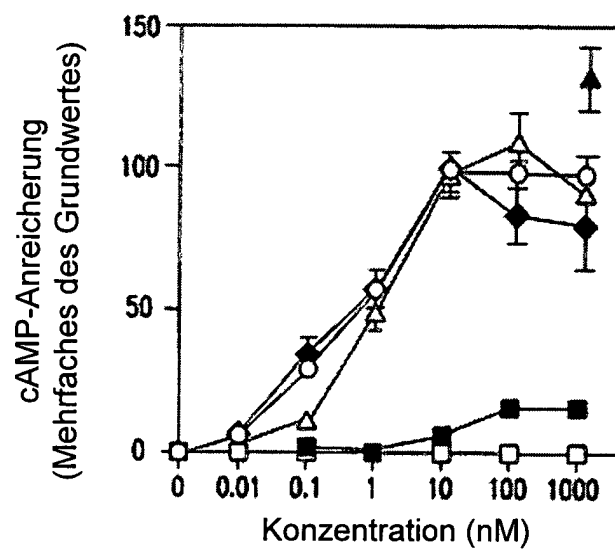


Abb. 2B

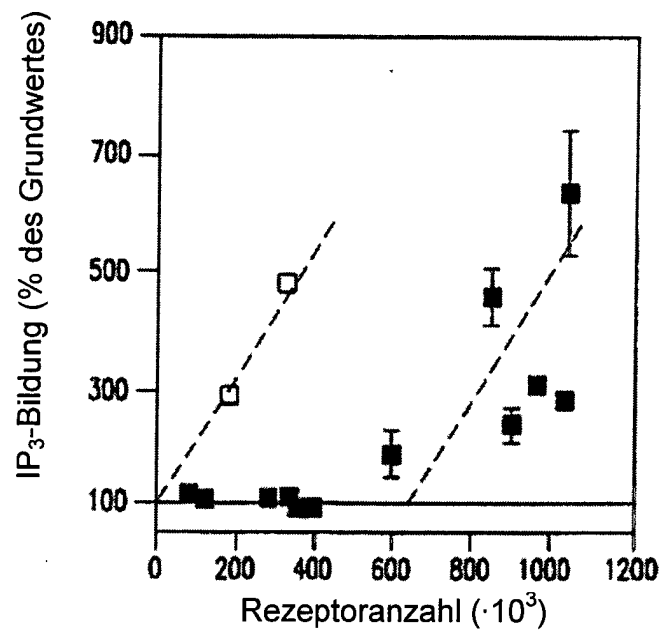


Abb. 3

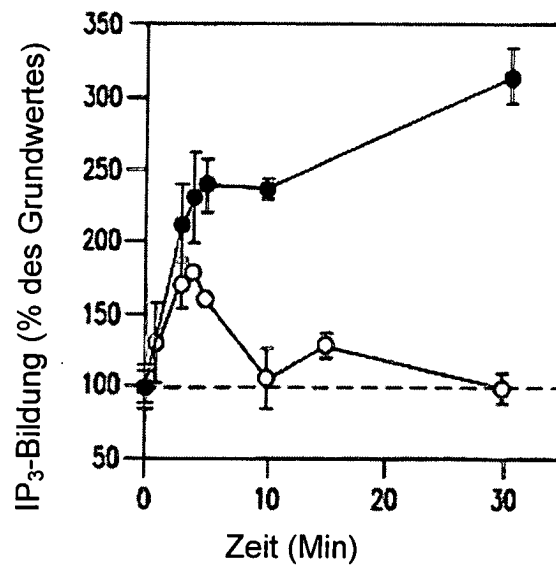


Abb. 4A

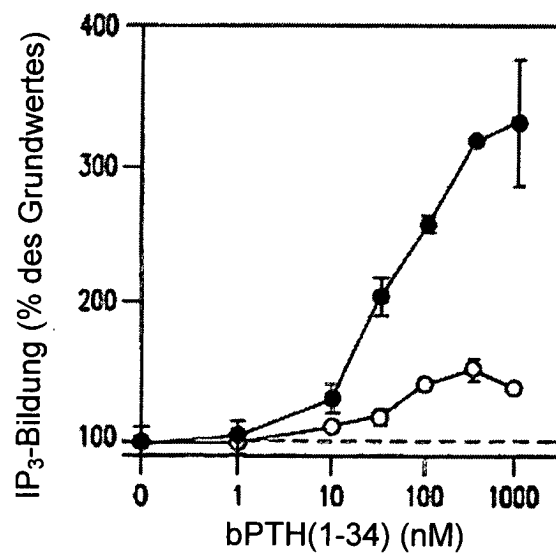
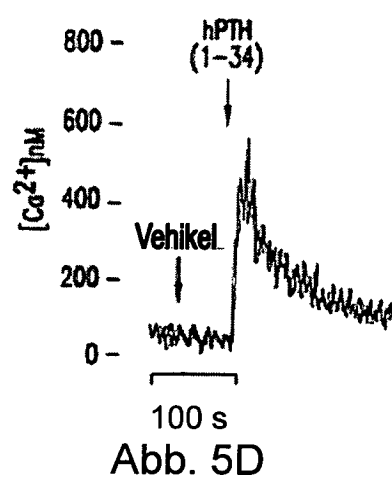
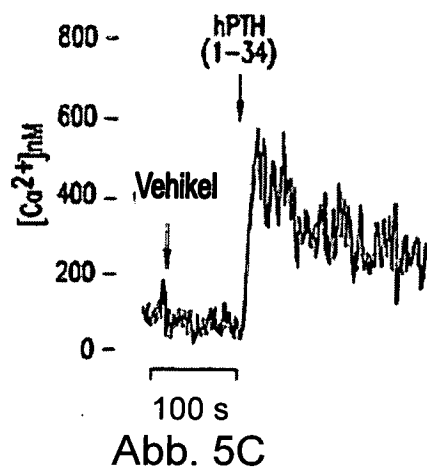
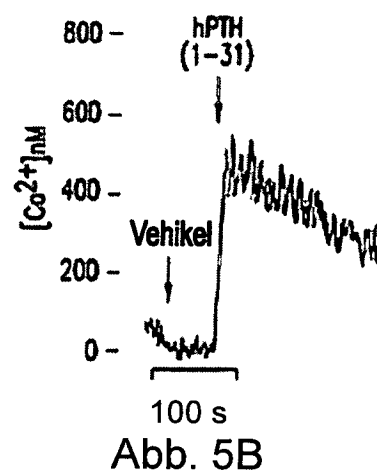
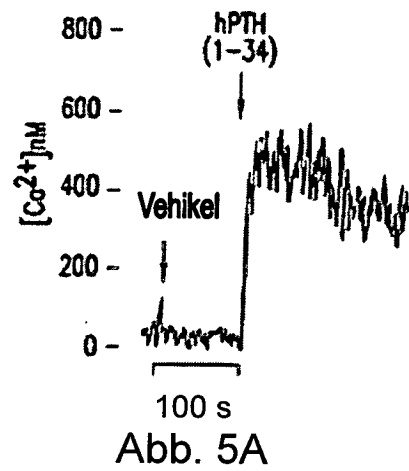


Abb. 4B



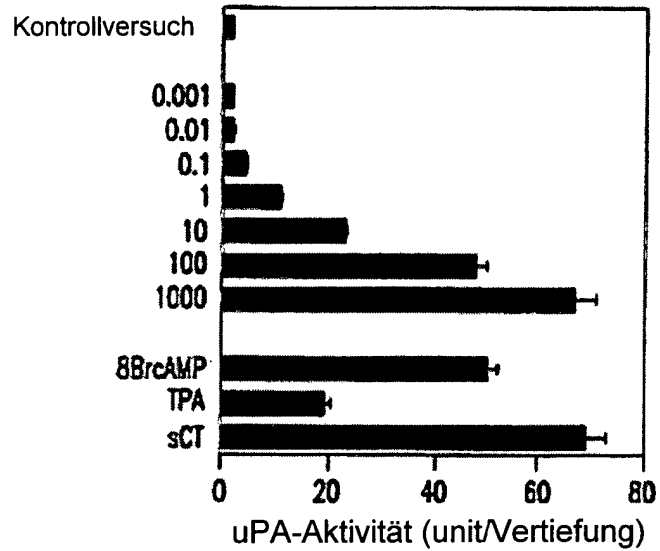


Abb. 6A

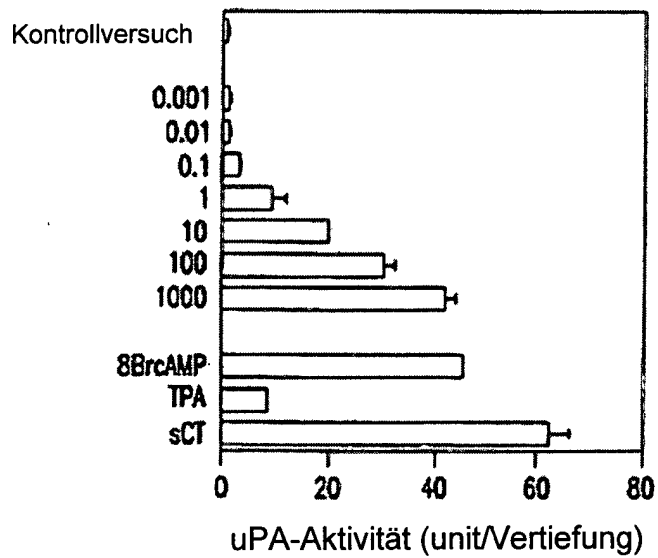


Abb. 6B

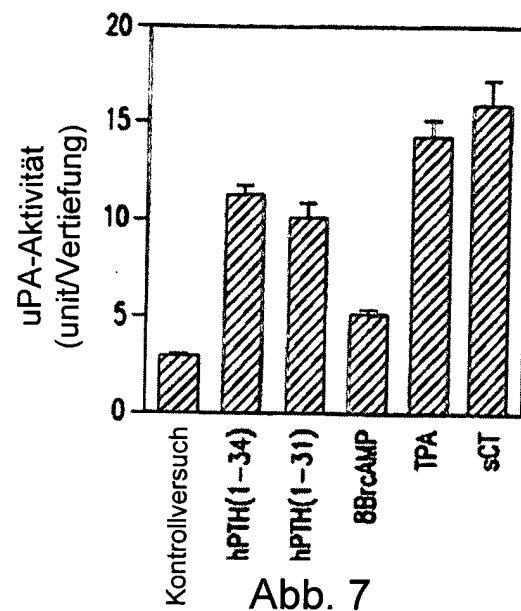


Abb. 7

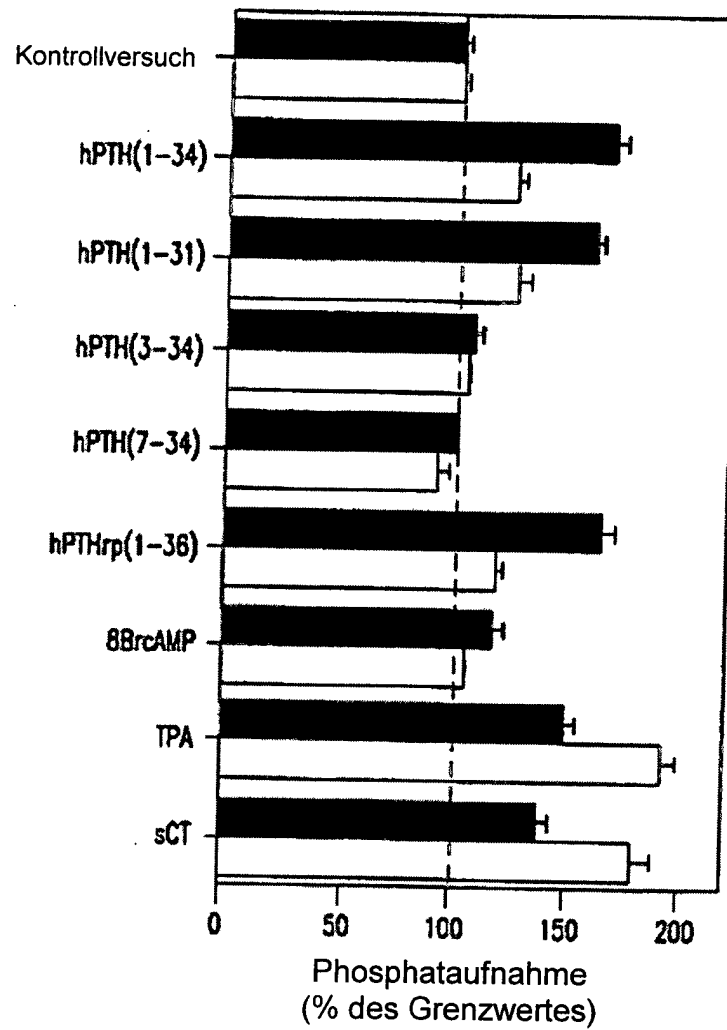


Abb. 8

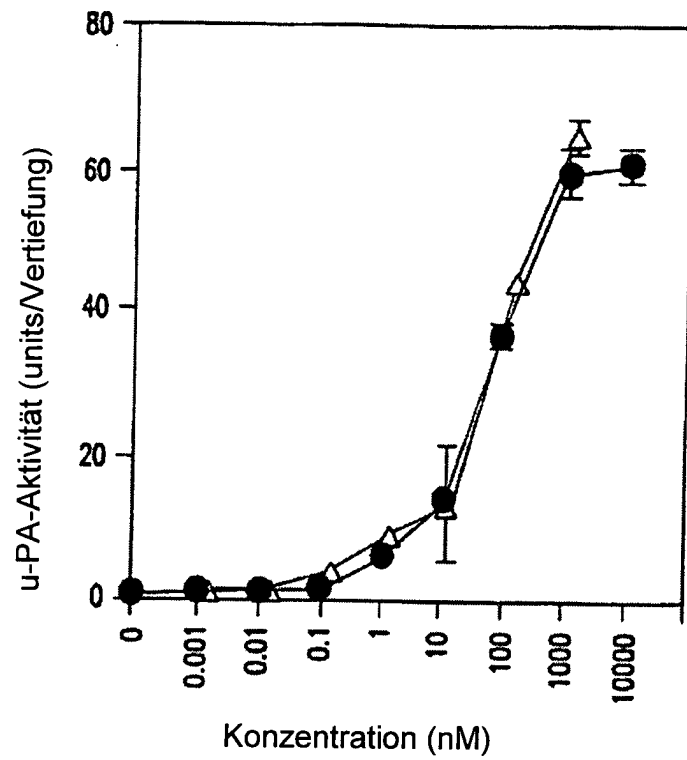


Abb. 9

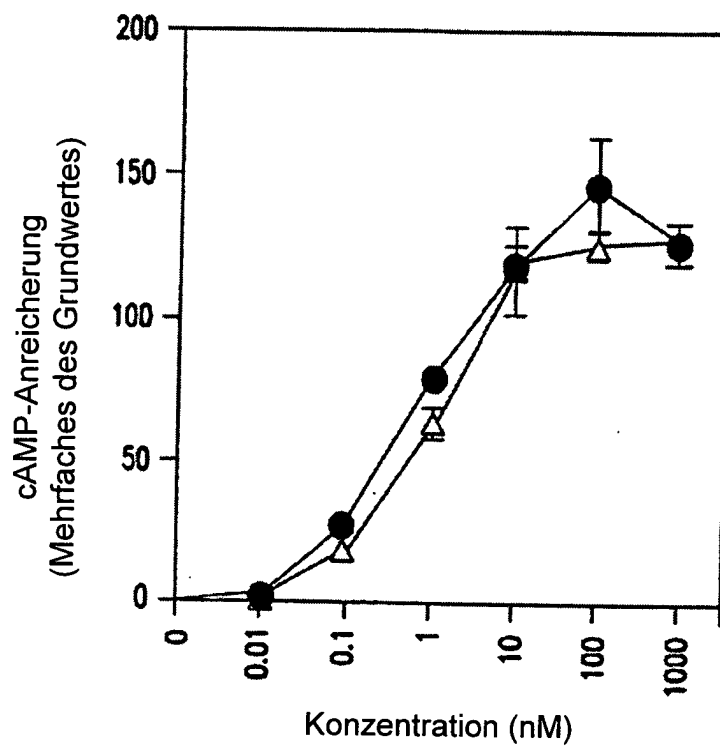


Abb. 10