

Segon – pferdefreundliches PMSG

Projektleitung:
Dr. rer. nat.
Martina Lösle
und Prof. Dr. PhD
Thorsten Buch

Folgeprojekt von PR 2017-03
In vitro-Herstellung des Hormons PMSG



Das Hormon *pregnant mare serum gonadotropin* (PMSG), auch bekannt als *equine chorionic gonadotropin* (eCG), spielt eine wichtige Rolle in der Reproduktionsbiologie von Pferden. Es wird während der frühen Trächtigkeit gebildet und unterstützt die Einnistung des Embryos in die Gebärmuttermenschleimhaut. Die Bildung von PMSG erfolgt durch Trophoblasten, die aus der äusseren Schicht der Fruchthülle in die mütterliche Gebärmuttermenschleimhaut eindringen und dort spezielle Strukturen, die Endometrial Cups, bilden. Diese Zellen differenzieren sich und beginnen mit der Produktion von PMSG, das dann im Blut der Stuten nachweisbar ist und auch für den Trächtigkeitssnachweis verwendet wird.

Eine interessante Eigenschaft von PMSG ist seine besondere chemische Struktur, die zu einer verlängerten Halbwertszeit im Blut führt. Dies macht es besonders wirksam, nicht nur bei Pferden, sondern auch bei anderen Tierarten, weshalb es in der Reproduktionsmedizin, beispielsweise in der Schweinezucht, zur Brunstsynchronisation und Follikelreifung, oder auch in der Forschung zur Generierung verschiedener Mausmodelle

eingesetzt wird. Trotz der Bemühungen, PMSG *in vitro* herzustellen, ist dies bisher nicht gelungen, was seine besondere Bedeutung in der Tierzucht weltweit unterstreicht.

Ziel der Studie

Mit dieser Studie wollen wir die künstliche Herstellung des Moleküls PMSG ermöglichen. Wir haben in der Studie PR2017/03 zunächst primäre PMSG-produzierende Zellen isoliert und immortalisiert, aber auch andere Zellen vergleichsweise genutzt. Diese sich endlos teilende Zellen wurden nun in der Folgestudie PR2018/05 für den Einsatz als PMSG-Produzenten optimiert und die Bioaktivität nachgewiesen. Mit der Fortführung des Projektes PR2018/05 möchten wir eine grössere Produktionsmenge an PMSG erreichen und dessen Bioaktivität sowie Effizienz testen. Ziel ist es, dass die PMSG-Isolierung aus dem Pferd nicht mehr nötig sein wird.

Relevanz

Aktuell wird PMSG ausschliesslich durch die Isolierung aus dem Plasma trächtiger Stuten kommerziell angeboten. Der Schweizer Tierschutzverein und die Deutsche Animal Welfare Foundation haben aufgedeckt, dass trächtige Stuten weltweit unter teils katastrophalen und unkontrollierten Bedingungen auf sogenannten Blutfarmen gehalten werden, ausschliesslich zur Gewinnung von PMSG. Berichten zufolge werden dabei mehr als 10 Liter Blut entnommen, was die in den europäischen Tierschutzvorschriften festgelegte zulässige Menge erheblich überschreitet. Zudem wurden Fälle von Trächtigkeitsabbrüchen dokumentiert, die ausschliesslich der PMSG-Produktion dienen. Um diesen Missbrauch zu bekämpfen, ist es unser vorrangiges Ziel, PMSG *in vitro* herzustellen.

Versuchsaufbau und neue Resultate

Innerhalb dieser Studie haben wir zunächst primäre PMSG-produzierende Zellen isoliert und immortalisiert. Nach eingehender Untersuchung konnten diese Zellen jedoch nicht in grössere Produktion gebracht werden. Die Untersuchung dieser Zellen läuft weiter, jedoch hat sich der Fokus nach eingehenden Analysen auf eine andere Zelllinie gebündelt. In Kulturbedingungen wuchs diese PMSG-produzierende (nicht-Pferde) Zelllinie um ein Vielfaches besser und konnten so in einer Menge hochgezogen werden, die es erlaubte, ausreichend Zellkulturüberstand zu ernten. Dieser Prozess wurde weiter optimiert und Strategien zur Aufgleisung professioneller Produktion entwickelt und getestet. Vorausgehende Berichte an dieser Stelle haben darüber berichtet. In diesem Jahr haben wir uns auf die Übertragbarkeit in eine kommerzielle Produktion und eine weite-

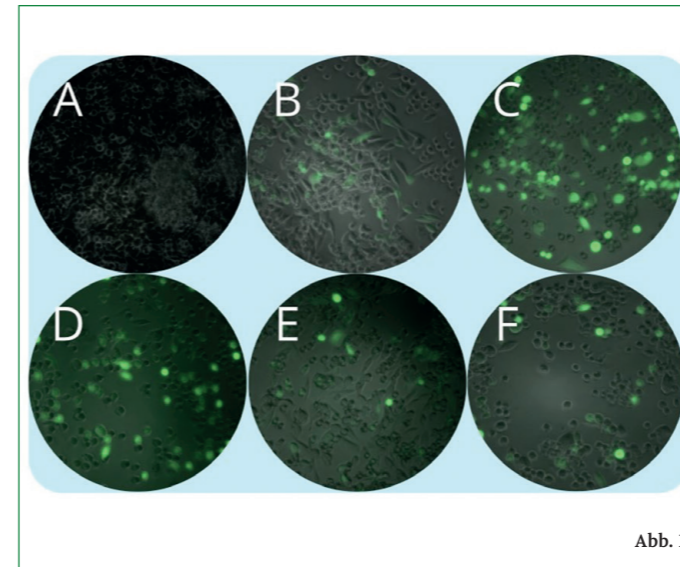


Abb. 1

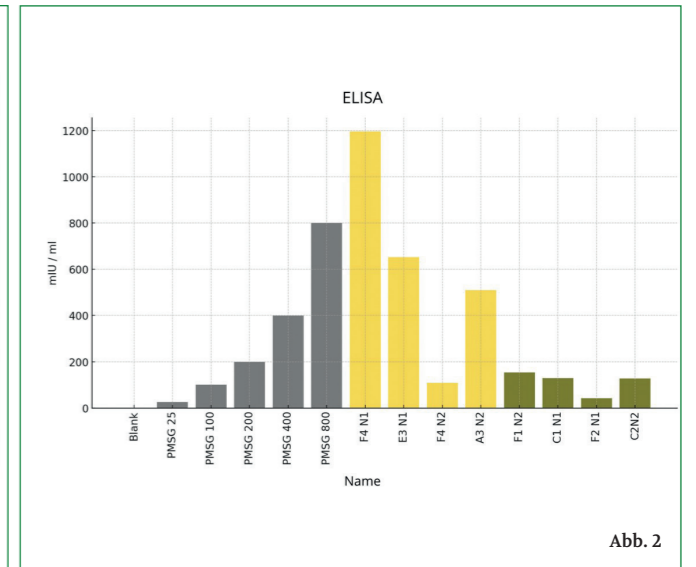


Abb. 2

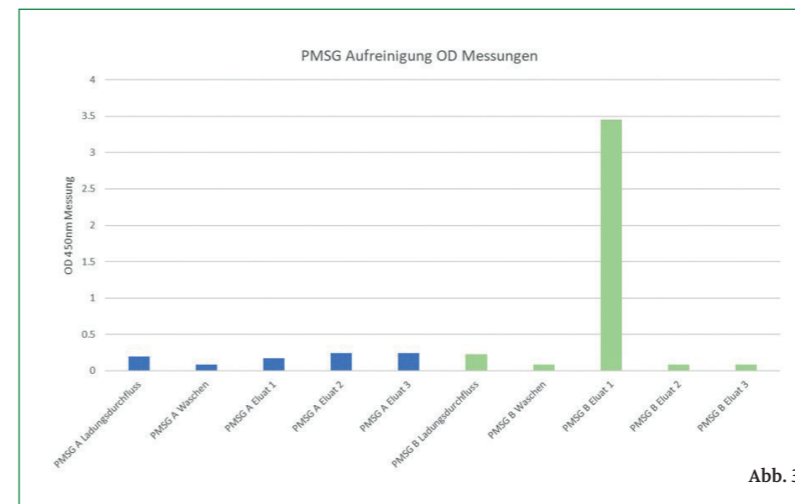


Abb. 3

re Optimierung der bestehenden Prozesse konzentriert, um erstens die Effizienz der Produktion der Zellen zu verbessern und zweitens den Herstellungsprozess so zu optimieren, dass der Verlust des Hormons während der Aufreinigung verringert werden kann. Beides ist uns gelungen. Mit einem neu erstellten Vektor, basierend auf bisherigen Erkenntnissen, wurde mit einer anderen Transfektionsmethode als bisher die genetische Information in die Zellen gebracht. Verschiedenste Einstellungen wurden getestet (Abb. 1) und die erfolgreichste in unserer Zelllinie angewendet. Diese Zellen produzieren nun das Hormon in grösserer Menge als zuvor (Abb. 2).

Im Laufe der Herstellung des Hormons erwies sich die Aufreinigung als kritischer Punkt mit den höchsten Verlusten an PMSG. Dies konnte mit verschiedenen Anpassungen behoben werden, so dass es nun kaum noch Verluste in diesem Produktionsschritt gibt (Abb. 3).

Ausblick

Die Zellen mit dem «neuen» Vektor werden nun gezielt mit Zellen, die den bisherigen Vektor tragen, verglichen. Dieser Vergleich wird in den nächsten Wochen abgeschlossen sein. Im Moment wird aktiv an einer Kommerzialisierung unseres Produktes gearbeitet. Für die bisherige Unterstützung und die weitere Wegbegleitung möchten wir uns bei der Stiftung Pro Pferd ganz herzlich bedanken.

Abbildung 1: Zelllinie Transfektion via Elektroporation mit verschiedenen Einstellungen. Hier wurde die beste Einstellung gesucht um gezielt genetische Information in die Zelle einzubringen. Ein positives Resultat wird über grüne Fluoreszenz der Zellen angezeigt A: Kontrolle ohne genetische Information, B-F verschiedene Einstellungen der Methode (Puls-Stärke, Frequenz und Dauer). Als geeignetste Variante erwies sich Einstellung C.

Abbildung 2: ELISA: Messen der produzierten Menge an PMSG. In grau der Standard des Kits als Vergleich. Gelb: Zelllinie in die der neue Vektor eingebracht wurde. Grün: Zelllinie in die mit derselben Methode parallel unser bisheriger Vektor eingebracht wurde. In allen Proben wurde dieselbe Zellzahl zur Produktion des Hormons eingesetzt.

Abbildung 3: Optimierung der Aufreinigung. PMSG wurde nach unserem in vorausgehender Arbeit etablierten SOP hergestellt. Der Zellüberstand wird im Labor in Tube Spin Reaktoren hergestellt, alle Überstände werden Chromatographisch aufgereinigt. In dieser Abbildung wird deutlich, dass die grosse Menge an PMSG im Endprodukt enthalten ist und nicht während Waschungen oder dem Beladen der Aufreinigungssäule verloren geht. Alle Proben wurden 1:100 verdünnt eingesetzt. PMSG A: Bisherige Methode der Aufreinigung, PMSG B: optimierte Methode der Aufreinigung. Danach erfolgt die Aufkonzentration des Produktes und der Pufferaustausch in ein Lösungsmittel, das die Lagerung und die Verwendung im Bioaktivitätstest erlaubt.