

3 Etablierung zellulärer CRF-rezeptorsubtypspezifischer Testsysteme

3.1 Einführung

Um heterolog exprimierte CRF-Rezeptorsysteme aufbauen zu können, wurde zuerst die cDNA vom CRF_{2a}- und CRF_{2b}-Rezeptor aus Ratte kloniert. Es wurde sich für die Spezies Ratte entschieden, weil zum einen Rattengewebe leicht zugänglich war und zum anderen der vorliegende CRF₁-Rezeptor auch aus Ratte kloniert worden war. Außerdem ist die cDNA in der kodierenden Sequenz des menschlichen CRF_{2a}-Rezeptors in 94%iger Übereinstimmung zu der kodierenden Region des Ratten-CRF-Rezeptors (Dieterich et al., 1997). Aus Bindungsstudien und Struktur-Wirkungs-Untersuchungen am CRF₁-Rezeptor ist bekannt (De Souza, 1995; Suman-Chauhan et al., 1999), daß es keine Unterschiede im pharmakologischen Profil von Ratten- und menschlichen CRF₁- sowie CRF₂-Rezeptoren gibt.

Für die heterologe Expression von Rezeptoren steht eine Vielzahl von Zellsystemen zur Verfügung. Die Wahl des Expressionssystems für GPCR richtet sich bspw. nach dem Zelltyp, der Rezeptorkapazität und dem Vorkommen eines bestimmten Signaltransduktionselements. Diese Faktoren können Ligandbindung und Transduktionseigenschaften in der Signalkaskade beeinflussen. Herkömmliche Zellsysteme sind Bakterien (i. a. *E. coli*), die aber keine Glykosylierung des Proteins gewährleisten, Hefen (i. a. *Saccharomyces cerevisiae*) als einfachstes eukaryontisches System, Insektenzellen (i. a. Sf9-Zellen) oder Säugetierzellen (i. a. HEK 293, CHO, MDCK usw.). Den zuverlässigsten Hintergrund für die Expression von GPCR liefern Zellen von Säugetieren, da Proteinsynthese, Membraninsertion sowie posttranslationale Modifikationen gewährleistet sind. Damit ist der untersuchte Rezeptor gewöhnlich funktionell. Demgegenüber steht eine mögliche Rezeptorpromiskuität, bei der verschiedene G-Proteine durch einen Rezeptor aktiviert werden, das mehrfache Signale zur Folge hat (Kenakin, 1996). Gegenüber aller genannten Zellsysteme sind entscheidende Vorteile von Säugerzellen, daß für klinisch relevante Targets vermutlich genau die Umgebung widerspiegelt wird, die der Umgebung in menschlichen Geweben am nächsten kommt. Außerdem wird eine bessere Permeabilität von Wirkstoffen in tierischen Zellen erreicht (Broach und Thorner, 1996). Da unter Anwendung von Säugerzellen in funktionellen Assay bspw. Protein-Protein-Wechselwirkungen unter Bedingungen nachgeahmt werden, die den physiologischen Zustand am deutlichsten wiedergeben,

eignen sich diese Zellen vorteilhaft für die Etablierung spezifischer Testsysteme von Rezeptoren.

Möglichkeiten der heterologen Genexpression bestehen darin, die entsprechende Zielzelle stabil oder transient zu exprimieren. Dabei führt der Gentransfer von Fremd-DNA in kultivierte Zellen über virale oder nicht-virale Vektoren bzw. über chemisch-physikalische Methoden zu transfizierten Zellen, bei denen die DNA ins Genom der Zelle integriert (stabile Expression) oder nicht integriert (transiente Expression) wird (siehe weitere Merkmale in Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Übersicht über Merkmale, Vor- und Nachteile von transienter und stabiler Expression von Fremd-DNA.

	transiente Expression	stabile Expression
Merkmale	<ul style="list-style-type: none"> • Nicht-Einbau des exogenen Gens ins Genom der Zielzelle • Gene liegen im Zellkern oder Cytoplasma vor • vorübergehende, starke Genexpression in Abhängigkeit vom Zelltyp (i. d. R. 24 – 72 h) 	<ul style="list-style-type: none"> • Einbau des exogenen Gens ins Genom der Zielzelle • bei Zellteilung Weitergabe der Information an die nächste Zellgeneration • Erzielung einer stabilen, dauerhaften Genexpression
Vorteile	<ul style="list-style-type: none"> • Genexpression regulierbar • schnelle Genexpression (meist schon nach einem Tag) • produziert funktionelle Proteine in relativ hoher Menge • jederzeitige Vektorauswahl möglich • unterschiedliche Zelltypen nutzbar 	<ul style="list-style-type: none"> • gute Homogenität der Expression • monoklonal • konstante, langanhaltende Expression • „kein Streß“ für die Zellen • Gen ist jederzeit in der Zielzelle verfügbar • weniger kostenintensiv
Nachteile	<ul style="list-style-type: none"> • hohe Heterogenität der Expression • polyklonal • kostenintensiv (Transfektionsmittel) • hoher DNA-Verbrauch • kann „Streß“ für die Zellen bedeuten • tötet die Wirtszelle • Kontaminationsgefahr 	<ul style="list-style-type: none"> • Genexpression nicht regulierbar • Anlegen einer stabilen Zelllinie kann zeitintensiv sein • Kotransfektion nicht ohne weiteres möglich

Bei der vorübergehenden Aufnahme der Fremd-DNA in die Zelle, bei Eukaryonten in den Zellkern, wird das gewünschte Gen auch nur vorübergehend mit dem Vorteil exprimiert, daß weitere Versuche schon ein bis drei Tage nach dem Gentransfer durchgeführt werden können. Der Nachteil besteht jedoch darin, daß zur Wiederholung von Versuchen auch der Gentransfer erneut erfolgen muß. Dieser muß nicht unbedingt genauso ausfallen wie der vorherige, so daß die Reproduzierbarkeit nicht so optimal wie bei der Verwendung stabil

transformierter Zelllinien ist. Beide Expressionsmöglichkeiten haben also Vor- und Nachteile (Tab. 3.1), und entsprechend der speziellen Fragestellung ist das günstigere System auszuwählen.

3.2 Klonierung der Ratten-cDNA der CRF₂-Rezeptoren

3.2.1 Corticotropin-Releasing Faktor Typ 2a Rezeptor

CRF_{2a} mRNA wird primär im Gehirn exprimiert, weswegen er der vorherrschend neuronale CRF₂-Rezeptorsubtyp ist (Chalmers et al., 1996). In der Vergangenheit wurde der CRF_{2a}-Rezeptor aus Hypothalamus-cDNA-Bibliotheken der Ratte (Lovenberg et al., 1995a) und aus cDNA-Bibliotheken des menschlichen cerebralen Cortex (Liaw et al., 1996) kloniert.

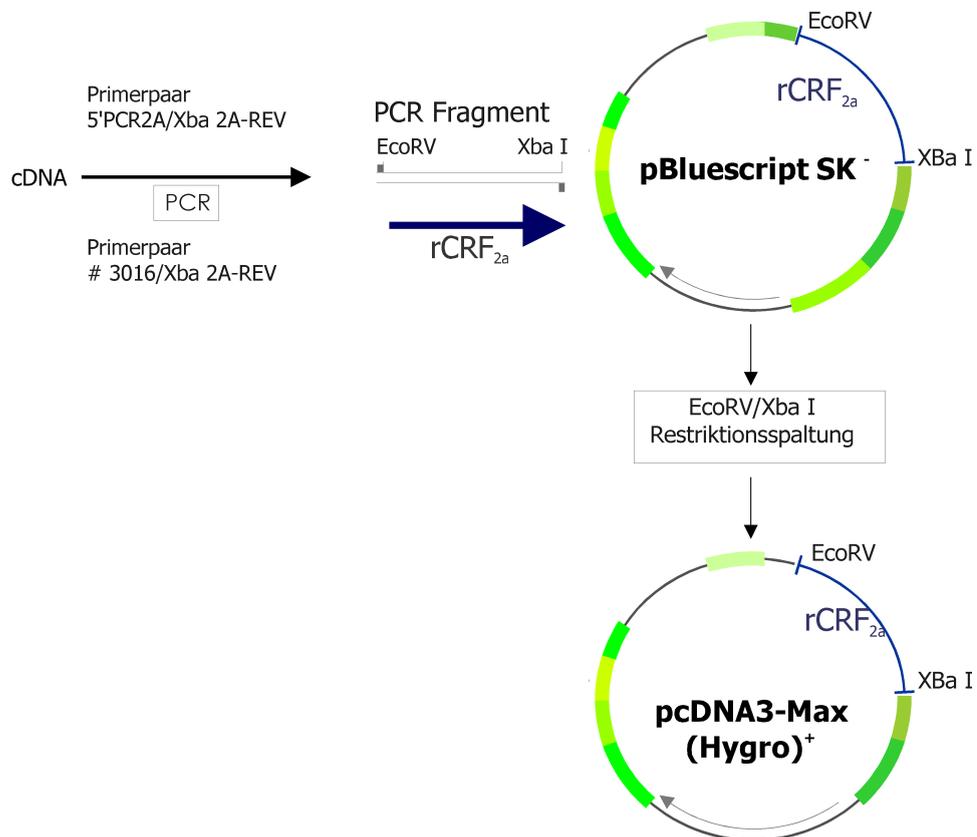


Abbildung 3.1: Klonierungsstrategie für die cDNA des rCRF_{2a}-Rezeptors.

Gesamt-RNA wurde aus Hypothalamusgewebe der Ratte präpariert und revers zu cDNA transkribiert. Unterschiedliche Kombinationen aus einer Vielzahl von Oligonukleotid-Primern (nicht gezeigt) wurden in zahlreichen PCR-Zyklen verwendet, um die volle Länge

des rCRF_{2a}-Rezeptors (Kap. 8.1) zu amplifizieren. Mit dem Primerpaar 5'PCR2A/Xba 2A-REV bzw. # 3016/Xba 2A-REV (Kap. 8.4) konnte ein Fragment reamplifiziert werden, das die erwartete Größe aufwies. Durch zusätzliche Variation der MgCl₂-Konzentration (Endkonzentration 0,5; 1,5; 2,5 mM) und der Hybridisierungstemperatur (48, 52, 56 °C) wurde ein PCR-Fragment erhalten, das im Agarosegel eine charakteristische Bande bei ~ 1200 bp zeigte.

Die Fragmentenden wurden geglättet und phosphoryliert. Anschließend wurde das Fragment gelelektrophoretisch isoliert, in die EcoRV-Klonierungsstelle des Plasmidvektors pBluescript SK⁻ kloniert und sequenziert. Für die heterologe Expression in HEK 293-Zellen wurde das EcoRV/XbaI geschnittene rCRF_{2a}-Fragment aus pBluescriptSK⁻ in den Expressionsvektor pcDNA3-Max(Hygro)⁺ subkloniert (Abb. 3.1).

3.2.2 Corticotropin-Releasing Faktor Typ 2b Rezeptor

Die mRNA für CRF_{2b}-Rezeptoren in Ratte ist sowohl im Gehirn als auch peripher im Herz und Skelettmuskel lokalisiert (Lovenberg et al., 1995b).

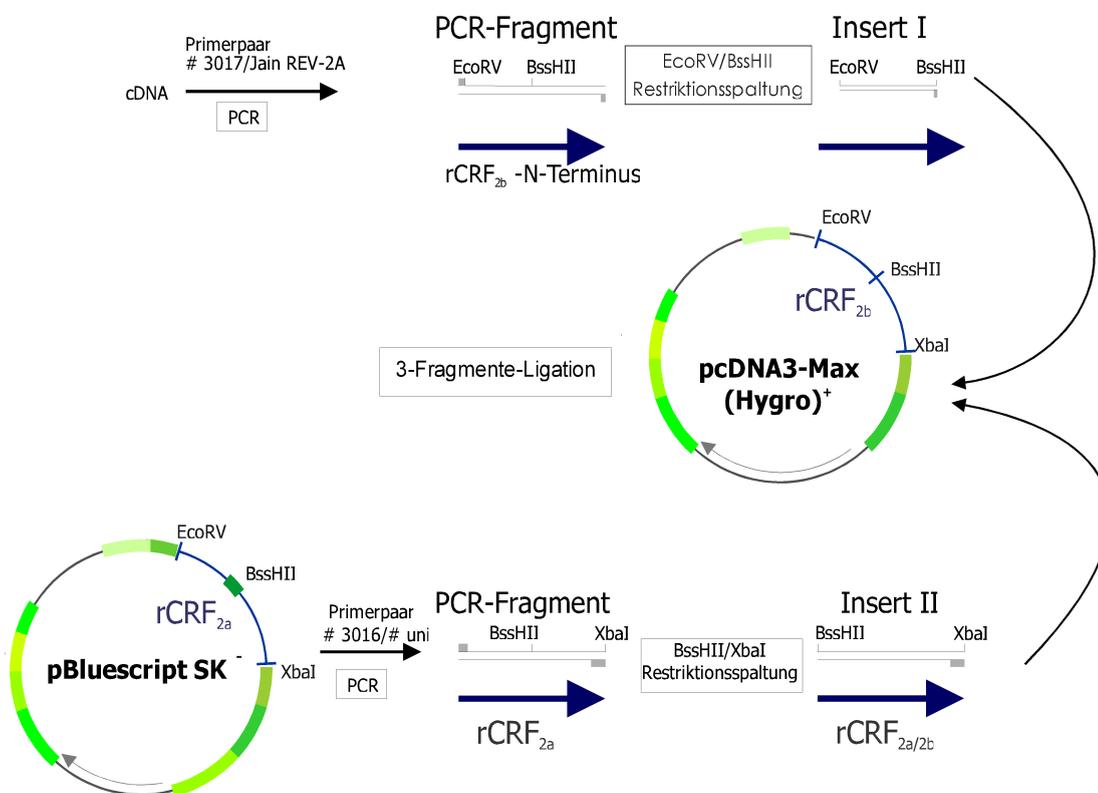


Abbildung 3.2: Klonierungsstrategie für die cDNA des rCRF_{2b}-Rezeptors.

Aus Ratten-Herzgewebe wurde mRNA isoliert. Die cDNA wurde durch Reverse Transkriptase mit Random Hexamer Primern oder mit dem genspezifischen Primer 2A-REV (Kap. 8.4) synthetisiert. Der Klon, der die Gesamt-cDNA für den CRF_{2b}-Rezeptor (Kap. 8.2) beinhaltetete, wurde durch zwei separate PCR-Produkte erhalten (Abb. 3.2).

Die für den N-terminalen Bereich des CRF_{2b}-Rezeptors kodierende cDNA wurde durch PCR mit den Primern # 3017/JainREV-2A (Kap. 8.4) reamplifiziert. Das erhaltene 450 bp-große Fragment wurde mit EcoRV und BssHII geschnitten und dadurch auf 220 bp verkürzt (Insert I). Eine PCR mit der cDNA des rCRF_{2a}-Rezeptors als Matrize, die im Vektor pBluescript SK⁻ subkloniert war, mit den Primern # 3016 und # uni (Kap. 8.4) führte im Agarosegel zu einer Fragmentgröße von ~ 1200 bp. Dieses PCR-Produkt wurde präpariert, eluiert und war nach Restriktion mit BssHII und XbaI ca. 1073 bp groß (Insert II). Die Klonierung des rCRF_{2b}-Rezeptors erfolgte daraufhin durch eine 3-Fragmente-Ligation: Insert I + Insert II + desphosphorylierter, mit EcoRV und XbaI geschnittener Vektor pcDNA3-Max(Hygro)⁺. Dabei ermöglichte die BssHII-Schnittstelle eine Fusion mit dem rCRF_{2a}-Rezeptor, da die für den C-terminalen Teil kodierende Sequenz für den rCRF_{2a}- und rCRF_{2b}-Rezeptor identisch ist. Zur Analyse der Sequenz wurden acht Klone ausgewählt und sequenziert.

3.2.3 Sequenzvergleich mit der publizierten Datenbanksequenz

Die isolierte cDNA des CRF_{2a}-Rezeptors aus Hypothalamusgewebe (Kap. 3.2.1) kodiert für ein Protein von 411 Aminosäuren (Kap. 8.3). Die cDNA stimmt mit der in der Literatur beschriebenden Sequenz (Lovenberg et al., 1995a) vom rCRF_{2a}-Rezeptor mit der Ausnahme von einer stillen Mutation sowie einem Nukleotidaustausch, der zu einem Aminosäureaustausch führt, überein. Das Protein zeigt sieben hydrophobe Regionen, die die Transmembrandomäne bilden, fünf potentielle N-verknüpfte Glykosylierungsstellen und sechs Cysteinreste in der N-terminalen extrazellulären Domäne. Im Vergleich zur publizierten Datenbanksequenz (U16235) kodiert aber GTC in Position 93 im N-Terminus für Valin, während bei Lovenberg et al. (1995a) an dieser Stelle Isoleucin aus ATC resultiert. Die Nukleotidfolge GTC wurde durch Sequenzierung von sechs unabhängigen Klonen bestätigt. Weiterhin fand in Position 9 ein Basenaustausch von CTG zu TTG statt (stille Mutation), der jedoch zu keinem Aminosäureaustausch führt und sich damit nicht auf den Phänotyp auswirkt. Sowohl TTG als auch CTG aus der Datenbanksequenz kodieren auf Proteinebene für Leucin.

Die klonierte cDNA aus Herzgewebe (Kap. 3.2.2) enthält im offenen Leserahmen 1293 bp, der die kodierende Region für den 431 Aminosäuren großen CRF_{2b}-Rezeptor trägt. Die 3-Fragmente-Ligation unter Zuhilfenahme der rCRF_{2a}-cDNA war möglich, da sich die Aminosäuresequenz der beiden CRF₂-Rezeptoren nur im Beginn des N-Terminus unterscheidet. Ab Position 35 (Kap. 8.3) ist die Aminosäureabfolge identisch. Die vollständige Sequenzierung aller acht Klone bestätigte bis auf das Triplet GTC in Position 93 die Gesamtrezeptor-Nukleotidsequenz wie von Lovenberg et al. (1995a) beschrieben.

Interessanterweise ist die Aminosäure Valin, die bei der hier durchgeführten Klonierung im CRF₂-Rezeptor in Position 93 erhalten wurde, in der Sequenz vom rCRF₁-Rezeptor (Perrin et al., 1993) und hCRF₁-Rezeptor (Chen et al., 1993) konserviert.

3.3 Heterologe Expression des Ratten-CRF₁-Rezeptors

Als heterologes Expressionssystem für die CRF-Rezeptorsubtypen und -Spleißvarianten wurden HEK 293-Zellen ausgewählt, weil sie schnell wachsen, leicht transfiziert werden können und das rekombinante Protein in ausreichenden Mengen produzieren. Obwohl CRF₁-Rezeptoren als endogene Rezeptoren mit 30 fmol/mg_{Protein} in HEK 293-Zellen bestimmt wurden (Dautzenberg et al., 2000), konnte im Bindungstest mit Sauvagin an nichttransfizierten HEK 293-Zellen keine spezifische sondern lediglich eine geringe nicht-spezifische Bindung detektiert werden. Im Radiorezeptor Assay von Fechner et al. (unpubliziert) an Membransuspensionen, die aus HEK 293-Zellen präpariert worden waren, waren ebenfalls keine endogenen CRF₁-Rezeptoren nachweisbar.

Als Kontrolle wurde außerdem der pcDNA3 Expressionsvektor ohne cDNA-Insertion bzw. mit Wasser (d. h. ohne Plasmid-DNA) in HEK 293-Zellen transfiziert (Kap. 2.3.2). Im Bindungsassay mit Sauvagin war an diesen Zellen keine spezifische Bindung meßbar. In Abhängigkeit vom Transfektionsmittel wurde eine geringfügig höhere nichtspezifische Bindung gegenüber der Bindung in untransfizierten Zellen erhalten.

Da die Expressionsrate rekombinanter Rezeptoren gewöhnlich 40 bis 400fach höher als in nativen HEK 293-Zellen ist, spielen endogen exprimierte CRF₁-Rezeptoren in HEK-Zellen in Bindungsstudien an rekombinanten CRF₁-Rezeptoren keine Rolle. Weder durch Northern Blot-Hybridisierung noch durch RT-PCR hoher cDNA-Konzentrationen war eine CRF₂ mRNA Expression in HEK-Zellen detektierbar (Dautzenberg et al., 2000), was die Anwendbarkeit dieser Zelllinie auch für CRF₂-Rezeptoren unterstreicht. Zur Expression von rCRF₁-Rezeptoren wurden zunächst HEK 293-Zellen sowohl transient als auch stabil exprimiert.

3.3.1 Charakterisierung des transient exprimierten CRF₁-Rezeptors

Die cDNA des rCRF₁-Rezeptors wurde transient in HEK 293-Zellen transfiziert (Kap. 2.3.2). Durch Sättigungsbindungsstudien (Kap. 2.4.2.1) wurde die Affinität des Radioliganden für diesen Rezeptorsubtyp (Gleichgewichts-Dissoziationskonstante, K_d) bestimmt. Die Expression des rekombinanten rCRF₁-Rezeptors wurde durch die Rezeptorkapazität (B_{max}) charakterisiert. Dabei wurde die Anzahl der Rezeptoren im Assay konstant gehalten und die Konzentration des Radioliganden variiert. Im Adenylatcyclase Assay (Kap. 2.4.3.2) wurde die Funktionalität des transient exprimierten rCRF₁-Rezeptors bestimmt.

Unter Verwendung des [¹²⁵I]Tyr⁰-Sauvagin als Radioliganden wurde für den rCRF₁-Rezeptor eine Sättigungskurve erhalten, die nach einem 1-Seiten-Bindungsmodell über einen Konzentrationsbereich von $3,13 \times 10^{-11}$ bis $2,00 \times 10^{-9}$ M angepaßt wurde. Für den in HEK 293-Zellen transient exprimierten rCRF₁-Rezeptor wurde ein K_d -Wert von $0,56 \pm 0,21$ nM sowie ein B_{max} -Wert von 198 ± 117 fmol/mg_{Protein} ermittelt (Mittelwert \pm SEM) (Abb. 3.3).

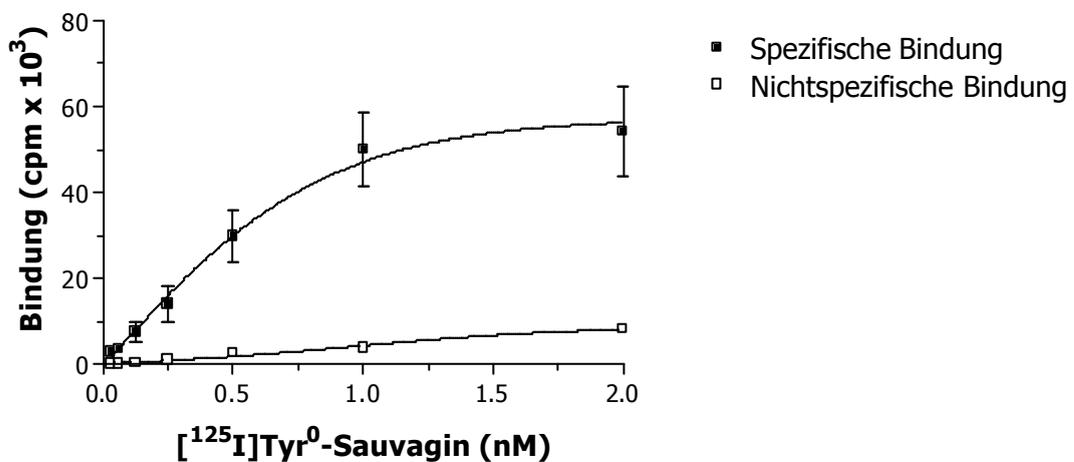


Abbildung 3.3: Rezeptorbindung von [¹²⁵I]Tyr⁰-Sauvagin an HEK 293-Zellen mit transient exprimierten rCRF₁-Rezeptoren. Jeder Wert ist der Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung von 3 individuellen Experimenten.

Im Adenylatcyclase Assay wurde für Sauvagin eine Konzentrations-Wirkungskurve mit einem sigmoidalen Kurvenverlauf erhalten (Abb. 3.4). Der EC₅₀-Wert für den transient exprimierten rCRF₁-Rezeptor ergab eine Konzentration von $6,52 \pm 2,43$ nM (Mittelwert \pm SEM). Demnach wird das transiente rCRF₁-Expressionssystem nur durch einen G_s-Protein-gekoppelten Rezeptorzustand beschrieben.

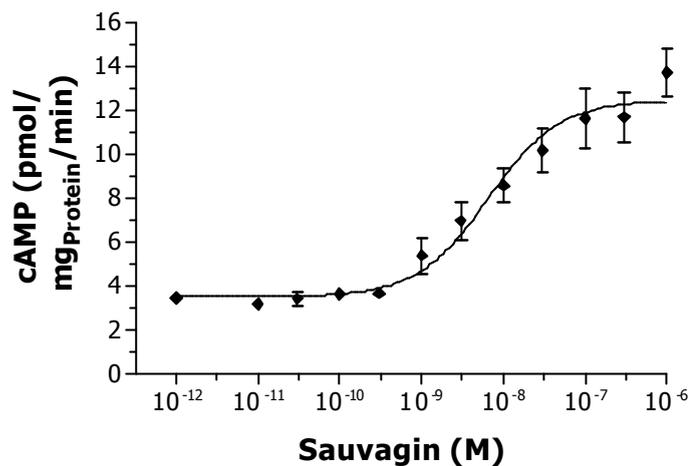


Abbildung 3.4: Konzentrations-Wirkungskurve für die Sauvagin-stimulierte Adenylatcyclase-Aktivität an HEK 293-Zellmembranen mit transient exprimierten rCRF₁-Rezeptoren. Jeder Wert ist der Mittelwert aus einer Zweifachbestimmung von 4 individuellen Experimenten.

3.3.2 Charakterisierung des stabil exprimierten CRF₁-Rezeptors

Die cDNA des rCRF₁-Rezeptors wurde stabil in HEK 293-Zellen transfiziert (Kap. 2.3.3) und damit der rCRF₁-Rezeptorsubtyp im Sättigungsbindungsassay in einfacher und alternativer Form (Kap. 2.4.2.1) charakterisiert. Zusätzlich wurden ein Teil der stabil transfizierten Zellen mit 100 – 200 ng/ml PTX inkubiert, um eine eventuelle G-Protein-Kopplung zu inaktivieren, und nach weiteren 24 h Wachstum zu Membranen für die Testung im Adenylatcyclase Assay (Kap. 2.4.3.2) präpariert (Kap. 2.3.4).

Für den stabil exprimierten rCRF₁-Rezeptor wurde ein K_d -Wert von 0,83 nM sowie ein B_{max} -Wert von 5355 fmol/mg_{Protein} über einen Konzentrationsbereich von $3,13 \times 10^{-11}$ bis $2,00 \times 10^{-9}$ M ermittelt. Diese Kurvenanpassung nach einem 1-Seiten-Bindungsmodell war nicht zufriedenstellend (Sättigungskurve nicht gezeigt). Stattdessen wurden unter Verwendung von zwei Radioligandkonzentrationsreihen verschiedener spezifischer Aktivität Sättigungsisothermen erhalten, die vorteilhafter über ein 2-Seiten-Bindungsmodell angepaßt werden konnten (Abb. 3.5). Dabei wurden für die Rezeptorbindung von [¹²⁵I]Tyr⁰-Sauvagin an HEK 293-Zellmembranen mit stabil exprimierten rCRF₁-Rezeptoren über einen weiter gefaßten Konzentrationsbereich von 5×10^{-12} bis 2×10^{-7} M zwei affine Bindungsstellen bestimmt ($K_{d,1} = 38,5 \pm 2,38$ pM; $B_{max,1} = 0,68 \pm 0,12$ pmol/mg_{Protein}, $K_{d,2} = 14,7 \pm 2$ nM; $B_{max,2} = 44,10 \pm 6,52$ pmol/mg_{Protein}) (Mittelwert \pm SD). Die hoch affine war 380fach affiner als die niedrig affine Bindungsstelle, aber umfaßte nur ungefähr 1,5% aller Bindungsstellen.

Durch die $[^{125}\text{I}]\text{Tyr}^0$ -Sauvagin-Tracerkonzentration aus zwei verschiedenen spezifischen Radioaktivitäten, die durch Hinzufügung von unmarkiertem 3-I-Tyr⁰,Gln¹-Sauvagin realisiert worden war, wurde im Assay ein höherer Konzentrationsbereich von mehr als zwei Zehnerpotenzen erfaßt (Vgl. Abb. 3.5 A). Dies erlaubte eine exaktere Anpassung der Sättigungsisothermen.

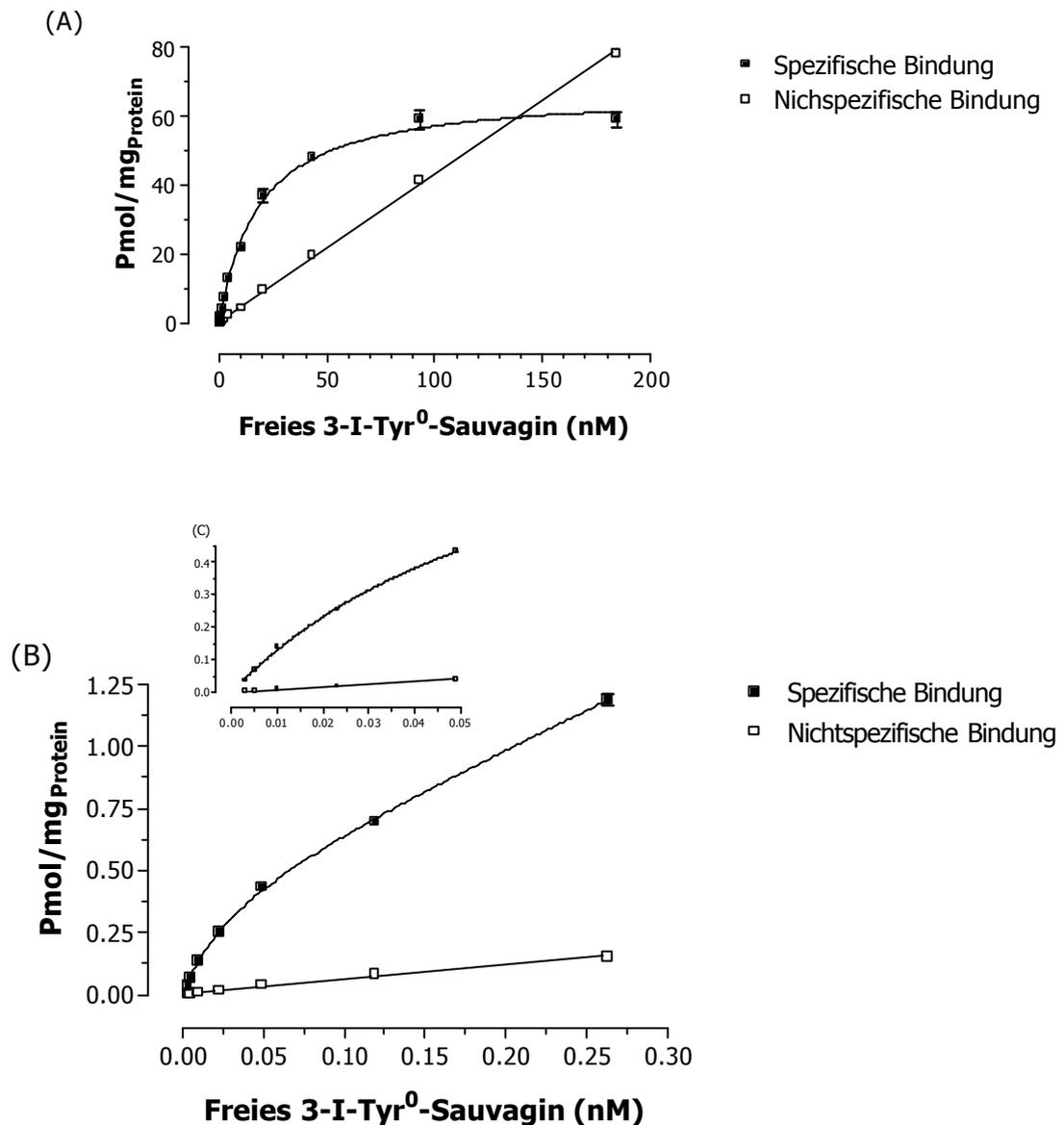


Abbildung 3.5: Rezeptorbindung von $[^{125}\text{I}]\text{Tyr}^0$ -Sauvagin an HEK 293-Zellmembranen mit stabil exprimierten rCRF₁-Rezeptoren über den gesamten Konzentrationsbereich (A), den Teil der niedrigen (B) sowie der niedrigsten (C) Ligandkonzentration. Jeder Wert ist der Mittelwert \pm SD von 3 individuellen Experimenten.

Auch für das stabil exprimierte rCRF₁-Rezeptorsystem wurde erwartungsgemäß gefunden, daß Sauvagin die Adenylatcyclase-Aktivität stimuliert (Abb. 3.6, untere Kurve, G_s). Außerdem erfolgt entsprechend einer G_i-Protein-Kopplung anschließend eine Inhibition der Adenylatcyclase. Als Resultat dessen wird eine Glockenkurve erhalten. Werden die Zellmembranen mit PTX vorbehandelt, verschwindet die G_i-Kopplung, weswegen die Kurve größer wird (Abb. 3.6, obere Kurve, G_i). Nichtsdestotrotz bleibt die Glockenform bestehen, d. h. obwohl keine G_i-Kopplung des Rezeptors mehr zu verzeichnen ist, kommt es trotzdem zu einer Abnahme der Adenylatcyclase-Aktivität bei hohen Sauvaginkonzentrationen. Somit kommt in diesem Rezeptorsystem die Hemmung der Adenylatcyclase bei hohen Sauvaginkonzentrationen durch eine G_i-Kopplung sowie einen G_i-unabhängigen Anteil zustande. Die Glockenkurven erreichten bei 3×10^{-9} M Sauvagin ein Maximum unabhängig davon, ob die stabil transfizierten HEK 293-Zellen mit PTX vorbehandelt wurden oder nicht.

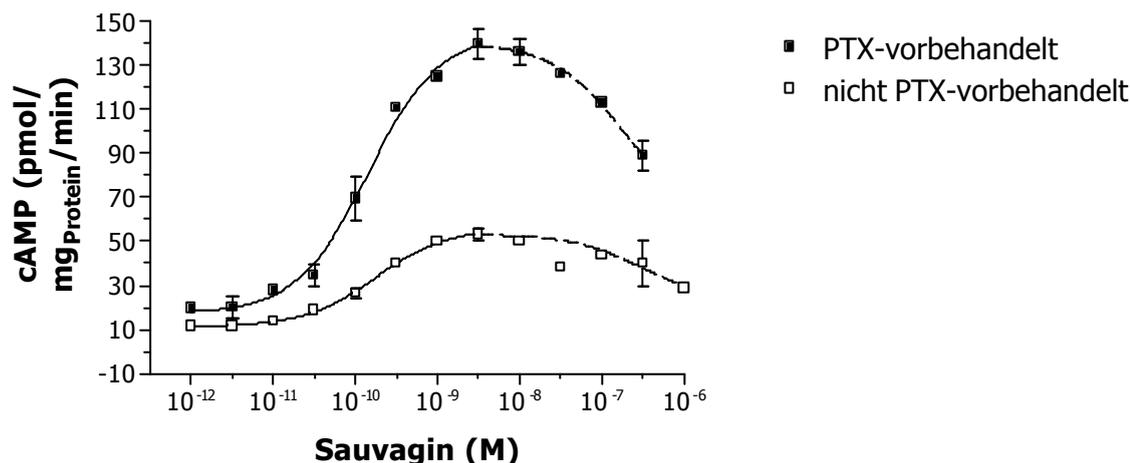


Abbildung 3.6: Konzentrations-Wirkungskurve für die Sauvagin-stimulierte/-inhibierte Adenylatcyclase-Aktivität an HEK 293-Zellmembranen mit stabil exprimierten rCRF₁-Rezeptoren mit und ohne Vorbehandlung durch PTX. Jeder Wert ist der Mittelwert \pm SD von 3 individuellen Experimenten.

Folglich liegt in Übereinstimmung mit den Bindungsdaten am stabilen rCRF₁-Expressionssystem sowohl ein G_s- als auch ein G_i-Protein-gekoppelter Rezeptorzustand vor. Die PTX-Vorbehandlung, wodurch G_i-Proteine inhibiert werden, steigerte die Maximalaktivität 3fach. Die Anpassung der aufsteigenden Kurvenäste resultierte in einen nahezu identischen EC₅₀-Wert für die PTX-vorbehandelten und nicht PTX-vorbehandelten Zellmembranen (vorbehandelt, $3,09 \times 10^{-10} \pm 1,67 \times 10^{-10}$ M; nicht vorbehandelt, $2,36 \times 10^{-10} \pm 8 \times 10^{-11}$ M) (Mittelwert \pm SD).

Die Bindungsergebnisse im Zusammenhang mit den Daten aus dem Adenylatcyclase Assay zeigen, daß die niedrige Anzahl hoch affiner Rezeptorbindungsstellen die hoch potente Aktivierung von G_s-Proteinen hervorruft, während eine kleine Anzahl von Bindungsstellen niedriger Affinität zu G_i koppelt. Somit teilen sich die Bindungsstellen am Rezeptor in 98% niedrig affine (G_i und ungekoppelter Zustand) und 2% hoch affine (G_s) Bindungsstellen auf.

3.4 Vergleich und Schlußfolgerungen: Transient und stabil exprimierte CRF₁-Rezeptorsysteme

Beide rCRF₁-rezeptorspezifischen Testsysteme wurden sowohl im Sättigungsassay als auch im Adenylatcyclase Assay charakterisiert (Kap. 3.3.1, 3.3.2).

Die Dissoziationskonstanten der rCRF₁-Rezeptorbindung von [¹²⁵I]Tyr⁰-Sauvagin an transient und stabil exprimierenden HEK 293-Zellen sind identisch und unabhängig von der Expressionsrate des Rezeptors (Tab. 3.2), wenn beide Sättigungskurven über ein 1-Seiten-Bindungsmodell angepaßt werden.

Tabelle 3.2: Bindung (K_d) und Rezeptorkapazität (B_{max}) der [¹²⁵I]Tyr⁰-Sauvagin Bindung an rekombinanten, transient und stabil exprimierten rCRF₁-Rezeptorsystemen.

Zellen/ Rezeptor	Expression	K _d (nM)	B _{max} (fmol/mg _{Protein})	Rezeptoren pro Zelle
HEK/rCRF ₁	transient	0,56	198 ± 117	(6 – 20) × 10 ³
HEK/rCRF ₁	stabil ¹	0,83	5355 ± n. d.	(900 – 1000) × 10 ³
HEK/rCRF ₁	stabil ²	0,04 14,70	680 ± 120 44100 ± 6520	n. d. n. d.

Während die Rezeptorbindung von transient exprimierten rCRF₁-Rezeptoren zufriedenstellend nach einem 1-Seiten-Bindungsmodell beschrieben wurde (Abb. 3.3), war das stabil exprimierte rCRF₁-Rezeptorsystem viel genauer nach einem 2-Seiten-Bindungsmodell anpaßbar (Abb. 3.5). Für letzteres System konnte eine 27fach höhere Rezeptorkapazität (B_{max}, Rezeptoren/Zelle) (Tab. 3.2) bestimmt werden. Somit enthielten stabil exprimierende HEK 293-Zellen 27mal mehr rCRF₁-Rezeptoren als transient exprimierende

¹ nach dem 1-Seiten Bindungsmodell angepaßt

² nach dem 2-Seiten-Bindungsmodell angepaßt

Zellen. Aufgrund der wesentlich höheren Rezeptorkapazität in Zellen mit stabil exprimierten rCRF₁-Rezeptoren konnten daher hohe und niedrig affine Bindungsstellen ermittelt werden, während die hoch affine Bindungsstelle an transient exprimierten CRF-Rezeptoren nicht bestimmbar war. Die niedrige Rezeptorkapazität in den transient exprimierenden Zellen ließ nur die Charakterisierung einer Bindungsstelle zu.

Auch am stabil exprimierten CRF_{2a}-Rezeptorsystem wurde die Sättigungskurve nach einem 2-Seiten-Bindungsmodell ($K_{d,1} = 44 \pm 9$ pM; $B_{max,1} = 2,81 \pm 0,64$ fmol/mg_{Protein}, $K_{d,2} = 4,1 \pm 0,25$ nM; $B_{max,2} = 160 \pm 24$ fmol/mg_{Protein}) angepaßt und gezeigt, daß [¹²⁵I]Tyr⁰-Sauvagin verschiedene Bindungsstellen an stabil exprimierten CRF-Rezeptoren erkennt (Rominger et al., 1998). Hinsichtlich der Rezeptorkapazitäten werden bspw. für CHO-pro5-Zellen mit stabil exprimierten rCRF₁- und rCRF_{2a}-Rezeptoren vergleichbare Expressionsniveaus von 103 bis 1842 fmol/mgProtein beschrieben (Suman-Chauhan et al., 1999).

CRF-Rezeptoren werden im Prozeß der Signaltransduktion gewöhnlich an G_s-Proteine gekoppelt und stimulieren somit die Aktivität der Adenylatcyclase (Chen et al., 1986). Dieser Zustand, dargestellt in Abb. 3.4, wird von transient exprimierten rCRF₁-Rezeptoren sehr gut wiedergegeben. Dagegen konnte im Adenylatcyclase Assay an stabil exprimierten rCRF₁-Rezeptoren gezeigt werden, daß die Rezeptoren in HEK 293-Zellen von zwei verschiedenen G-Proteinen gekoppelt werden (Abb. 3.6): neben der G_s-Kopplung gibt es auch eine G-Kopplung, die durch PTX inhibiert werden kann. Ein Unterschied in der Charakteristik beider Expressionsmöglichkeiten ist jedoch der Kurvenverlauf: während die transient exprimierten rCRF₁-Rezeptoren durch eine sigmoidale Konzentrations-Wirkungskurve beschrieben werden, kennzeichnet die stabil exprimierten rCRF₁-Rezeptoren eine Glockenkurve mit auf- und absteigenden Ast. Letztere wird durch die Annahme erklärt, daß vermutlich die Stimulation der Enzymaktivität über G_s bei niedriger Peptidkonzentration durch die Inhibierung (über die G_i-gekoppelte Phase) bei hohen Peptidkonzentrationen vermindert wird. Nach Inhibierung von G_i durch PTX stieg die Adenylatcyclase Aktivität 3fach an, offensichtlich wegen der Deaktivierung der hemmenden G_i-gekoppelten Aktivität. Aber diese glockenförmige Kurve und folglich auch die hemmende Phase bleibt bestehen. Das bedeutet, daß wenigstens ein Teil der Hemmung nicht durch Kopplung des Rezeptors zu G_i verursacht wurde.

Aus dem Vergleich beider rCRF₁-Rezeptorsysteme wurden folgende Schlußfolgerungen gezogen:

1. Die rCRF₁-Rezeptoren liegen in viel komplexerer Form im stabilen als im transienten zellulären Expressionssystem vor. Die Rezeptor-G-Protein-Kopplung zu unterschiedlichen G-Proteinen am stabil exprimierten rCRF₁-Rezeptor zeigte zwei simultane G_s- und G_i-Kopplungen zum Rezeptor, wobei nur ein geringer Anteil an Rezeptorbesetzung für die G_s-Protein-Kopplung verantwortlich war.
2. Obwohl simultane G_s- und G_i-Kopplungen zum stabil exprimierten rCRF₁-Rezeptor ermittelt wurden, ist es für Screeningversuche an den CRF-Rezeptorsubtypen ausreichend, nur einen Rezeptorzustand zu erfassen. Dies wird mit dem transient exprimierten rCRF₁-Rezeptorsystem gewährleistet, so daß im folgenden neben dem hier charakterisierten rCRF₁-Rezeptorsystem auch beide transient exprimierten rCRF₂-Rezeptor-Spleißvarianten ausgewählt werden.
3. Unter der Voraussetzung, daß die Verhältnisse der getesteten Peptide in der Bindungsaffinität ab auch in der Potenz richtig widerspiegelt werden (siehe Kap. 4), eignet sich das transient exprimierte CRF-Rezeptorsystem zur weiteren Verwendung in biochemischen Assays. Die transient exprimierten CRF-Rezeptorsysteme (rCRF₁, rCRF_{2a}, rCRF_{2b}) sollen vor allem dazu dienen, potentiell selektive Liganden aus dem Screeningverfahren in Bindungs- und Adenylatcyclase Assays detaillierter zu charakterisieren.
4. Die Kopplung von in HEK 293-Zellen überexprimierten, stabil transfizierten rCRF₁-Rezeptoren zu unterschiedlichen G-Proteinen (G_s, G_i, G_{q,11}) erlaubt ein Screening hoch affiner Peptidliganden entsprechend ihrer G-Protein-Kopplung. Als Methode kann die Bestimmung der GTPγS-Bindung (Wietfeld et al., 2004) angewandt werden.

