

## **4 Aufbau biochemischer Assays für CRF-Rezeptoren**

### **4.1 Einführung**

Die heterogene Verteilung der CRF-Rezeptorsubtypen (CRF<sub>1</sub>, CRF<sub>2</sub>) und seiner nativen Liganden im Gehirn und peripher in anderen Gewebsabschnitten von Säugetieren zeigt, daß sich unterschiedliche physiologische Funktionen für beide Rezeptorsubtypen ergeben. Um jeden Rezeptorsubtyp besser charakterisieren und ihre differenzierte Wirkung bei physiologischen Prozessen aufklären zu können, sind sehr wirksame und vor allem selektive Liganden erforderlich. Somit sind solche biochemischen Assays von besonders großem Interesse, mit denen CRF-rezeptorsubtypselektive Liganden aufgefunden werden können, um ihre Funktionen getrennt untersuchen zu können.

Zur Charakterisierung von Rezeptorbindung und -aktivierung existieren eine Reihe von Assays in unserer Arbeitsgruppe. Bindungsstudien an Membranpräparationen von Rattenhirnen sowie die Bestimmung der Peptid-induzierten ACTH/ $\beta$ -Endorphin-Freisetzung aus Hypophysenzellprimärkulturen erlauben eine Charakterisierung des CRF<sub>1</sub>-Rezeptors (Beyermann et al., 1996; Beyermann et al., 2000; Rohde et al., 1996). Auch durch die Messung der Testosteron-Produktion in Leydig-Zellen werden CRF<sub>1</sub>-Rezeptoren erfaßt (Heinrich et al., 1998). Studien zur CRF-induzierten Relaxation vorkontrahierter Mesenterialgefäße (Lei et al., 1993) führten zu dem Nachweis, daß dieser Effekt durch CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren vermittelt wird (Rohde et al., 1996).

Nach transienter oder stabiler Expression des Rezeptors in Säugetierzellen kann der biologische Effekt direkt an der Signalkette in der Zelle verfolgt werden, während bei den bereits bestehenden Methoden das Endprodukt eines Effekts in der Zelle (Testosteron, Kontraktion) gemessen wird. Obwohl verschiedenartige Assays bereits bestehen, ist die Anwendung von heterolog exprimierten Zellsystemen vorteilhafter, weil dieselbe zelluläre Umgebung vorliegt und eine Testung an separaten Rezeptorsubtypen sowohl in funktionellen Assays als auch in Bindungsassays möglich ist. Desweiteren sind heterolog exprimierte Testsysteme<sup>1</sup> weniger aufwendig in der Vorbereitung (im Gegensatz zur Isolierung von Leydig-Zellen) und in der Durchführung (im Gegensatz zur Relaxationsmessung an Mesenterialgefäßen) und somit auch für einen hohen Probendurchsatz im HTS-Maßstab geeignet.

---

<sup>1</sup> Transient transfizierte Zellen erlauben eine schnelle CRF-Rezeptor-Expression schon nach einem Tag. Bei einer stabilen Zelllinie ist der CRF-Rezeptor jederzeit in der Zielzelle verfügbar.

Mit den heterolog exprimierten CRF-Rezeptorsystemen (HEK 293-Zellen, die jeweils den rCRF<sub>1</sub>-, rCRF<sub>2a</sub>- und rCRF<sub>2b</sub>-Rezeptoren transient exprimieren; Kap. 3.4) wurde ein Radio-rezeptor Bindungsassay (Kap. 4.2) etabliert und die rCRF-Rezeptoren anhand bekannter Liganden der CRF/Urocortin Peptidfamilie charakterisiert. Die Bindungsdaten wurden verglichen mit vorliegenden Daten von endogenen Rezeptorsystemen (Rattenhirn- und Mausherzmembranen).

Für Struktur-Wirkungs-Untersuchungen am Ligand-CRF-Rezeptorsystem wurden zwei unterschiedliche biochemische Methoden verwendet. Während die Bestimmung der Adenylatcyclase-Aktivität an heterolog exprimierten Membranproteinen am FMP bereits am V2 Vasopressin Rezeptor etabliert war (Birnbaumer et al., 1992) und auf die CRF-Rezeptorsubtypen (Kap. 4.3.1) angewandt wurde, konnte im Verlauf dieser Arbeit ein neu entwickelter funktioneller Bioassay (Kap. 4.3.2) erprobt werden. Beide Methoden werden in diesem Kapitel detailliert dargestellt und nach Testung ausgewählter Liganden der CRF/Urocortin Peptidfamilie miteinander verglichen. Ziel des Vergleiches war es, ihre jeweiligen Vor- und Nachteile herauszuarbeiten, um ihre gezielte Anwendbarkeit/Nicht-anwendbarkeit für die Testung peptidischer Ligandbibliotheken und für das Auffinden CRF-rezeptorsubtypselektiver Liganden zu zeigen.

## **4.2 Bindungsassays zur Charakterisierung der heterolog exprimierten CRF-Rezeptoren**

### **4.2.1 Auswahl des geeigneten Radioliganden**

Bis heute sind zahlreiche kommerziell erhältliche Radioliganden verfügbar (Tab. 4.1), durch die die CRF-Rezeptoren pharmakologisch charakterisiert werden können. Erste Studien des CRF-CRF-Rezeptorsystems *in vitro* wurden mit radioaktiv, d. h. [<sup>125</sup>I]-markiertem oCRF und -r/hCRF durchgeführt. [<sup>125</sup>I]Tyr<sup>0</sup>-oCRF wird mit hoher Affinität vom CRF<sub>1</sub>-Rezeptorsubtyp gebunden. Als Resultat seiner niedrigen Affinität gegenüber CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren war er der bevorzugte Radioligand für Untersuchungen am CRF<sub>1</sub>-Rezeptor. Die Verwendung von [<sup>125</sup>I]Tyr<sup>0</sup>-r/hCRF ist ebenso auf den CRF<sub>1</sub>-Rezeptorsubtyp limitiert, da er nur diesen hoch affin bindet. Obwohl Studien gezeigt haben, daß [<sup>125</sup>I]Tyr<sup>0</sup>-CRF eine spezifische und sättigbare Bindung an Gehirn- und peripheren Gewebsabschnitten zeigt, ist [<sup>125</sup>I]Tyr<sup>0</sup>-CRF ein nur schwach bindender Radioligand für CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren (Rominger et al., 1998).

**Tabelle 4.1: Radioliganden für Bindungsstudien und ihre Spezifität hinsichtlich der CRF-Rezeptorsubtypen.**

Radioligand	Rezeptorsubtyp	Referenz
[ <sup>125</sup> I]Tyr <sup>0</sup> -oCRF	CRF <sub>1</sub>	(Perrin et al., 1986)
[ <sup>125</sup> I]Tyr <sup>0</sup> -r/hCRF	CRF <sub>1</sub>	(De Souza, 1987)
[ <sup>125</sup> I]Tyr <sup>0</sup> -rUrocortin	CRF <sub>1</sub> , CRF <sub>2</sub>	(Perrin et al., 1999)
[ <sup>125</sup> I]Tyr <sup>0</sup> -Sauvagin	CRF <sub>1</sub> , CRF <sub>2</sub>	(Grigoriadis et al., 1996)
[ <sup>125</sup> I]-Antisauvagin-30	CRF <sub>2a</sub>	(Higelin et al., 2001)
[ <sup>125</sup> I]D-Tyr <sup>1</sup> -Astressin	CRF <sub>1</sub> , CRF <sub>2</sub>	(Perrin et al., 1999)
[ <sup>125</sup> I]-Tyr <sup>0</sup> -Astressin	CRF <sub>1</sub> , CRF <sub>2</sub>	(Hoare et al., 2003)
[ <sup>3</sup> H]-Urocortin	CRF <sub>1</sub> , CRF <sub>2</sub>	(Gottowik et al., 1997)

Auch das radioaktiv markierte Tritiumderivat [<sup>3</sup>H]-Urocortin ist aufgrund der gegenüber des [<sup>125</sup>I]-Radioisotops wesentlich geringeren spezifischen Aktivität nicht geeignet. Außerdem besteht der große Nachteil dieses Radioliganden und auch des [<sup>125</sup>I]Tyr<sup>0</sup>-rUrocortins in ihrer hohen unspezifischen Adsorptionsfähigkeit gegenüber Kunststoff und Glas. Dies kann zwar durch Vorbehandlung der Gefäße mit silikonisierenden Agenzien, z. B. Chloralkylsilanen, minimiert werden, bedeutet aber einen zeitlich erheblichen Mehraufwand und ist für Bindungsstudien an intakten Zellen in Zellkulturplatten nicht praktikabel.

Das CRF-analoge Peptid Sauvagin wurde erstmals von Grigoriadis et al. (1996) als Radioligand zur Charakterisierung des hCRF<sub>2a</sub>-Rezeptors eingesetzt. [<sup>125</sup>I]Tyr<sup>0</sup>-Sauvagin zeigt eine hohe spezifische Aktivität, wird von beiden CRF-Rezeptorsubtypen mit vergleichbarer sowie hoher Affinität gebunden und zeichnet sich durch eine geringe unspezifische Bindung aus. Diese Eigenschaften des [<sup>125</sup>I]Tyr<sup>0</sup>-Sauvagins machen ihn zu einem optimalen Radioliganden für ein Screening von Liganden, so daß er für die Charakterisierung der heterolog exprimierten CRF-Rezeptorsubtypen in den folgenden Bindungsassays ausgewählt wurde.

Soll dagegen der CRF<sub>2</sub>-Rezeptor *in vitro* untersucht werden, bspw. in einer Zellpopulation oder in einem Gewebe, in dem beide CRF-Rezeptorsubtypen exprimiert werden, eignet sich [<sup>125</sup>I]-Antisauvagin-30, da dieser Radioligand selektiv nur den CRF<sub>2</sub>-Rezeptorsubtyp markiert.

Je nach Verwendung eines hoch affinen Agonisten oder Antagonisten als Radioligand können verschiedene Populationen von Rezeptorkonformationen erfaßt werden. Während der Agonist gleichzeitig eine hoch affine und, damit den gekoppelten Rezeptorzustand,

und eine niedrig affine Bindungsstelle, und damit den ungekoppelten Rezeptorzustand, der Rezeptor-G-Protein-Kopplung beschreibt, macht dies der Antagonist nicht. Die Affinität eines Antagonisten ist daher unabhängig von solch einer Kopplung, bspw. wird unter Verwendung von [<sup>125</sup>I]-Tyr<sup>0</sup>-Astressin der ungekoppelte Rezeptorzustand von rekombinanten Rezeptoren charakterisiert (Hoare et al., 2003). Dieser Radioligand ist auch geeignet, um das Bindungsverhalten von Agonisten und Antagonisten zu untersuchen.

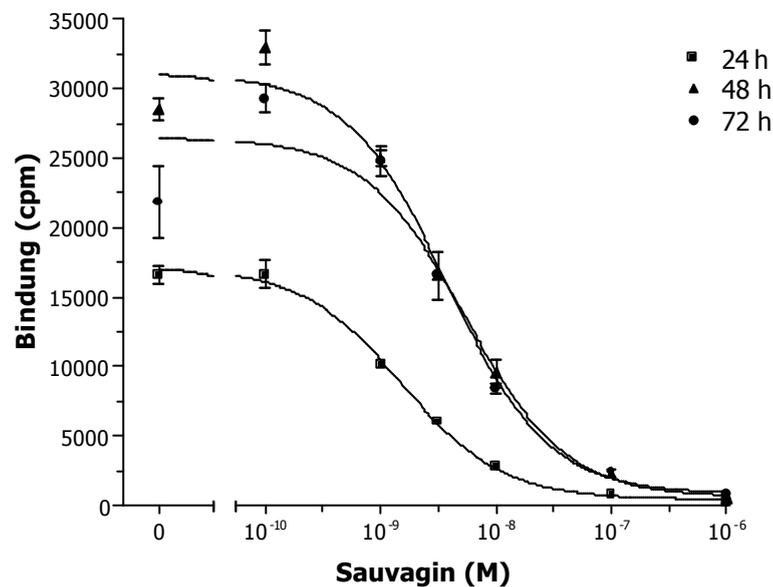
#### 4.2.2 Optimierung der Versuchsbedingungen für Bindungsstudien

Die Bindungsstudien wurden am Kompetitionsbindungsassay (Kap. 2.4.2.2) an intakten Zellen anhand des transient exprimierten rCRF<sub>1</sub>-Rezeptors etabliert. Neben der Optimierung der Transfektionsbedingungen (Wahl des Transfektionsmittels, Menge der zu transfizierenden DNA) wurde außerdem ermittelt, welche Zeitdauer (24, 48 oder 72 h) zwischen transients Transfektion und Durchführungstag des Bindungsassays liegen sollte, um eine hohe Expression des Rezeptors in HEK 293-Zellen und damit eine hohe spezifische Bindung des Ligand-Rezeptor-Komplexes zu erzielen.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Die spezifische Bindung, die Differenz aus totaler und nichtspezifischer Bindung, betrug in allen drei Versuchen zwischen 16000 und 28000 cpm (Abb. 4.1). Somit ist eine ausreichend hohe spezifische Bindung gewährleistet.
2. Die Dissoziationskonstanten entsprechen mit 1,1 nM (nach 24 h) sowie 2,7 nM (nach 48 bzw. 72 h) dem K<sub>d</sub>-Wert von Sauvagin, der auch im vergleichbaren Radiorezeptor Assay an Rattenhirnmembransuspensionen ermittelt wurde. Auch die vor den Bindungsversuchen, 48 bzw. 72 h nach Transfektion bestimmte Zellzahl nahm nicht mehr wesentlich zu; ein konfluenter Zellrasen lag jedoch erst nach 72 h vor. Somit sind alle nachfolgenden Bindungsuntersuchungen an den heterolog exprimierten CRF-Rezeptorsubtypen 72 h nach Transfektion durchgeführt worden.
3. Bindungsstudien von oCRF und α-helikalem CRF(9-41) an rCRF<sub>1</sub>-Rezeptoren transient exprimierender HEK 293-Zellen bei drei unterschiedlichen Temperaturen (4, 25, 37 °C) führten zu dem Ergebnis, daß bei 25 °C die optimale spezifische Bindung erhalten wurde. Die spezifische Bindung in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur war tendenziell bei beiden Liganden identisch. Somit wurden alle folgenden Bindungstests bei einer Temperatur von 25 °C inkubiert.

4. Unter diesen optimierten Assaybedingungen wurde eine spezifische Bindung von 8 - 12% für den rCRF<sub>1</sub>-Rezeptor, 20% für den rCRF<sub>2a</sub>-Rezeptor und 40% für den rCRF<sub>2b</sub>-Rezeptor der totalen [<sup>125</sup>I]Tyr<sup>0</sup>-Sauvagin Bindung bestimmt. Aufgrund der hohen Rezeptorkapazität, insbesondere bei beiden rCRF<sub>2</sub>-Rezeptoren (Tab. 4.2) in den Zellen ist eine Verarmung an freiem, d. h. ungebundenem Liganden ("Ligandenverarmung", ligand depletion) nicht vermeidbar. Da aber das hier ausschließlich verwendete Auswerteprogramm KELL (Kap. 2.4.4), im Gegensatz zu einfachen Kurvenanpassungen, den exakten K<sub>d</sub>-Wert nach dem Massenwirkungsgesetz berechnet, spielt die gewisse Ligandenverarmung keine Rolle.



**Abbildung 4.1:** Konkurrenz von [<sup>125</sup>I]Tyr<sup>0</sup>-Sauvagin durch Sauvagin gebunden an HEK 293-Zellen mit transient exprimierten rCRF<sub>1</sub>-Rezeptoren. Es wurde die Genexpression über die Bindung in Abhängigkeit von der Zeitspanne zwischen Transfektion und Bindungsversuchstag untersucht. Jeder Wert ist der Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung. Das Experiment wurde mit identischem Resultat zweimal wiederholt.

Eine große Herausforderung bei der Optimierung der Versuchsbedingungen lag darin, die unspezifische Adsorption der zu testenden Peptidliganden während des Bindungsassays so gering wie möglich zu halten, um eine reproduzierbare spezifische Bindung zu bekommen. In Voruntersuchungen mit [<sup>125</sup>I]Tyr<sup>0</sup>-Sauvagin wurden Wiederfindungsraten ermittelt (Daten nicht gezeigt) und verschiedene Kunststoff-Reaktionsgefäße sowie Pipettenspitzen getestet. Obwohl Fechner et al. (unpubliziert) bei Adsorptionsuntersuchungen in Zellkulturplatten eine Adsorption des Tracers [<sup>125</sup>I]Tyr<sup>0</sup>-oCRF an der Wellwand in wässriger Lösung sogar in Gegenwart von 1 % Triton-X100 zweifelsfrei nachwies, konnte durch

strikte Verwendung von Kunststoff-Materialien der Firmen EPPENDORF und BIOZYM in allen Bindungsassays trotz auftretender Adsorptionserscheinungen eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sichergestellt werden. Da in den Sättigungsbindungsstudien mit hohen Tracerkonzentrationen gearbeitet wurde, wurden zusätzlich und ausschließlich silikonierte Materialien verwendet. Außerdem gewährleistet das Wachstum der Zellen 72 h nach Transfektion einen sehr dichten Zellrasen, der vermutlich auch adsorptionsverhindernd wirkt.

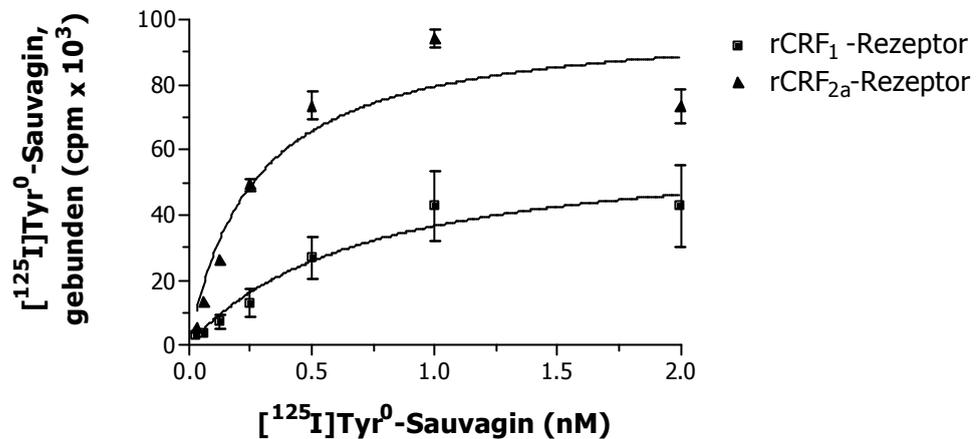
In Anlehnung an Untersuchungen von De Souza (1987), der verschiedene Parameter wie z. B. den pH-Wert, die Zeit, die Temperatur, die Zusammensetzung des Bindungspuffers sowie den Einfluß von Kationen auf die [ $^{125}\text{I}$ ]Tyr<sup>0</sup>-r/hCRF Bindung ermittelte, wurde der Bindungspuffer auf eine  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration von 10 mM eingestellt (Kap. 2.4.2). Während monovalente Kationen keinen Effekt auf die [ $^{125}\text{I}$ ]-rCRF Bindung zeigten, erhöhen divalente Kationen, insbesondere Magnesium-Ionen, die Bindungsaffinitäten (De Souza, 1987). Auch für andere Neuropeptidrezeptoren wurde gezeigt, daß divalente Kationen, insbesondere auch  $\text{Mg}^{2+}$  am NPY-Rezeptor, die Ligandbindung beeinflussen können (Wieland et al., 1998). Zusätzlich wurden die Proteaseinhibitoren Aprotinin, Bacitracin, Benzamidin, PMSF und STI im Bindungspuffer verwendet, um den enzymatischen Abbau der Peptide und des Rezeptors während des Bindungstests zu minimieren.

#### **4.2.3 Charakterisierung der Expression der CRF-Rezeptoren in Sättigungsbindungsstudien**

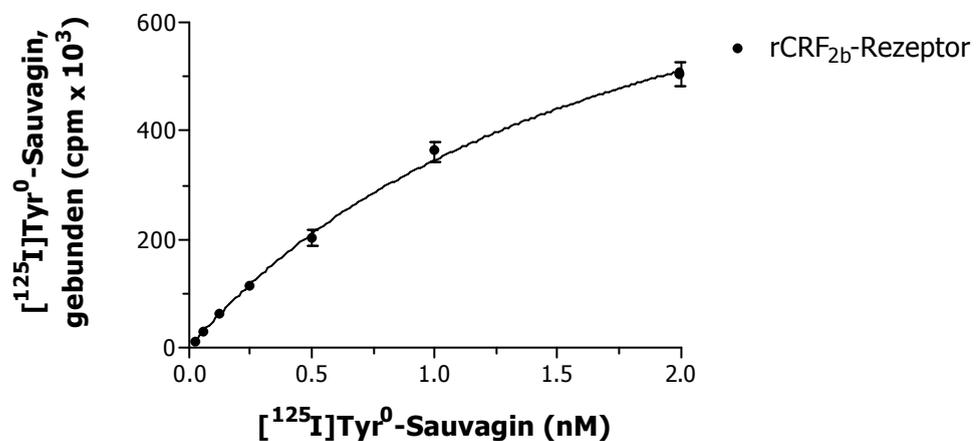
Transient exprimierte rCRF-Rezeptoren (rCRF<sub>1</sub>, rCRF<sub>2a</sub>, rCRF<sub>2b</sub>) wurden in Sättigungsbindungsuntersuchungen (Kap. 2.4.2.1) charakterisiert und die ermittelten Bindungskonstanten mit Bindungsdaten von endogenen CRF-Rezeptorsystemen verglichen.

Die Kurven zeigen eine spezifische, für den rCRF<sub>1</sub>- und rCRF<sub>2a</sub>-Rezeptor auch sättigbare Bindung als Funktion der Radioligandkonzentration (Abb. 4.2). Die Bindungsisothermen wurden unter Verwendung von [ $^{125}\text{I}$ ]Tyr<sup>0</sup>-Sauvagin nach einem 1-Seiten-Bindungsmodell über einen Konzentrationsbereich von  $3,13 \times 10^{-11}$  bis  $2,00 \times 10^{-9}$  M angepaßt. Aus den Kurvenverläufen konnten Dissoziationskonstanten (Tab. 4.2) berechnet werden, die im nanomolaren Bereich lagen, was für alle drei Rezeptoren auf hoch affine Bindungsstellen hinweist. Die Dissoziationskonstanten von  $0,56 \pm 0,21$  nM (rCRF<sub>1</sub>-Rezeptor),  $0,25 \pm 0,05$  nM (rCRF<sub>2a</sub>-Rezeptor) und  $0,87 \pm 0,17$  nM (rCRF<sub>2b</sub>-Rezeptor) (Mittelwert  $\pm$  SEM) zeigen, daß [ $^{125}\text{I}$ ]Tyr<sup>0</sup>-Sauvagin von allen drei heterolog exprimierten CRF-Rezeptoren mit gleich hoher Affinität gebunden wird.

(A)



(B)



**Abbildung 4.2:** Rezeptorbindung von [<sup>125</sup>I]Tyr<sup>0</sup>-Sauvagin an HEK 293-Zellen mit transient exprimierten rCRF<sub>1</sub>- und rCRF<sub>2a</sub>- (A) sowie rCRF<sub>2b</sub>-Rezeptoren (B). Jeder Wert ist der Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung von jeweils 3 individuellen Experimenten.

Im Vergleich zu endogenen CRF-Rezeptoren zeigt der in der Rattenhirnmembran erhaltene  $K_d$ -Wert von  $0,27 \pm 0,21$  nM eine ebenso hohe Affinität wie jene Affinität in den heterolog, transient exprimierten Rezeptorsystemen, während in der Mausherzmembran eine noch affinere Bindungsstelle von  $0,05 \pm 0,04$  nM ermittelt wurde (Tab. 4.2).

Die Rezeptorkapazität ist mit  $10 \pm 1$  fmol/mg<sub>Protein</sub> in der Mausherzmembran und mit  $23 \pm 2$  fmol /mg<sub>Protein</sub> in der Rattenhirnmembran niedrig. In den drei rekombinanten Rezeptorsystemen werden dagegen Expressionsniveaus von  $198 \pm 117$  fmol/mg<sub>Protein</sub> (rCRF<sub>1</sub>-Rezeptor),  $1107 \pm 492$  fmol/mg<sub>Protein</sub> (rCRF<sub>2a</sub>-Rezeptor) und  $3190 \pm 1170$  fmol/mg<sub>Protein</sub> (CRF<sub>2b</sub>-Rezeptor) erhalten.

**Tabelle 4.2: Gleichgewichts-Sättigungsdaten der [<sup>125</sup>I]Tyr<sup>0</sup>-Sauvagin Bindung an rekombinanten, transient exprimierten rCRF-Rezeptoren im Vergleich zu endogenen CRF-Rezeptorsystemen.** Die Bindungsdaten für Hirn und Herz stammen aus einem Radiorezeptor Assay (Rohde et al., 1996) an Membransuspensionen aus nativem Rattenhirn- und Mausherzgewebe. Alle Daten sind der Mittelwert ± SEM von 3 unabhängigen Experimenten.

Rezeptorsubtyp	Gewebe	K <sub>d</sub> (nM)	B <sub>max</sub> (fmol/mg <sub>protein</sub> )
rCRF <sub>1</sub>	Hirn	0,27 ± 0,21	23 ± 2
mCRF <sub>2</sub>	Herz	0,05 ± 0,04	10 ± 1
rCRF <sub>1</sub>	HEK 293-Zellen	0,56 ± 0,21	198 ± 117
rCRF <sub>2a</sub>	HEK 293-Zellen	0,25 ± 0,05	1107 ± 492
rCRF <sub>2b</sub>	HEK 293-Zellen	0,87 ± 0,17	3190 ± 1170

Obwohl die transienten Transfektionen der Zellen mit gleichem Transfektionsmittel und nach identischem Schema abliefen (Kap. 2.3.2), wird im Falle des rCRF<sub>2a</sub>-Rezeptors eine 6fach höhere und am rCRF<sub>2b</sub>-Rezeptor eine 16fach höhere Rezeptorkapazität als am rCRF<sub>1</sub>-Rezeptor erzielt (Tab. 4.2). Dies liegt vermutlich im Expressionsvektor begründet. Die DNA für den rCRF<sub>1</sub>-Rezeptor ist im pcDNA3-Vektor ligiert. Dagegen wurde bei der Klonierung der beiden rCRF<sub>2</sub>-Rezeptoren (Kap. 3.2) mit pcDNA3-Max (Hygro)<sup>+</sup> ein Expressionsvektor verwendet (Vgl. Kap. 2.2.1.2, Tab. 2.2), der die zusätzliche SP163-Enhancer-Sequenz zur Verstärkung der Translation<sup>2</sup> enthält. Die Anzahl an Rezeptoren pro Zelle betrug für den rCRF<sub>1</sub>-Rezeptorsubtyp 6 000 bis 20 000. Für die rCRF<sub>2</sub>-Rezeptoren wurden 40 000 bis 80 000 (rCRF<sub>2a</sub>-Rezeptor) und 600 000 Rezeptoren/Zelle (rCRF<sub>2b</sub>-Rezeptor) ermittelt. Ein ähnlicher Wert mit 500 000 Rezeptoren/Zelle wurde für transient exprimierte CRF-Rezeptoren in COS-7 Zellen erhalten (Vita et al., 1993).

Schlußfolgernd aus den Sättigungsbindungsdaten läßt sich die rCRF-Rezeptor-Expression wie folgt charakterisieren:

1. Der Radioligand wurde an jedem rCRF-Rezeptorsubtyp durch einen K<sub>d</sub>-Wert charakterisiert, wobei alle drei transient exprimierten rCRF-Rezeptoren hoch affine Bindungsstellen bei der Bindung von [<sup>125</sup>I]Tyr<sup>0</sup>-Sauvagin hatten. Alle drei ermittelten K<sub>d</sub>-Werte sind essentiell für die Auswertung des Bindungsverhaltens weiterer, unbekannter Peptide, wenn diese in Kompetitionsbindungsstudien mit [<sup>125</sup>I]Tyr<sup>0</sup>-Sauvagin getestet werden sollen.

<sup>2</sup> Dies wurde an HEK 293-Zellen von Frau Dr. R. Gauß am IBI 1 in Jülich getestet.

2. [ $^{125}\text{I}$ ]Tyr<sup>0</sup>-Sauvagin wird gleich affin von allen rCRF-Rezeptorsubtypen gebunden, weswegen das unmarkierte Sauvagin im weiteren als Referenzpeptid sowohl für alle Bindungsuntersuchungen als auch in den funktionellen Assays verwendet wird.
3. Die Rezeptorkapazitäten werden vermutlich von den verwendeten Expressionsvektoren beeinflusst: beide rCRF<sub>2</sub>-Rezeptoren zeigen höhere B<sub>max</sub>-Werte als der Wert des rCRF<sub>1</sub>-Rezeptors.
4. Der Vergleich zu endogenen Rezeptorsystemen zeigt, daß mit den heterolog und transient exprimierten CRF-Rezeptoren mindestens gleich affine Bindungszustände aber wesentlich höhere Rezeptorexpressionsniveaus in den HEK 293-Zellen erhalten werden.

#### 4.2.4 Charakterisierung der CRF-Rezeptoren in Wettbewerbsbindungsstudien

Ist die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante der Rezeptorbindung für einen Liganden bestimmt, kann die Dissoziationskonstante für andere Liganden an der gleichen Ligand-bindungsstelle durch Wettbewerbsuntersuchungen ermittelt werden.

CRF<sub>1</sub>- und CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren unterscheiden sich in ihrer Ligandspezifität. Zur CRF/Urocortin Peptidfamilie gehören u. a. oCRF, Sauvagin, Urotensin I, r/hCRF, Urocortin I und Urocortin II (Kap. 1.2). Diese Peptide eignen sich zur Charakterisierung von CRF-Rezeptoren aufgrund ihrer pharmakologischen Eigenschaften. Sie sind die nativen Liganden des CRF-CRF-Rezeptorsystems und weisen hoch affine<sup>3</sup> Bindungsstellen an den Rezeptoren auf. Da ausreichende Informationen aus Struktur-Wirkungs-Untersuchungen verfügbar sind, eignen sich diese Peptide sehr für die Etablierung von biochemischen Assays. Während Sauvagin, Urotensin I, r/hCRF und Urocortin I von beiden CRF-Rezeptorsubtypen gebunden wird, ist Urocortin II ein selektiver Peptidligand für CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren, und oCRF wird affiner vom CRF<sub>1</sub>-Rezeptor als vom CRF<sub>2</sub>-Rezeptor gebunden. Tab. 4.3 zeigt in einer Übersicht die Peptidliganden, die in den folgenden Bindungsuntersuchungen verwendet werden.

Transient exprimierte rCRF-Rezeptoren (rCRF<sub>1</sub>, rCRF<sub>2a</sub>, rCRF<sub>2b</sub>) wurden in Wettbewerbsbindungsuntersuchungen (Kap. 2.4.2.2) charakterisiert und die ermittelten Bindungskonstanten mit Bindungsdaten von endogenen CRF-Rezeptorsystemen verglichen.

---

<sup>3</sup> Mit hoch affiner Bindung ist eine Bindung im nanomolaren Bereich gemeint.

**Tabelle 4.3: Primärstruktur ausgewählter Liganden der CRF/Urocortin Peptidfamilie.**  
**X/Y:** potentielle Aminosäuren oder Domänen, die für eine CRF<sub>1</sub>-/CRF<sub>2</sub>-Rezeptorselektivität verantwortlich sein könnten.

Peptid	Sequenz
<b>Nichtselektive Liganden für CRF<sub>1</sub> - und CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren</b>	
Sauvagin	ZG <b>PP</b> ISID <b>LSLE</b> LLR <b>KMIEIEKQEKE</b> KQQAANN <b>RL</b> LLDTI-NH <sub>2</sub>
Urotensin I	NDD <b>PP</b> ISID <b>LTFH</b> LLRN <b>MIEMARNENQ</b> REQAGLN <b>RKYL</b> DEV-NH <sub>2</sub>
r/hCRF	<b>SE</b> <b>PP</b> ISLD <b>LTFH</b> LLRE <b>VLEMARAEQL</b> AQQAHS <b>NRKLM</b> EII-NH <sub>2</sub>
Urocortin I	DD <b>PP</b> LSID <b>LTFH</b> LLRT <b>LLELAR</b> T <b>QSQR</b> ERAE <b>QNRI</b> IFDSV-NH <sub>2</sub>
<b>Ligand mit geringer Selektivität für CRF<sub>1</sub>-Rezeptoren</b>	
oCRF	<b>SQ</b> <b>PP</b> ISLD <b>LTFH</b> LLRE <b>VLEM</b> TK <b>ADQL</b> AQQAHS <b>NRKLL</b> DIA-NH <sub>2</sub>
<b>Selektiver Ligand für CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren</b>	
Urocortin II	<b>VIL</b> SLD <b>VPIG</b> LLR <b>ILLEQ</b> AR <b>YKA</b> ARN <b>QAATNAQIL</b> AHV-NH <sub>2</sub>

Der rCRF<sub>2</sub>-Rezeptor bindet oCRF und r/hCRF mit signifikant niedrigerer Affinität als Urocortin I, Urocortin II, Sauvagin und Urotensin I (Tab. 4.4). Für den rCRF<sub>1</sub>-Rezeptor wurde dagegen keine Ligandenselektivität für oCRF, Sauvagin, Urotensin I, r/hCRF und Urocortin I erhalten, wie es auch in früheren Bindungsstudien am rCRF<sub>1</sub>-Rezeptor (Suman-Chauhan et al., 1999) und am hCRF<sub>1</sub>-Rezeptor (Rominger et al., 1998) beschrieben worden war. Die Bindungsaffinitäten der verwendeten Liganden der CRF/Urocortin Peptidfamilie unterscheiden sich demnach am rCRF<sub>1</sub>-Rezeptor nicht stark voneinander. Eine Ausnahme bildet Urocortin II, das vom CRF<sub>1</sub>-Rezeptor nicht, dagegen mit sehr hoher Affinität vom rCRF<sub>2a</sub>-Rezeptor und mit hoher Affinität vom CRF<sub>2b</sub>-Rezeptor gebunden wurde. Urocortin I und der selektive CRF<sub>2</sub>-Rezeptor-Ligand Urocortin II werden vom mCRF<sub>2b</sub>-Rezeptor gleich affin gebunden (Reyes et al., 2001), was hier am rCRF<sub>2b</sub>-Rezeptor bestätigt werden konnte (Vgl. K<sub>d</sub>-Werte).

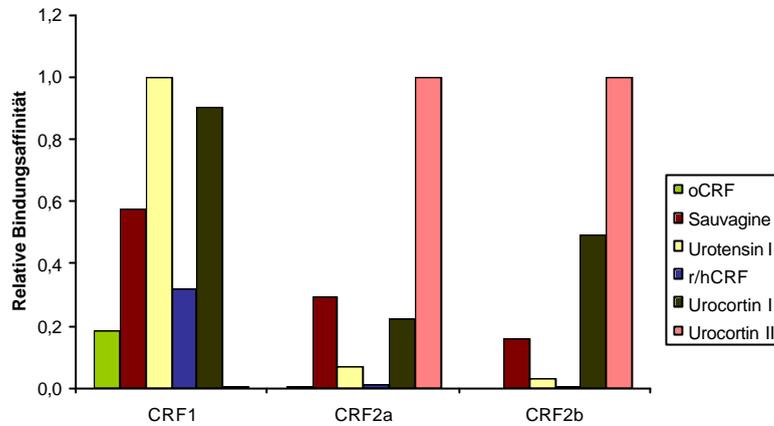
Die Ergebnisse zeigen weiterhin, daß die Bindungseigenschaften beider rCRF<sub>2</sub>-Rezeptoren nahezu identisch sind (Abb. 4.3 A). Das entspricht auch Untersuchungen an hCRF<sub>2a/2b</sub>-Rezeptor-Spleißvarianten (Ardati et al., 1999). Es wird ein eher pharmakologisch ähnliches Profil erwartet, da sich in der Primärstruktur der beiden Spleißvarianten nur ein kurzer Abschnitt, im Vergleich zur Gesamtrezeptorsequenz, der Aminosäuresequenz des N-Terminus unterscheidet.

**Tabelle 4.4: Bindungsaffinitäten von Liganden der CRF/Urocortin Peptidfamilie an HEK 293-Zellen mit transient exprimierten rCRF-Rezeptoren.** Die Daten geben den Mittelwert aus den  $pK_d$ -Werten  $\pm$  SEM mit (n) als die Anzahl unabhängiger Experimente und die daraus resultierenden Dissoziationskonstanten  $K_d$ , in Dreifachbestimmungen ermittelt, wieder.

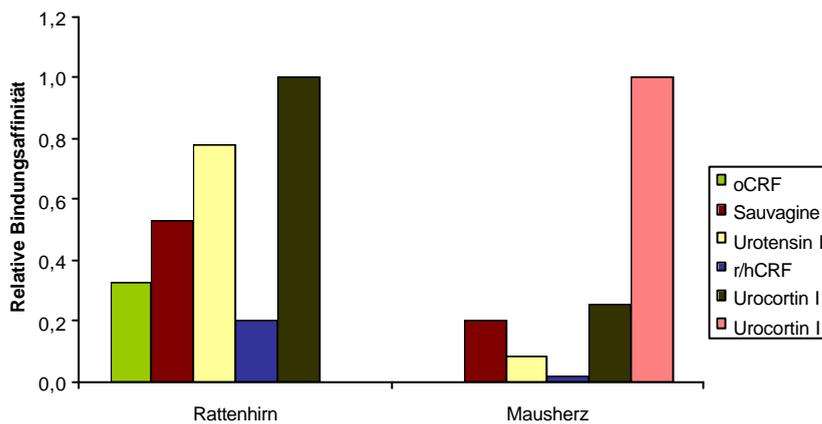
Peptid	rCRF <sub>1</sub> -Rezeptor	rCRF <sub>2a</sub> -Rezeptor	rCRF <sub>2b</sub> -Rezeptor
	$K_d$ (nM) $pK_d$	$K_d$ (nM) $pK_d$	$K_d$ (nM) $pK_d$
oCRF	9,40 7,92 $\pm$ 0,09 (4)	354 6,54 $\pm$ 0,19 (3)	> 1000 (3)
Sauvagin	3,01 8,54 $\pm$ 0,06 (7)	3,02 8,52 $\pm$ 0,03 (3)	13,4 7,90 $\pm$ 0,12 (3)
Urotensin I	1,74 8,78 $\pm$ 0,05 (6)	12,5 7,92 $\pm$ 0,07 (3)	67,9 7,20 $\pm$ 0,12 (3)
r/hCRF	5,47 8,33 $\pm$ 0,13 (5)	63,1 7,21 $\pm$ 0,06 (3)	552 6,30 $\pm$ 0,14 (3)
Urocortin I	1,93 8,72 $\pm$ 0,04 (6)	3,96 8,41 $\pm$ 0,06 (3)	4,26 8,41 $\pm$ 0,13 (3)
Urocortin II	> 1000 (3)	0,88 9,06 $\pm$ 0,03 (3)	2,10 8,76 $\pm$ 0,22 (3)

Die Abstufung der relativen Bindungsaffinitäten der Peptidliganden an HEK 293-Zellen, die den rCRF<sub>1</sub>-Rezeptor transient exprimieren, verhält sich ähnlich zu der Abstufung, die in der Rattenhirnmembran erhalten wurde (Abb. 4.3). Urotensin I und Urocortin I werden sowohl vom rekombinanten rCRF<sub>1</sub>-Rezeptor als auch von Rezeptoren des Rattenhirns am affinsten gebunden. Die Reihenfolge der relativen Bindungsaffinitäten für die CRF-analogen Peptide am rekombinanten rCRF<sub>2b</sub>-Rezeptor verhält sich wie diejenige im nativen Herzgewebe (Abb. 4.3). Das bekräftigt die Tatsache, daß CRF<sub>2b</sub>-Rezeptoren neben dem Skelettmuskel hauptsächlich im Herz der Maus exprimiert sind (Kishimoto et al., 1995). Urocortin II wird hoch affin sowohl von den rCRF<sub>2b</sub>-exprimierenden HEK 293-Zellen als auch von Mauserzmembranen gebunden. Sauvagin bindet 41fach affiner als r/hCRF am rekombinanten rCRF<sub>2b</sub>-Rezeptor in Übereinstimmung mit Bindungsdaten in der Literatur (Stenzel et al., 1995). Dagegen ist die Bindung von Sauvagin im Vergleich zu r/hCRF im Radiorezeptor Assay in Mauserzmembranen nur um den Faktor 9 stärker. Kleine Differenzen in der Affinität einzelner Liganden können Unterschiede in den Rezeptoren zwischen den einzelnen Spezies widerspiegeln (Gottowik et al., 1997).

(A)



(B)



**Abbildung 4.3:** Relative Bindungsaffinitäten von Liganden der CRF/Urocortin Peptidfamilie aus Wettbewerbsstudien mit [ $^{125}$ I]Tyr<sup>0</sup>-Sauvagine an HEK 293-Zellen mit transient exprimierten rCRF-Rezeptoren (A) im Vergleich zu endogenen CRF-Rezeptorsystemen (B). Die Daten für Rattenhirn und Mausherz stammen aus einem Radiorezeptor Assay (Rohde et al., 1996) an Membransuspensionen aus nativem Gewebe. Jeder Wert wurde innerhalb jedes Bindungsassays normiert und die Affinität(1/Kd) des affinsten Peptids 1 gesetzt.

#### 4.2.5 Vergleich: Bindungsassays an heterolog exprimierten CRF-Rezeptoren und an endogenen CRF-Rezeptormembranen

Das Bindungsverhalten von Liganden an Rezeptorsystemen lässt sich durch Bindungsassays an intakten Zellen, die heterolog die rCRF-Rezeptoren exprimieren, sowie durch Bindungsassays an Membransuspensionen, die aus nativen Geweben präpariert sind, bestimmen. In Kap. 4.2.3 und 4.2.4 wurden die ermittelten Bindungsdaten von heterolog exprimierten rCRF-Rezeptoren mit denen von endogenen CRF-Rezeptorsystemen ver-

glichen. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Ergebnisse vom transient exprimierten rCRF<sub>1</sub>-Rezeptor in guter Übereinstimmung zu den Bindungsdaten waren, die in Rattenhirnmembranen vor allem Bindungsstellen an CRF<sub>1</sub>-Rezeptoren repräsentieren. Ebenso zeigte das transient exprimierte rCRF<sub>2b</sub>-Rezeptorsystem ein übereinstimmendes Bindungsverhalten anhand der ausgewählten Peptide zu den CRF<sub>2b</sub>-Rezeptoren in Mausherzmembranen. Somit spiegeln die transient exprimierten rCRF-Rezeptorsysteme die nativen Systeme sehr gut wider. Vor- und Nachteile beider Methoden zur Charakterisierung der Ligand-Rezeptor-Bindung sollen hier gegenübergestellt werden.

Im Bindungsassay an intakten, heterolog exprimierenden Zellen befindet sich der zu untersuchende Rezeptor in der Zelle in seiner nativen Umgebung. Dabei ist der intrazelluläre Teil des Rezeptors in seiner normalen cytosolischen Umgebung mit anderen Komponenten wie z. B. Nukleotiden und Modulatoren eingebunden. Im Falle des Plasmamembranrezeptors wird die Membran während einer Präparation nicht zerstört und jeder pH-Gradient oder andere Ionen, die normalerweise in der Membran existieren, verhalten sich intakt im Verlaufe des Assays (Bylund und Toews, 1993). Bindungsuntersuchungen an intakten Zellen erlauben somit vorteilhaft eher Studien unter physiologischen Bedingungen.

Ein Nachteil des intakten Zellassays könnte in der Höhe der nichtspezifischen Bindung liegen. Diese steigt an, wenn Radioliganden in die Zelle transportiert werden. Da dieser Effekt nur bei intakten Zellen auftreten kann, ist er bei Verwendung von Membransuspensionen im Competitionstest nicht von Interesse. Da die in dieser Arbeit gemessene nichtspezifische Bindung mit [<sup>125</sup>I]Tyr<sup>0</sup>-Savagin an intakten Zellen sehr gering war, kann jedoch dieser Effekt nahezu ausgeschlossen werden. Somit spielt die Zellpenetration des Radioliganden und die damit verbundene Vergrößerung der nichtspezifischen Bindung keine Rolle.

Während heterolog exprimierte Zellsysteme die Testung an separaten Rezeptorsubtypen erlaubt, liegt in Membransuspensionen von nativen Geweben keine klare Abgrenzung der Rezeptorsubtypen vor. Natürlich ist der CRF<sub>1</sub>-Rezeptor im Rattenhirn dominierend, denn eine dichte Verteilung von CRF<sub>1</sub> mRNA (Chalmers et al., 1995) und damit auch an CRF-Bindungsstellen (Chen et al., 1986) wurde vorrangig im End- und Mittelhirn nachgewiesen. Dahingegen existieren auch Gehirnareale, wie z. B. der Hypothalamus und das Lateral septum, in denen hohe bis sehr hohe Expressionsniveaus von CRF<sub>2a</sub>-Rezeptoren bestimmt wurden (Chalmers et al., 1995).

Der Vorteil des Membranbindungsassays besteht jedoch in seiner viel größeren Flexibilität bezüglich der Versuchsdurchführung. Präparierte Membranen werden bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert und jederzeit im Experiment einsetzbar. Ferner wird durch Bindungsassays an Membransuspensionen ein höherer Probendurchsatz als beim Bindungstest in Zellkulturplatten (24-Well-Format) realisiert.

### 4.3 Funktionelle Assays zur Charakterisierung der heterolog exprimierten CRF-Rezeptoren

#### 4.3.1 Pharmakologische Charakterisierung der CRF-Rezeptoren im Adenylatcyclase Assay

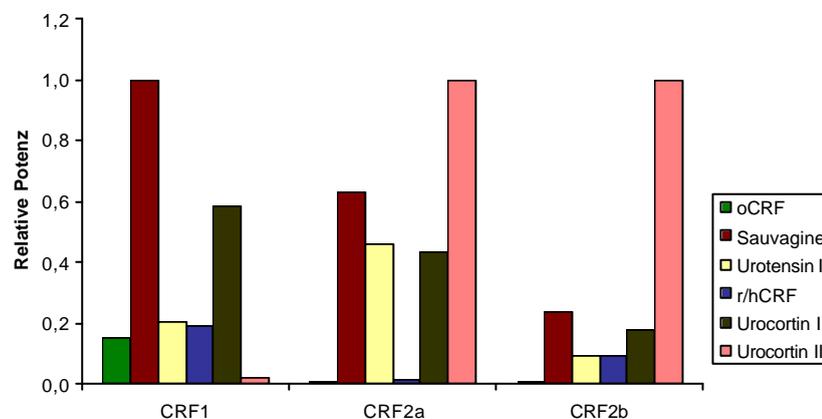
Zur Bestimmung der Adenylatcyclase-Aktivität diente der sensitive Adenylatcyclase Assay (Salomon et al., 1974), bei dem *in vitro* die Produktion von radioaktiv markiertem cAMP aus dem Substrat  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  bestimmt wird. HEK 293-Zellmembranen (Kap. 2.3.4) mit transient exprimierten rCRF-Rezeptoren wurden mit den CRF-Analoga oCRF, Sauvagin, Urotensin I, r/hCRF, Urocortin I und Urocortin II inkubiert und mittels sequenzieller Säulenchromatographie des gebildeten cAMPs die Adenylatcyclase-Aktivität bestimmt (Kap. 2.4.3.2).

**Tabelle 4.5: Potenzen von Liganden der CRF/Urocortin Peptidfamilie für die Stimulierung der Adenylatcyclase-Aktivität an HEK 293-Zellmembranen mit transient exprimierten rCRF-Rezeptoren.** Die Daten geben den Mittelwert aus den  $\text{pEC}_{50}$ -Werten  $\pm$  SEM mit (n) als die Anzahl unabhängiger Experimente und die daraus resultierenden  $\text{EC}_{50}$ -Werte, in Zweifachbestimmungen ermittelt, wieder.

Peptid	rCRF <sub>1</sub> -Rezeptor	rCRF <sub>2a</sub> -Rezeptor	rCRF <sub>2b</sub> -Rezeptor
	EC <sub>50</sub> (nM) pEC <sub>50</sub>	EC <sub>50</sub> (nM) pEC <sub>50</sub>	EC <sub>50</sub> (nM) pEC <sub>50</sub>
oCRF	56,0 7,59 $\pm$ 0,49 (3)	538 6,27 $\pm$ 0,02 (3)	707 6,15 $\pm$ 0,01 (3)
Sauvagin	8,70 8,26 $\pm$ 0,15 (9)	5,71 8,29 $\pm$ 0,17 (3)	16,2 7,85 $\pm$ 0,20 (3)
Urotensin I	42,19 7,44 $\pm$ 0,16 (3)	7,86 8,10 $\pm$ 0,01 (3)	39,6 7,70 $\pm$ 0,46 (3)
r/hCRF	45,76 7,49 $\pm$ 0,30 (3)	241 6,62 $\pm$ 0,01 (3)	42,3 7,37 $\pm$ 0,01 (3)
Urocortin I	14,81 7,89 $\pm$ 0,16 (3)	8,25 8,11 $\pm$ 0,12 (3)	21,7 7,77 $\pm$ 0,26 (3)
Urocortin II	278 7,01 $\pm$ 0,62 (3)	3,61 8,49 $\pm$ 0,17 (3)	3,84 8,99 $\pm$ 0,71 (3)

Im funktionellen Adenylatcyclase Assay konnte bestätigt werden (Tab. 4.5), daß oCRF und r/hCRF im Vergleich zu den anderen Peptidliganden eine signifikant niedrigere Potenz gegenüber den rCRF<sub>2</sub>-Rezeptoren zeigen, was auch mit einer geringeren Bindungsaffinität im Kompetitionsassay einherging (Kap. 4.2.4). Urotensin I und Urocortin I verhalten sich äquipotent in Zellen, die den rCRF<sub>2a</sub>-Rezeptor transient exprimieren. Im Gegensatz dazu wird Urocortin I mit einem K<sub>d</sub>-Wert von 3,96 nM 3fach affiner vom rCRF<sub>2a</sub>-Rezeptor als Urotensin I gebunden (12,5 nM, Tab. 4.4).

Eine weitere Diskrepanz besteht im Verhalten von Sauvagin und Urocortin I am rCRF<sub>2</sub>-Rezeptor. Während Sauvagin im Adenylatcyclase Assay geringfügig potenter als Urocortin I ist (Tab. 4.5), wurde im Bindungsversuch eine 3fach stärkere Bindung vom rCRF<sub>2b</sub>-Rezeptor an Urocortin I (K<sub>d</sub> = 4,26 nM) als an Sauvagin (K<sub>d</sub> = 13,4 nM) erhalten. Dieses Bindungsverhalten wird auch durch pharmakologische Studien gestützt (Vaughan et al., 1995), in denen sich Urocortin I 3fach potenter und 5fach affiner am CRF<sub>2b</sub>-Rezeptor verhält als Sauvagin. Desweiteren ist Urocortin I im Vergleich zu r/hCRF deutlich potenter am rCRF<sub>2a</sub>-Rezeptor als am rCRF<sub>2b</sub>-Rezeptorsubtyp (Vgl. Tab. 3.4).



**Abbildung 4.4:** Relative Potenzen von Liganden der CRF/Urocortin Peptidfamilie für die Stimulierung der Adenylatcyclase-Aktivität an HEK 293 Zellmembranen mit transient exprimierten rCRF-Rezeptoren. Jeder Wert wurde innerhalb jedes Assays normiert und die Potenz (1/EC<sub>50</sub>) des potentesten Peptids 1 gesetzt.

Abb. 4.4 demonstriert die Rangfolge der relativen Potenzen für die untersuchten Liganden an allen drei CRF-Rezeptoren:

- ⇒ rCRF<sub>1</sub>-Rezeptor: Sauvagin > Urocortin I > Urotensin I > r/hCRF > oCRF >> Urocortin II
- ⇒ rCRF<sub>2a</sub>-Rezeptor: Urocortin II > Sauvagin > Urotensin I ~ Urocortin I > r/hCRF > oCRF
- ⇒ rCRF<sub>2b</sub>-Rezeptor: Urocortin II > Sauvagin > Urocortin I ~ Urotensin I > r/hCRF > oCRF.

Für die rCRF<sub>2</sub>-Rezeptor-Spleißvarianten wurde ein nahezu identisches Profil erhalten (Abb. 4.4). Wie erwartet aktiviert Urocortin II selektiv die Adenylatcyclase der Zellen, die den rCRF<sub>2</sub>-Rezeptor exprimieren, während am rCRF<sub>1</sub>-Rezeptor keine Adenylatcyclase-Aktivität stimuliert werden konnte. Für das pharmakologische Profil des rCRF<sub>1</sub>-Rezeptors wurde im Adenylatcyclase Assay bis auf eine Ausnahme das gleiche Profil wie im Kompetitionsbindungstest (Abb. 4.3 A) erhalten. Lediglich Sauvagin und Urotensin I verhalten sich abweichend. Während Sauvagin die höchste und im Vergleich zu Urotensin I eine 5fach höhere Potenz der Adenylatcyclase-Aktivität zeigte (Tab. 4.5), war im Bindungsassay Urotensin I 1,7fach affiner als Sauvagin (vgl. Tab. 4.4,  $K_d, \text{Sauvagin} = 3,01 \text{ nM}$ ,  $K_d, \text{Urotensin I} = 1,74 \text{ nM}$ ).

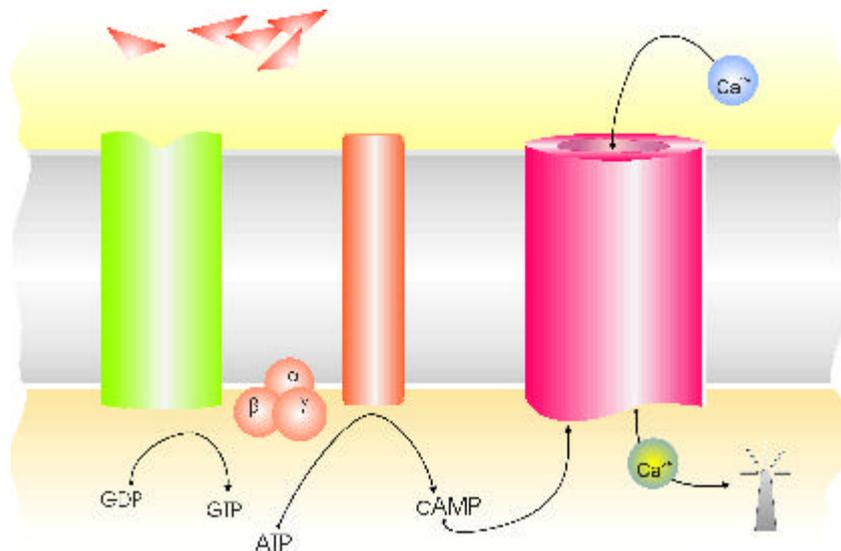
### **4.3.2 Pharmakologische Charakterisierung der CRF-Rezeptoren im HTS-Bioassay**

Intrazelluläres Ca<sup>2+</sup> ist ein auf einer breiten Basis fungierender Second Messenger (Kap. 1.7) und somit geeigneter Meßparameter für ein funktionelles Screening an GPCR unterschiedlicher G-Protein-Kopplung. In der Praxis gibt es HTS-Systeme (Kap. 1.8), mit Hilfe derer eine moderne Wirkstoffsuche möglich ist. So wird ein sensitiver Screening-Assay beschrieben, der in der Lage ist, intrazelluläres Calcium sämtlicher G-Proteingekoppelter Rezeptoren (G<sub>q</sub>, G<sub>s</sub>, G<sub>i</sub>, G<sub>q,11</sub>) mittels FLIPR zu detektieren (Kassack et al., 2002). Weitere Applikationen zur Untersuchung von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen, insbesondere an GPCR, im HTS-Maßstab finden Anwendung, wobei promiskuitive und chimäre G-Proteine (Chambers et al., 2003; Coward et al., 1999; New und Wong, 2004) ausgenutzt oder Calcium-permeable Ionenkanäle (Grant et al., 2001) über FLIPR getestet werden.

Mit dem Fluoreszenz-Mikroplatten-Lesegerät (FLIPR) steht ein wichtiges Screening-Werkzeug für auf Zellen basierte Fluoreszenz-Assays zur Verfügung. Mindestens 96 unabhängige Zellpopulationen sind parallel meßbar, und der Probendurchsatz ist auf ein Zellkulturplatten-Format von 384-Wells (Hodder et al., 2003) sowie durch Verringerung des Assayvolumens sogar auf ein 1536-Well-Format (Hodder et al., 2004) ausbaubar. Transiente Signale, wie z. B. die Freisetzung von intrazellulärem Calcium, aus Zellpopulationen können parallel und in Echtzeit quantifiziert werden (Sullivan et al., 1999).

Mit der Entwicklung einer miniaturisierten, auf Fluoreszenz-basierten Methode (Kap. 2.4.3.1) ist es möglich geworden, ein Screening für neue Wirkstoffe an GPCR durchzuführen. Dieser funktionelle Bioassay erlaubt die Messung der Ligand-induzierten Änderung

von intrazellulärem Calcium an intakten, heterolog exprimierenden Säugetierzellen. Im Verlauf dieser Arbeit wurde dieses Screening-Verfahren anhand der CRF-Rezeptoren optimiert und validiert. Grundlage dieses Assays sind stabile HEK 293-Zelllinien mit heterolog exprimiertem  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Ionenkanal (Kap. 2.1.2) und jeweils koexprimiertem CRF-Rezeptor (Tab. 2.3, Abb. 4.5).

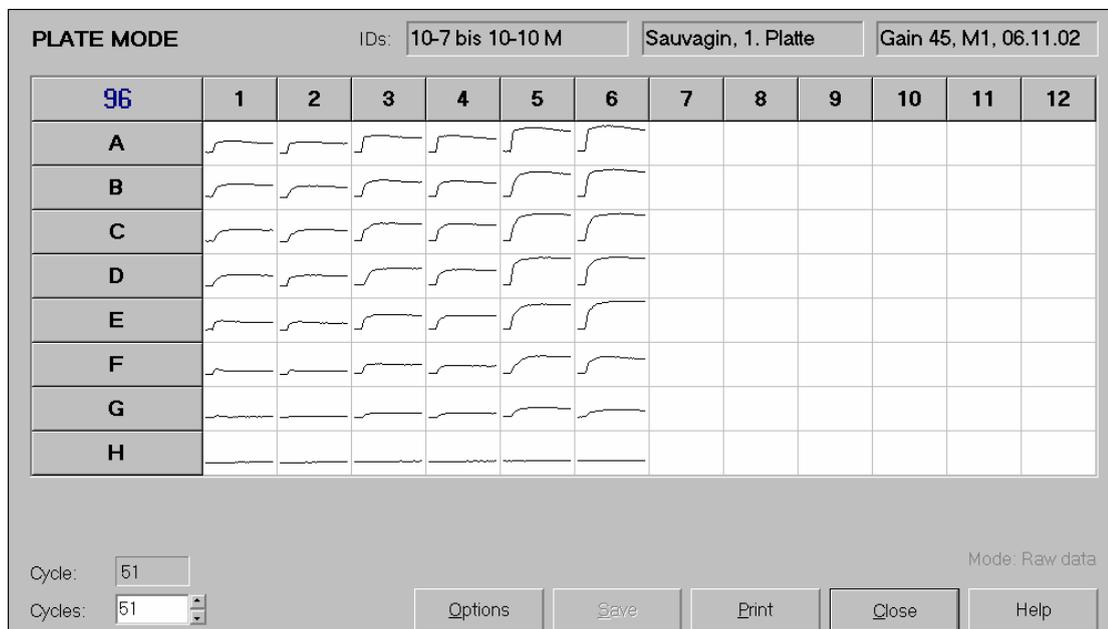


**Abbildung 4.5:** Ligand-Rezeptor-Aktivierung in HEK 293-Zellen, die neben einen  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Ionenkanal jeweils den  $\text{rCRF}_1$ -,  $\text{rCRF}_{2a}$ - und  $\text{rCRF}_{2b}$ -Rezeptor stabil koexprimieren.

Der biologische Hintergrund dieser Meßmethode besteht in der Messung der Rezeptoraktivierung über die Bestimmung von intrazellulärem Calcium: wird ein CRF-Rezeptor (grüne Säule) mit einem spezifischen Liganden (rote Dreiecke) stimuliert, dann wird der Ligand von einem Rezeptormolekül an der Oberfläche der Zellen gebunden (Abb. 4.5). Nach Rezeptorbindung des Liganden lagert sich der G-Protein-Komplex an die cytoplasmatische Seite des Rezeptors an. Die  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins entläßt das von ihr gebundene GDP, an dessen Stelle schnell GTP tritt. Die Bindung von GTP löst eine Konformationsänderung der  $\alpha$ -Untereinheit aus, woraufhin diese von  $\beta\gamma$  dissoziiert und die systemspezifische Adenylatcyclase (orange-farbende Säule) aktiviert. Das durch die Adenylatcyclase produzierte cAMP steuert direkt den Ionenkanal (dunkelrote Säule). In der weiteren intrazellulären Signalkaskade wird cAMP frei und bindet an den cNMP-Bindungsstellen auf der cytoplasmatischen Seite des Kanals, und der Ionenkanal öffnet sich. Die Calcium-Ionen aus dem extrazellulären Medium strömen durch die geöffneten Kanäle in die HEK 293-Zellen. Die daraus resultierende  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsänderung wird durch Anwesenheit eines  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fluorophors angezeigt.

Für die pharmakologische Charakterisierung der heterolog exprimierten CRF-Rezeptoren wurden unter Verwendung der oben beschriebenen Zelllinien die CRF-Analoga oCRF, Sauvagin, Urotensin I, r/hCRF, Urocortin I und Urocortin II getestet (Kap. 2.4.3.1).

Während der Optimierung des Assays wurde im 2-Kanal-Injektor sowohl im Vorratsgefäß (Glas) als auch im Schlauchsystem (Kunststoff) eine unspezifische Adsorption der CRF-analogen Peptide beobachtet. Um reproduzierbare Signale zu erhalten, wurde deshalb auf die Verwendung des 2-Kanal-Injektors im Fluorometer FLUOstar/POLARstar „Galaxy“ verzichtet, und die Peptidliganden wurden in allen folgenden Struktur-Wirkungs-Untersuchungen mit einer Mehrkanalpipette auf die Zellen pipettiert.



**Abbildung 4.6:** Kinetik des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms unter Einwirkung von Sauvagin auf HEK 293-Zellen mit stabil koexprimierten rCRF-Rezeptoren und  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Ionenkanal. Spalte 1, 2: rCRF<sub>1</sub>-Rezeptor, Spalte 3, 4: rCRF<sub>2a</sub>-Rezeptor, Spalte 5,6: rCRF<sub>2b</sub>-Rezeptor; Reihe A-G: Sauvagin von  $10^{-7}$  bis  $10^{-10}$  M; Reihe H: Assaypuffer ohne Peptid.

Abb. 4.6 zeigt exemplarisch am Beispiel des Referenzpeptids Sauvagin den ligand-abhängigen Einstrom der Calcium-Ionen und die daraus resultierende Fluoreszenz-Intensitätsänderung in Zellen mit den rCRF-Rezeptoren. Für Sauvagin wurden stabile Fluoreszenz-Signale in einer Zweifachbestimmung für jeden rCRF-Rezeptor erhalten. Sauvagin ist in diesem funktionellen Assay hoch potent an allen rCRF-Rezeptoren mit  $\text{EC}_{50}$ -Werten von 0,07 bis 0,26 nM.

Die Injektion des Assaypuffers ohne Peptid induzierte bei allen getesteten Peptiden kein Fluoreszenz-Signal (Vgl. für Sauvagin Abb. 4.6 Reihe H). Daraus kann geschlußfolgert werden, daß in diesem System keine Artefakte auftraten.

Die  $EC_{50}$ -Werte bestätigen die pharmakologischen Eigenschaften der untersuchten Rezeptoren (Tab. 4.6): mit Ausnahme von Urocortin II sind alle Peptidliganden hoch potent am  $rCRF_1$ -Rezeptor. Am  $rCRF_{2a}$ -Rezeptor zeigt sich die geringe Selektivität des oCRF, indem dieser Ligand 51fach potenter am  $rCRF_1$ -Rezeptorsubtyp agierte im Vergleich zum  $rCRF_{2a}$ -Rezeptor (siehe Kap. 4.2.4). Alle anderen Peptide waren hoch potent bzw. potent am  $rCRF_{2a}$ -Rezeptor. Dagegen war Sauvagin das potenteste Peptid bei der Aktivierung des  $rCRF_{2b}$ -Rezeptors im Vergleich zu den anderen potenten Liganden. Für oCRF konnte eine 31fach höhere Potenz am  $rCRF_1$ -Rezeptor ermittelt werden.

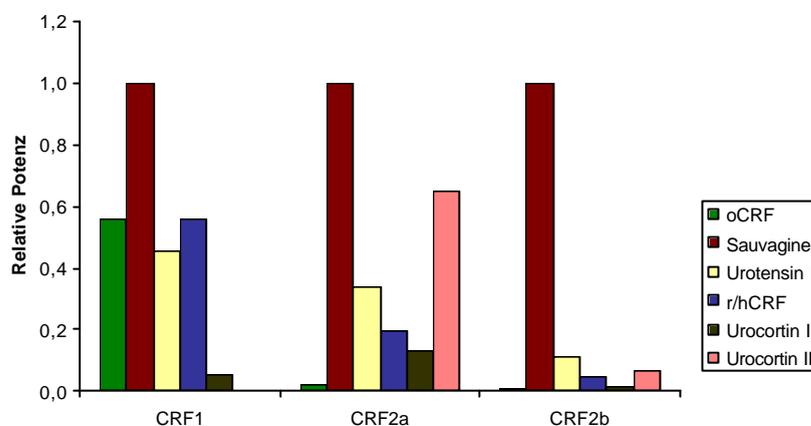
**Tabelle 4.6: Potenzen von Liganden der CRF/Urocortin Peptidfamilie für die Stimulierung der  $Ca^{2+}$ -induzierten Fluoreszenz an HEK 293-Zellen mit stabil koexprimierten  $rCRF$ -Rezeptoren und  $Ca^{2+}$ -sensitiven Ionenkanal.** Die Daten geben den Mittelwert aus den  $pEC_{50}$ -Werten  $\pm$  SEM mit (n) als die Anzahl unabhängiger Experimente und die daraus resultierenden  $EC_{50}$ -Werte, in Zweifachbestimmungen ermittelt, wieder.

Peptid	$rCRF_1$ -Rezeptor	$rCRF_{2a}$ -Rezeptor	$rCRF_{2b}$ -Rezeptor
	$EC_{50}$ (nM)	$EC_{50}$ (nM)	$EC_{50}$ (nM)
	$pEC_{50}$	$pEC_{50}$	$pEC_{50}$
oCRF	0,27 $9,56 \pm 0,01$ (3)	13,8 $7,87 \pm 0,07$ (3)	8,39 $8,08 \pm 0,01$ (2)
Sauvagin	0,15 $9,84 \pm 0,05$ (5)	0,26 $9,74 \pm 0,19$ (5)	0,07 $10,3 \pm 0,19$ (4)
Urotensin I	0,33 $9,54 \pm 0,23$ (2)	0,77 $9,20 \pm 0,27$ (2)	0,64 $9,30 \pm 0,32$ (2)
r/hCRF	0,27 $9,60 \pm 0,15$ (2)	1,32 $8,89 \pm 0,08$ (2)	1,53 $9,18 \pm 0,64$ (2)
Urocortin I	2,87 $8,61 \pm 0,18$ (3)	1,99 $8,70 \pm 0,01$ (2)	4,93 $8,31 \pm 0,01$ (2)
Urocortin II	331 $6,53 \pm 0,14$ (4)	0,40 $9,40 \pm 0,01$ (2)	1,07 $9,08 \pm 0,33$ (2)

Die  $rCRF$ -Rezeptoren werden durch folgende pharmakologischen Profile charakterisiert (Abb. 4.7):

- ⇒  $rCRF_1$ -Rezeptor: Sauvagin > oCRF  $\approx$  r/hCRF > Urotensin I > Urocortin I >> Urocortin II
- ⇒  $rCRF_{2a}$ -Rezeptor: Sauvagin > Urocortin II > Urotensin I > r/hCRF > Urocortin I > oCRF
- ⇒  $rCRF_{2b}$ -Rezeptor: Sauvagin > Urocortin II > Urotensin I > r/hCRF > Urocortin I > oCRF.

Die Abstufung am rCRF<sub>1</sub>-Rezeptor unterscheidet sich von dem im Adenylatcyclase Assay erhaltenen Profil (Abb. 4.4, Sauvagine > Urocortin I > Urotensin I > r/hCRF > oCRF >> Urocortin II). Sowohl oCRF als auch r/hCRF agieren im HTS-Bioassay potenter, während Urocortin I im Adenylatcyclase Assay potenter war. Für beide rCRF<sub>2</sub>-Rezeptor-Spleißvarianten ergibt sich ein identisches Verhältnis der relativen Potenzen zueinander (Abb. 4.7). Während Urocortin I (Tab. 4.6) äquipotent an allen drei Rezeptoren war, konnte für Urocortin II ein selektives Verhalten bei der Rezeptoraktivierung beider rCRF<sub>2</sub>-Rezeptoren gefunden werden.



**Abbildung 4.7:** Relative Potenzen von Liganden der CRF/Urocortin Peptidfamilie für die Stimulierung der Ca<sup>2+</sup>-induzierten Fluoreszenz an HEK 293-Zellen mit stabil koexprimierten rCRF-Rezeptoren und Ca<sup>2+</sup>-sensitiven Ionenkanal. Jeder Wert wurde innerhalb jedes Assays normiert und die Potenz (1/EC<sub>50</sub>) des potentesten Peptids 1 gesetzt.

Im Gegensatz zum Adenylatcyclase Assay (Abb. 4.4, Urocortin II > Sauvagine > Urocortin I ~ Urotensin I > r/hCRF > oCRF) ist Sauvagine in diesem funktionellen Assay das potenteste Peptid am rCRF<sub>2b</sub>-Rezeptor. Dagegen war Urocortin I am rCRF<sub>2</sub>-Rezeptorsubtyp im Adenylatcyclase Assay wie auch am rCRF<sub>1</sub>-Rezeptor wesentlich potenter als r/hCRF und oCRF, während im HTS-Bioassay Urocortin I EC<sub>50</sub>-Werte im Bereich der Werte von r/hCRF und oCRF erzielte.

#### 4.4 Schlußfolgerungen – Methodenvergleich

In den beiden vorangegangenen Abschnitten (Kap. 4.2, 4.3) wurde gezeigt, daß mit der Etablierung dieser biochemischen Assays (Tab. 4.7) die rCRF-Rezeptorsubtypen, rCRF<sub>1</sub> und rCRF<sub>2</sub>, pharmakologisch charakterisiert werden konnten. Dabei wurden in beiden funktionellen Assays differenzierte pharmakologische Daten über die rCRF-Rezeptoren entsprechend der jeweils verwendeten Methode ermittelt. Durch die Rezeptorbindungs-

studien wurde das Bindungsverhalten der bekannten Liganden der CRF/Urocortin Peptidfamilie an beiden rCRF-Rezeptoren und seinen Spleißvarianten charakterisiert. Alle drei rekombinanten Monorezeptorsysteme in HEK 293-Zellen lieferten nanomolare Affinitäten vergleichbar mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen (Grigoriadis et al., 1996; Lewis et al., 2001; Reyes et al., 2001; Rominger et al., 1998; Vaughan et al., 1995). Die Bindungseigenschaften der untersuchten Peptidliganden an den heterolog exprimierten rCRF<sub>1</sub>- und rCRF<sub>2b</sub>-Rezeptoren korrelierte mit den relativen Bindungsaffinitäten, die in Rattenhirn- (rCRF<sub>1</sub>-Rezeptoren) und Mausherzmembranen (rCRF<sub>2b</sub>-Rezeptoren) bestimmt worden waren (Fechner et al., unpubliziert) (Abb. 4.3). Somit spiegeln die zellulären, heterolog exprimierten rCRF-Rezeptorsysteme die nativen Systeme sehr gut wider.

Für Screeningversuche an Rezeptoren ist es unabdingbar, einfache Testsysteme zu verwenden, an denen Liganden getestet werden können. Unter diesem Fokus war es ausreichend, in Bindungsstudien über ein 1-Seiten-Bindungsmodell nur eine Bindungsstelle am Rezeptor zu erfassen. Deshalb wurden für Bindungsstudien transient exprimierte CRF-Rezeptorsysteme verwendet. Aufgrund ihrer viel niedrigeren Rezeptorkapazität im Vergleich zu stabil exprimierten Rezeptoren werden demzufolge in Kompetitionsstudien makroskopische Bindungskonstanten erhalten, die aus den verschiedenen affinen Rezeptorzuständen resultieren und nicht notwendigerweise zu den EC<sub>50</sub>-Werten korrelieren müssen. Das 1-Seiten-Bindungsmodell ist jedoch für die in dieser Arbeit zugrunde liegende Fragestellung akzeptabel, da die Reihenfolge der Affinitäten der untersuchten Peptide und ihre Abstufung zueinander nicht verloren geht.

Da die Dissoziationskonstanten  $K_d$  und die ermittelten EC<sub>50</sub>-Werte aus den funktionellen Assays nicht als Absolutwerte miteinander vergleichbar sind, werden relative Affinitäten und Potenzen betrachtet (Vgl. Abb. 4.3, 4.4, 4.7). Die relativen Bindungsaffinitäten aus den zellulären Bindungsassays entsprechen nicht den relativen Potenzen aus beiden funktionellen Assays. In Abhängigkeit von der Rezeptorkapazität wird jeder einzelne Prozeß in der Signaltransduktionskette durch eine Serie verschiedener kinetischer Parameter beschrieben (Clark et al., 1999), weswegen im Ergebnis der  $K_d$ -Wert eines Peptids nicht identisch dem EC<sub>50</sub>-Wert desselben Peptids sein kann. Es wäre eine Ausnahme, wenn der  $K_d$ -Wert aus der Bindung gleich dem EC<sub>50</sub>-Wert aus der Bestimmung der Rezeptorfunktionalität ist. Analog der theoretischen Beschreibung nach Clark et al. (1999) erfolgt keine 1:1-Umsetzung der Signale, was auch für die hier untersuchten Prozesse (Ligand-Rezeptor-Bindung, cAMP-Akkumulation infolge Adenylatcyclase-

Aktivierung, Ligand-induzierte Freisetzung von intrazellulärem Calcium) zu erwarten ist. Insbesondere die biphasische Glockenkurve, die im Adenylatcyclase Assay erhalten wurde (Kap. 3.3.2, Abb. 3.6), im Vergleich von stabil und transient exprimierten Rezeptorsystemen, ist ein Beleg für keine 1:1-Umsetzung in der Signalkette.

**Tabelle 4.7: Charakteristika der verwendeten Methoden hinsichtlich des zellulären Expressionssystems, des Meßparameters und der Inkubationszeit.**

Methode	Expression	Meßparameter	Inkubationszeit
Bindungsassay	transient	Affinität ( $K_d$ )	2 h
Adenylatcyclase Assay	transient	Potenz ( $EC_{50}$ )	20 min
HTS-Bioassay	stabil	Potenz ( $EC_{50}$ )	wenige Minuten

Vom  $EC_{50}$ -Wert verschiedene  $K_d$ -Werte im Vergleich zum Adenylatcyclase Assay resultieren auch aus unterschiedlichen Inkubationsbedingungen: GTP wird im Adenylatcyclase Assay mit hoher Konzentration eingesetzt und beeinflusst die Reaktion, während im Bindungsassay an intakten Zellen kein GTP zugesetzt wurde. Im Bindungsassay folgt die Gleichgewichtseinstellung nach dem Massenwirkungsgesetz langsam im Vergleich zum Adenylatcyclase Assay und dem HTS-Bioassay. Bei der Bestimmung von intrazellulärem Calcium tritt der Calcium-Einstrom durch die spezifischen Ionenkanäle sehr schnell ein, was einen schnellen Effekt zur Folge hat. Demnach werden unterschiedliche Zeitfenster in der Signalkaskade beobachtet (Tab. 4.7).

Außerdem wurden im HTS-Bioassay an stabil exprimierenden Zellen höhere Potenzen als Affinitäten im Bindungsassay erhalten ( $EC_{50} < K_d$ ). Dieser Unterschied könnte darin bestehen, das über eine Vielzahl von Rezeptoren ein Ligand eine Maximalwirkung erzielt, ohne daß alle Rezeptoren besetzt sind (submaximale Rezeptorbesetzung) (Kenakin, 1993). Dieses Phänomen, als „Rezeptorreserve“ (spare receptors) beschrieben, führt zu einer Ultrasensitivität des Systems.

Aus dem Vergleich aller Methoden ergibt sich für die Testung peptidischer Ligandbibliotheken (Kap. 5) sowie für das Auffinden neuer, CRF-rezeptorsubtypselektiver Liganden im weiteren Rahmen dieser Arbeit:

1. Der funktionelle Bioassay zur Bestimmung der Agonist-induzierten Änderung von intrazellulärem Calcium wurde auf HTS erprobt. Dieser Assay erlaubt schnell und rationell die zeitgleiche Testung vieler Substanzen an allen drei CRF-Rezeptoren, weswegen er sich vorteilhaft zum Screening der Peptidbibliotheken (als sogenannter Primärassay) eignet.

2. Der Adenylatcyclase Assay (als sogenannter zweiter, funktioneller Sekundärassay) soll zur pharmakologischen Charakterisierung potentiell selektiver Liganden dienen. Aus experimenteller Sicht ist dieser Assay für ein Screening an mehreren Rezeptoren nicht geeignet, da er auf 96 Säulenplätze beschränkt ist, was pro Rezeptor-subtyp ca. 5 – 6 Konzentrations-Wirkungskurven entspricht.
3. Der Radiorezeptor Bindungsassays (als sogenannter Sekundärassay) soll zur Feincharakterisierung potentiell selektiver Liganden dienen. Dafür werden transient exprimierte Testsysteme unter dem Aspekt der vereinfachten Kurvenanpassungen nach einem 1-Seiten-Bindungsmodell verwendet, da dieses Modell die richtigen Verhältnisse der Liganden zueinander wiedergibt.
4. Es sollen weiterhin für beide Sekundärassays transient exprimierte rCRF-Rezeptorsysteme verwendet werden, weil die heterolog exprimierten rCRF-Rezeptoren die endogenen CRF-Rezeptorsysteme sehr gut wiedergeben.
5. Die Basis für die Testung der Peptidbibliotheken ist eine eindeutige Differenzierung zwischen Urocortin I und Urocortin II an beiden rCRF-Rezeptorsubtypen. Diese Differenzierung wurde sowohl im HTS-Bioassay als auch im Adenylatcyclase Assay erhalten: Urocortin I verhält sich äquipotent an allen drei rCRF-Rezeptoren, wohingegen Urocortin II potenter an den rCRF<sub>2</sub>-Rezeptoren agiert.

