

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Peptide und Peptidbibliotheken

Alle peptidischen Liganden wurden in unserem Labor (Arbeitsgruppe Peptidsynthese) automatisch am MilliGen 9050 Peptidsyntheseautomat (Milligen/Biosearch, Burlington, MA) unter Verwendung der Festphasenpeptidsynthese (solid phase peptide synthesis, SPPS) sowie Fmoc-Strategie im kontinuierlichen Fließmodus (Beyermann et al. (1996) hergestellt. Die Reinigung der Rohpeptide erfolgte durch präparative HPLC. Der Reinheitsgehalt der Peptide von > 95% wurde durch RP-HPLC analysiert und die Peptide wurden durch Massenspektrometrie charakterisiert.

Die Peptidbibliotheken sind ebenfalls in der Arbeitsgruppe Peptidsynthese über Spot-Synthese an Cellulosemembranen (Frank, 1992; Kramer und Schneider-Mergener, 1998) halbautomatisch am Auto-Spot Robot ASP 222 (Intavis AG, Köln) an Whatman 50 Papier hergestellt worden. Dazu wurden die Hydroxylgruppen der Cellulosemembran mit Glycin funktionalisiert und die Peptide über die Aminogruppe mittels Fmoc-Chemie aufgebaut (s. a. Protokolle zur Spot-Synthese bei Frank, 1992).

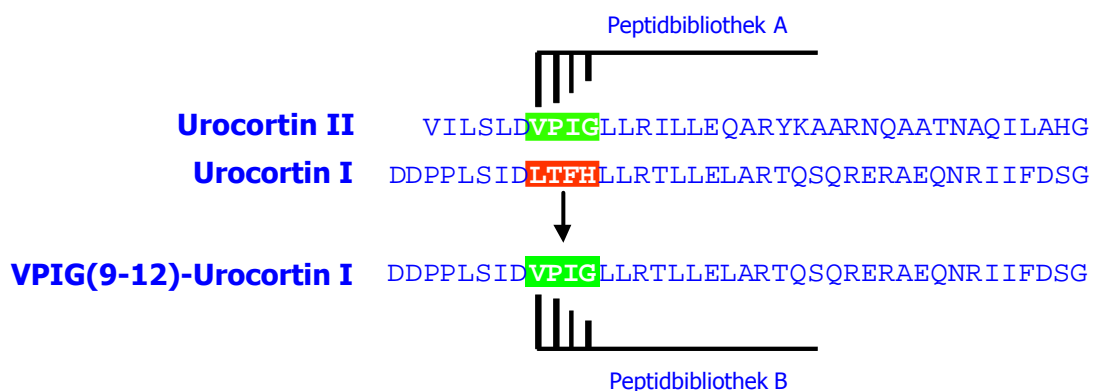


Abbildung 2.1: Primärstrukturen von Urocortin II, Urocortin I und VPIG(9-12)-Urocortin I mit dem auf Selektivität zu untersuchenden VPIG-Motiv als Ausgangspunkt für die beiden Peptidbibliotheken. Über Spot-Synthese wurde jede Position des Urocortin II und des VPIG(9-12)-Urocortin I durch jede natürliche Aminosäure einzelsubstituiert.

Die Peptidanaloga der Bibliothek A (Abb. 2.1) wurden in der Weise synthetisiert, daß jede Position des VPIG-Motivs im N-Terminus des Urocortin II sukzessiv durch alle 20 Aminosäuren einzeln ausgetauscht wurde (positional scanning library), was zu 80 Peptiden führte (Kap. 8.6). Für die Peptidbibliothek B (Abb. 2.1) wurde zuerst durch Austausch des LTFH-Motivs gegen VPIG im N-Terminus des Urocortin I das auf Selektivität zu untersuchende VPIG-Motiv eingeführt. Mit dem daraus entstandenen Peptid VPIG(9-12)-Urocortin I wurde im Anschluß daran sukzessiv an dieser Position durch Einzelsubstitution jede natürliche Aminosäure eingefügt, so daß ebenso 80 Peptide erhalten wurden (Kap. 8.7).

Die Peptidsynthesen erfolgten nach Standard-Fmoc-Chemie-Protokollen über Doppelkupplung von DIC/HOBt voraktivierten Fmoc-Aminosäuren, anschließender Deblockierung in 20% Piperidin in DMF sowie Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen mit TFA. Unter Ammoniak-Atmosphäre wurden ü. N. die an der Cellulose-gebundenen Peptide abgespalten, wobei sie an der Cellulose absorbiert blieben. Die Cellulose-Spots wurden ausgestanzt, und die Peptide wurden in DMSO für die Analyse und weitere Verwendung im HTS-Bioassay (Kap. 2.4.3.1, 5) gelöst.

Alle abgetrennten Peptide der Urocortin II-Bibliothek wurden durch HPLC analysiert und ausgewählte Peptide massenspektrometrisch charakterisiert. Alle Peptide der VPIG(9-12)-Urocortin I-Bibliothek wurden durch LC-MS unter Verwendung der Mariner BioSpectrometry Workstation (Applied Biosystems, Foster City, CA) in Kombination mit Ultimate LC Packung analysiert.

Peptide aus 38 bzw. 40 Aminosäuren waren an Cellulosemembranen im ca. 50 nmol-Maßstab synthetisierbar. Alle durch Spot-Synthese erhaltenen Produkte wurden durch LC-MS charakterisiert, wobei bei jeder Peptidprobe ein Hauptpeak vorhanden war, der dem Zielprodukt zugeordnet werden konnte. Abb. 2.2 zeigt das Massenspektrum von P50 als Beispielpeptid der VPIG(9-12)-Urocortin I-Peptidbibliothek (Kap. 8.7). Die Produktausbeute aller Peptide betrug ca. 5 – 10% Zielprodukt in einem Produktgemisch.

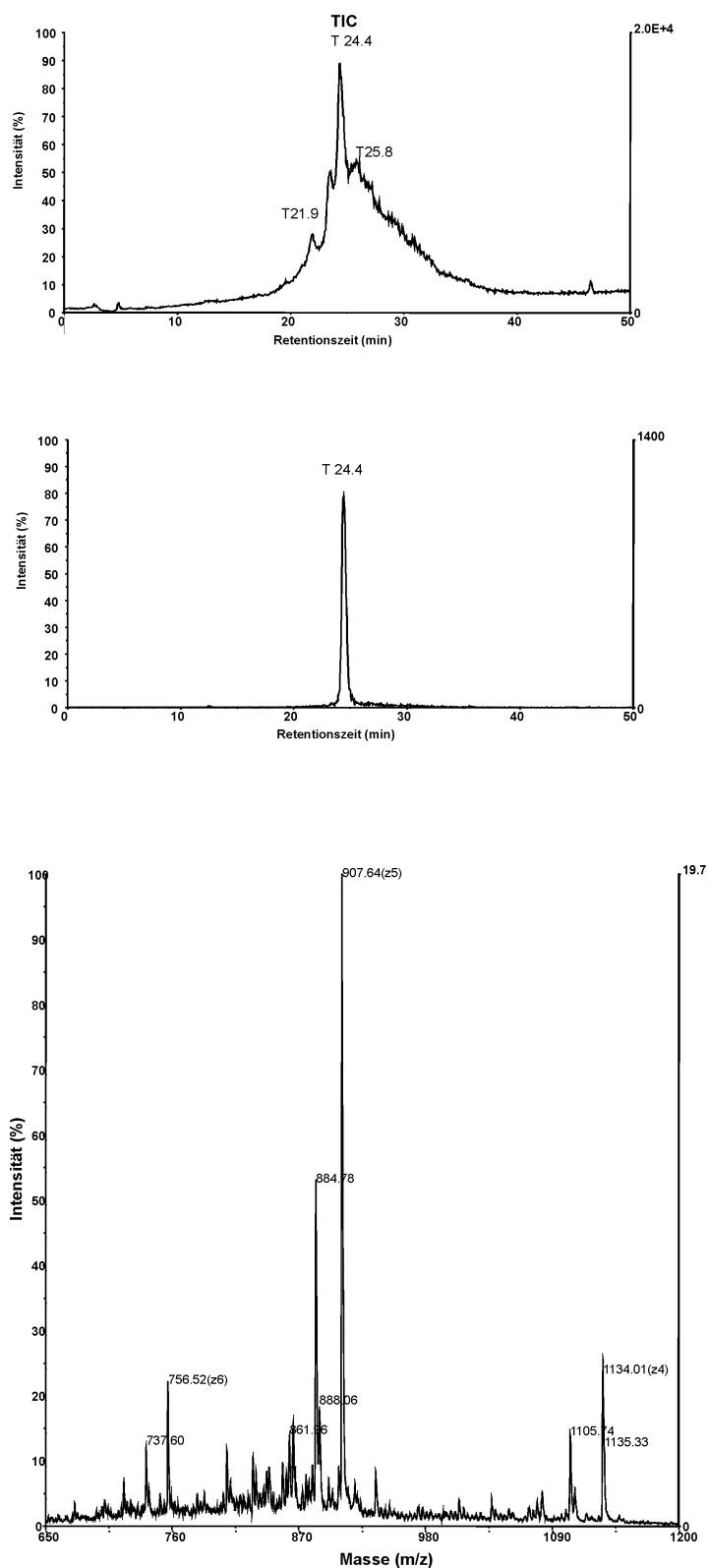


Abbildung 2.2: Massenspektrum des Peptids **DDPPLSIDVPLGLLRTLLELARTQSRERAE QNRIIFDSG-NH₂** aus der **VPIG(9-12)-Urocortin I-Peptidbibliothek**. Durch LC-MS Analyse wurde das gewünschte Produkt wie folgt identifiziert: $R_t = 24,4$ min, $[M + H]^+ = 4532,44$ ($m/z_5 = 907,64$), $M_{calc} = 4531,44$.

2.1.2 Zelllinien und CRF-Rezeptoren-cDNA

Zur Etablierung der zellulären Testsysteme wurde die menschliche, embryonale Nierenzelllinie 293 (human embryonic kidney; HEK 293-Zellen) verwendet, die mit einem Adenovirus transformiert ist (Graham et al., 1977).

Die cDNA für den rCRF₁-Rezeptor wurde uns durch Prof. U.B. Kaupp (IBI 1, Forschungszentrum Jülich) überlassen und in unserer Gruppe in den pcDNA3-Plasmidvektor (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) umklontiert. Für das Screening der beiden Peptidbibliotheken wurden vom IBI 1 drei stabil transfizierte HEK 293-Zelllinien zur Verfügung gestellt (Tab. 2.3). Jede Zelllinie enthält neben einen heterolog exprimierten Ca²⁺-sensitiven Ionenkanal jeweils die kodierende Sequenz des CRF-Rezeptorsubtyps (rCRF₁-, rCRF_{2a}- bzw. rCRF_{2b}-Rezeptor) von Ratte *Rattus norvegicus*.

2.1.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Restriktionsenzyme und die dazugehörigen Puffer wurden von Ambion (Austin, USA), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), GIBCO BRL (Karlsruhe), NEB (Schwalbach) und Roche (Mannheim) geliefert. Oligonukleotide wurden entweder von der BioTEZ GmbH (Berlin) oder mit dem „DNA-Synthesizer 391“ (Applied Biosystems) am IBI 1 (Jülich) synthetisiert.

Antibiotika, Fertiglösungen, Medien und Seren für die Zellkultur waren von Biochrom (Berlin), Calbiochem (Bad Soden), Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bzw. Sigma (Taufkirchen). LipofectAMINE™ von GIBCO BRL (Karlsruhe) und TransFAST™ von Promega (Mannheim) wurden für die Transfektionen gekauft.

Die Proteaseinhibitoren Aprotinin und Bacitracin stammen von Merck (Darmstadt), PMSF von ROTH (Karlsruhe) sowie Benzamidin und STI von Sigma (Taufkirchen).

Radioaktive Substanzen („Tracer“) wurden von folgenden Firmen erhalten: [¹²⁵I]Tyr⁰-Savagin (2200 Ci/mmol) und [³H]cAMP von PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA) und [α -³²P]ATP von Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK).

Alle sonstigen Chemikalien wurden in p. A. (pro analysis) Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Qiagen (Hilden), Serva (Heidelberg) und Sigma (Taufkirchen) bezogen.

Alle Lösungen wurden ausschließlich mit zweifach destilliertem Wasser oder mit hochreinem Millipore-Wasser hergestellt. Soweit erforderlich wurden die Lösungen 20 min durch Autoklavieren bei 121 °C sterilisiert. Zur Isolierung von RNA wurde zusätzlich DEPC-Wasser verwendet.

2.2 Molekularbiologische Techniken

2.2.1 Bakterienstämme und Plasmidvektoren

2.2.1.1 Escherichia coli K12-Bakterienstämme

XL1-Blue: (Stratagene, La Jolla, CA): recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (r_K^- , m_K^+), supE44, relA1, lac [F' proAB, lac^fZΔM15, Tn10 (tet^r)] (Bullock et al., 1987). Dieser Bakterienstamm diente zur Anreicherung von pBluescript SK⁻ Plasmiden.

DH10β: (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe): F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araΔ139 Δ(ara,leu)7697 galU galK λ^{rpsL} (Str^R) nupG. Dieser Bakterienstamm wurde zur Anreicherung von Plasmid-DNA verwendet.

2.2.1.2 Plasmidvektoren

pBluescript SK⁻: (Short et al., 1988); Stratagene, La Jolla, CA) trägt eine Ampicillinresistenz und wurde für die Klonierung der rekombinanten DNA des rCRF_{2a}- und rCRF_{2b}-Rezeptors verwendet.

pcDNA3-Max(Hygro)⁺: (IBI 1, Forschungszentrum Jülich) Basisvektor ist pcDNA3.1 (Hygro)⁺ (Invitrogen). Dieser Vektor enthält zusätzlich die Enhancer-Sequenz SP163 aus dem Vektor pcDNA4 His Max (Invitrogen). Der Vektor trägt eine Ampicillin- und Neomycinresistenz sowie eine zusätzliche Hygromycin B-Resistenz und wurde für die transiente bzw. stabile Expression von rCRF_{2a}- und rCRF_{2b}-Rezeptoren in HEK 293-Zellen verwendet.

2.2.2 Herstellung des Kulturmediums für E. coli

LB (Luria-Bertani)-Medium:

1,0%	Baktotrypton
0,5%	Hefeextrakt
1,0%	Na Cl

LB-Agar-Platten:

1,0%	Baktotrypton
0,5%	Hefeextrakt
1,0%	Na Cl
1,5%	Agar

Das Flüssigmedium wurde portioniert, bei 121 °C 20 min autoklaviert und bei Raumtemperatur (RT) gelagert. Agar enthaltendes Medium wurde nach dem Autoklavieren in sterile Petrischalen gegossen (ca. 25 - 30 ml/Schale).

Medienzusätze:

<u>Antibiotika</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Lösungsmittel</u>	<u>Lagerung</u>
Ampicillin	100,0 µg/ml	H ₂ O	-20 °C
Tetracyclin	12,5 µg/ml	Ethanol	-20 °C

Durch Zugabe von Antibiotika zum autoklavierten Medium wurde ein Selektivmedium erhalten. Die hier verwendeten Antibiotika sind thermosensibel, weswegen das Medium für die LB-Agar-Schalen nach Autoklavierung auf ca. 50 - 60 °C abgekühlt, bevor es mit Antibiotika versetzt wurde. Die Petrischalen lagerten maximal einen Monat bis zur Verwendung bei 4 °C.

Zur Farbidentifizierung von XL1-Blue-Bakterienkolonien mit rekombinanter DNA wurden auf LB-Agar-Schalen 50 µl X-Gal (250 mg/ml) und 25 µl IPTG (120 mg/ml) ausgestrichen.

2.2.3 Anzucht von E. coli-Bakterienkulturen

2.2.3.1 Anzucht von E. coli-Zellen zur Plasmidpräparation

E. coli-Zellen einer Bakterienkolonie oder einer Vorkultur wurden mindestens 8 h in LB-Medium bei 37 °C in einem Rotationsinkubator (New Brunswick, Nörtingen) bzw. in einem Warmluftschüttler (Braun-Dissel, Melsungen) inkubiert. Zur Selektion auf Plasmide wurde das Medium mit einem geeigneten Antibiotikum (Kap. 2.2.2) versetzt.

2.2.3.2 Herstellung kompetenter Zellen zur Transformation von Plasmid-DNA

Kompetente Zellen wurden nach einer modifizierten Form der CaCl₂-Methode (Mandel und Higa, 1970) hergestellt.

Eine E. coli-Übernachtskultur (ÜK) wurde bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 inkubiert, auf Eis abgekühlt und nach Zentrifugation (5 - 10 min, 5000 g, 4 °C) vorsichtig in ½ Kulturvolumen eiskalter CaCl₂-Lösung (100 mM) aufgenommen. Nach 20minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterienzellen erneut pelletiert, in 1/10 Kulturvolumen eiskalter 100 mM CaCl₂/25% Glycerin-Lösung resuspendiert und für 2 bis 4 h auf Eis inkubiert. Die kompetenten Zellen lagerten bis zur Verwendung bei -80 °C.

2.2.4 Präparation von Plasmid-DNA

2.2.4.1 Mini-DNA-Präparation durch alkalische Lyse

Die Präparation von Plasmiden (3 - 5 µg) aus kleinen Kulturvolumina erfolgte durch alkalische Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Bakterienzellen aus 1,5 bis 3,0 ml ÜK wurden pelletiert (30 - 60 s, 12000 g, RT) und in 150 µl Lösung I (50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5) resuspendiert. Danach lysierten die Zellen nach Zugabe von 180 µl Lösung II (0,4 M NaOH, 1% SDS) und vorsichtigem Mischen (Invertieren).

Proteine, chromosomale DNA und SDS wurden durch Zugabe von 225 µl Lösung III (3 M Kaliumacetat, pH 4,8) gefällt und pelletiert (5 min, 12000 g, RT). Nach Extraktion des Überstandes mit Phenol/Chloroform (Kap. 2.2.5.1) wurden die Nukleinsäuren mit 500 µl Ethanol präzipitiert, zentrifugiert (5 min, 12000 g, RT) und in 20 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen.

War die DNA zur Sequenzierung bestimmt (Kap. 2.2.11), mußte sie zusätzlich durch eine LiCl-Plasmidpräparation gereinigt werden. Verunreinigungen von RNA, die die Sequenzierreaktion negativ beeinflussen, wurden dadurch entfernt. Bakterienzellen aus einer 5 ml ÜK wurden wie oben beschrieben alkalisch mit Lösung I – III aufgeschlossen, mit 1,5 ml Ethanol präzipitiert und zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 60 µl 30 mM Tris/HCl (pH 7,5) resuspendiert. Zur Präzipitation der RNA wurden 100 µl 4 M LiCl-Lösung hinzugegeben, vorsichtig gemischt und zentrifugiert (17000 g, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde mit 500 µl eiskaltem Ethanol behandelt. Nach Fällung des Pellets wurde es in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und mit 0,5 µl RNase-Cocktail (RNase A 500 U/ml, RNase T1 20000 U/ml) (Ambion) 15 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde der Reaktionsansatz auf 100 µl Endvolumen aufgefüllt und mit Phenol extrahiert. Die DNA wurde durch 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 300 µl eiskaltem Ethanol präzipitiert und zentrifugiert. Nach Waschen des Pellets mit 70% Ethanol wurde erneut zentrifugiert und das Pellet in 20 µl TE aufgenommen. Die Ausbeute betrug je nach Dichte der ÜK 1,5 - 4 µg Plasmid-DNA.

2.2.4.2 Alkalische Midi- und Maxi-DNA-Präparation

Größere DNA-Mengen wurden mittels LiCl-Plasmidpräparation isoliert. Bakterienzellen aus 250 ml ÜK wurden pelletiert (10 min, 5000 g, 4 °C), in 20 ml Lösung I (Kap. 2.2.4.1) resuspendiert und mit 24 ml Lösung II (Kap. 2.2.4.1) lysiert, wobei die chromosomale DNA an der Zellwand gebunden blieb.

Zur Präzipitation der Zelltrümmer und Proteine wurden 30 ml Lösung III (Kap. 2.2.4.1) zugegeben und 10 min bei 5000 g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt, zentrifugiert (10 min, 5000 g, 4 °C) und die Nukleinsäuren in 1,45 ml H₂O und 50 µl Tris/HCl, pH 7,5 resuspendiert. Dann wurden 2,5 ml 4 M LiCl zugegeben, um die RNA zu fällen. Nach weiterer Zentrifugation von 5 min bei 5000 g und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 10 ml Ethanol gefällt. Das erhaltene Pellet (15 min, 5000 g, 4 °C) wurde in 500 µl TE-Puffer/5 µl RNase-Cocktail (Kap. 2.2.4.1) resuspendiert und 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion (Kap. 2.2.5.1) und Ethanol-Fällung (Kap. 2.2.5.2) gereinigt.

Alternativ wurden große DNA-Mengen auch durch Anionenaustauschchromatographie (JETstar, Genomed GmbH, Bad Oeynhausen) aus 500 ml Kulturvolumen nach Hersteller-Angaben isoliert. Die Ausbeute betrug je nach Dichte der Kultur 200 - 400 µg Plasmid-DNA.

2.2.5 Reinigung von Nukleinsäuren

2.2.5.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Verunreinigungen von DNA-Lösungen durch Proteine und Membranbestandteile, die in organischen Lösungsmitteln löslich sind, wurden mit dieser Extraktionsmethode entfernt. Dabei wurden die DNA-Lösungen mit dem gleichen Volumen einer gesättigten 1:1-Mischung aus Phenol und Chloroform versetzt, die Phasen gut gemischt und zur Trennung 5 min bei 12000 g und RT zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt, um Phenolreste zu entfernen.

Nach erneuter Zentrifugation wurde die DNA anschließend mit Ethanol aus der wässrigen Phase präzipitiert (Kap. 2.2.5.2).

2.2.5.2 Ethanol-Präzipitation

Um DNA zu konzentrieren oder umzupuffern, kann sie durch Einstellung definierter Salz- und Alkoholkonzentrationen präzipitiert werden. Dazu wurde die DNA-Lösung mit Natriumacetat auf eine Konzentration von 0,3 M (pH 4,8) eingestellt und mit 2,5 – 3fachem Volumen 100%igen Ethanol versetzt. Nach kurzem Mischen wurde 5 - 30 min bei -20 °C inkubiert und bei 18000 g und 4 °C zentrifugiert. Die Dauer der Zentrifugation richtete sich nach der Größe und Konzentration der DNA: je kleiner und geringer konzentriert die

DNA war, desto länger wurde zentrifugiert (30 - 120 min). Das DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in TE-Puffer (Kap. 2.2.4.1) aufgenommen.

2.2.6 Auftrennung und Elution von Nukleinsäuren durch Gelelektrophorese

2.2.6.1 DNA-Größen- und Mengenstandards

1 -DNA EcoRI/ HindIII Marker, 500 ng/7,5 µl (MBI Fermentas, St. Leon-Rot):

Fragmentgrößen: 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125 Bp

1 Kb DNA Ladder, 1 µg/µl (GIBCO BRL, Karlsruhe):

Fragmentgrößen: 12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 517, 506, 396, 344, 298 Bp

50 Bp Ladder, 1 µg/ml (Amersham, Freiburg):

Fragmentgrößen: 500, 450, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 Bp

2.2.6.2 Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren wurden für analytische und präparative Zwecke nach der Größe durch Elektrophorese in horizontalen Agarosegelen (Owl Separation Systems, Portsmouth) aufgetrennt. Die Agarosekonzentration variierte zwischen 0,75 - 2% (w/v): kleine DNA-Fragmente erforderten eine hohe Konzentration Agarose und umgekehrt.

Agarose wurde in 1x TAE (40 mM Tris/Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,5) gelöst und aufgekocht. Nach Abkühlung auf ca. 60 °C wurde Ethidiumbromid (1 µg/ml Endkonzentration) hinzugegeben und das Gel gegossen. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 1/10 Volumen Probenpuffer (50% Glycerin, 10x TAE, 0,02% Bromphenolblau, 0,02% Xylencyanol) versetzt.

Die Elektrophorese lief mit 1x TAE als Elektrophoresepuffer bei Spannungen zwischen 60 und 140 V, um die Nukleinsäuren ausreichend aufzutrennen.

2.2.6.3 Elution von DNA aus Agarosegelen durch Adsorption an QIAEX

Die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht (254 nm) durch Anfärbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht und aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Danach wurden sie nach Herstellerprotokoll mit QIAEX (Qiagen) eluiert.

2.2.7 Modifizierung von DNA-Fragmenten

2.2.7.1 Glätten überhängender Einzelstrang-Enden

Überhängende 5'-DNA-Enden wurden mit dem Klenow-Fragment der E. coli DNA-Polymerase I (NEB) aufgefüllt. Durch die 3'→5'-Exonukleaseaktivität des Enzyms wurden überhängende 3'-Enden abgeschnitten. Der Reaktionsansatz aus 2 U Klenow-Enzym/μg DNA, Restriktionspuffer A und 100 μmol dNTP wurde 45 min bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion 10 min bei 68 °C inaktiviert.

2.2.7.2 Phosphorylierung von 5'-DNA-Enden

PCR-Fragmente (Kap. 2.2.9), deren 5'-DNA-Enden nicht phosphoryliert waren, wurden vor der Ligation (Kap. 2.2.8.1) 1 h bei 37 °C durch T4-Polynukleotid Kinase (NEB) phosphoryliert. Der Reaktionsansatz bestand aus 4 - 10 U T4-Polynukleotid Kinase/μg DNA, Inkubationspuffer und 1 mM ATP. Die Inaktivierung der Kinase erfolgte im Anschluß für 20 min bei 68 °C.

2.2.7.3 Dephosphorylierung geschnittener DNA-Vektoren

Die glatten oder kompatiblen Enden geschnittener Vektor-DNA wurden mit alkalischer Phosphatase nach Angaben des Herstellers (Boehringer) 1 h bei 37 °C dephosphoryliert, um eine Religation der DNA-Enden zu vermeiden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μl EGTA (0,5 M, pH 8,0) und 15minütiger Inkubation bei 68 °C beendet. Die DNA wurde entweder mit Phenol/Chloroform (Kap. 2.2.5.1) extrahiert und anschließend mit Ethanol gefällt (Kap. 2.2.5.2) oder aus einem Agarosegel eluiert (Kap. 2.2.6.3).

2.2.8 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.2.8.1 Ligation

DNA-Fragmente wurden im 3 - 6fachen molaren Überschuß mit ca. 50 - 100 ng geschnittener und dephosphorylierter Vektor-DNA ligiert.

Wiesen die Fragmente komplementäre überhängende Einzelstrang-Enden auf, wurde mit 0,5 μl 1 U T4-DNA-Ligase (Roche) 30 min bei 22 °C bzw. ü. N. bei 16 °C ligiert. Bei glatten Enden von DNA-Fragmenten erfolgte die Ligation mit 0,5 μl 6,2 U T4-DNA-Ligase (Amersham Biosciences) ü. N. bei 16 °C. Das Reaktionsvolumen von 10-20 μl enthielt 1x Ligasepuffer (60 mM Tris/HCl, pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTE, 1 mM ATP).

2.2.8.2 Transformation

Der Ligationsansatz (Kap. 2.2.8.1) wurde mit 5 µl 10x CM-Puffer (100 mM CaCl₂, 400 mM MgCl₂) versetzt, auf 50 µl mit Wasser aufgefüllt, auf Eis gekühlt und mit 150 µl kompetente Zellen (Kap. 2.2.3.2) vermischt. Das Reaktionsgemisch wurde 45 - 60 min auf Eis, 1 min bei 42 °C („Hitzeimpuls“) und weitere 20 min auf Eis inkubiert. Zur Ausprägung der Antibiotika-Resistenz wurden 800 µl LB-Medium (Kap. 2.2.2) zugegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Regenerationszeit wurden die Zellen auf LB-Agar (100 µg/ml Ampicillin bzw. 10 µg/ml Tetracyclin) ausplattiert und ü. N. bei 37 °C inkubiert. Mit den Bakterienkolonien wurden anschließend Flüssigkulturen angeimpft (Kap. 2.2.3) und Nukleinsäuren präpariert (Kap. 2.2.4).

2.2.9 Amplifizierung von DNA durch Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction, PCR) dient zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten spezifischer Länge und Sequenz. In mehreren Zyklen wurde die Matrizen-DNA hitzedenaturiert, mit geeigneten Oligonukleotiden („Primern“) hybridisiert und diese mit Hilfe einer hitzestabilen Polymerase verlängert (Mullis et al., 1986).

Die PCR wurde im „DNA Thermo Cycler 480“ (Perkin Elmer, Boston, MA) bzw. im Perkin Elmer CETUS durchgeführt. Vor dem ersten Zyklus wurde die DNA 2 min bei 94 °C denaturiert. Während der Zyklen wurde je 45 s denaturiert und hybridisiert.

Die Hybridisierungstemperatur (T_m) entsprach der niedrigeren Schmelztemperatur der beiden Primer und errechnete sich nach folgender Formel:

$$T_m (\text{°C}) = (G/C) \times 4 \text{ °C} + (A/T) \times 2 \text{ °C} - (\text{Anzahl N}) \times 4 \text{ °C} - 4 \text{ °C}$$

Die Sequenzen der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer sind im Anhang (Kap. 7.4) zusammengestellt. Die Polymerisation der DNA erfolgte bei 72 °C. Die Zeitlänge richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragments und betrug ca. 1 s/10 B. Es wurden 25 - 44 Zyklen durchgeführt.

Ein PCR-Ansatz, bestehend aus 100 µl, setzte sich wie folgt zusammen: 3 - 10 ng cDNA (Kap. 2.2.13) oder 1 - 10 ng Plasmid-DNA (Kap. 2.2.4), je 200 ng spezifischer Primer, 10 µl 10x PCR-Puffer, 6 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl 20 mM dNTP, 1 - 2,5 U Taq-Polymerase (Roche).

Nach der PCR wurden die Ansätze mit Phenol/Chloroform extrahiert (Kap. 2.2.5.1) und mit Ethanol präzipitiert (Kap. 2.2.5.2). Die Enden von PCR-Fragmenten, die ohne vorherige Restriktion in Plasmidvektoren subkloniert werden sollten, wurden zunächst mit Klenow-Enzym geglättet (Kap. 2.2.7.1) und danach phosphoryliert (Kap. 2.2.7.2).

2.2.10 Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zum Schneiden wurden im jeweiligen 1x Inkubationspuffer 3 - 5 U Restriktionsenzym/ μg Plasmid-DNA bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur (meist 37 °C) eingesetzt.

Inkubationen mit mehreren Enzymen wurden bei übereinstimmenden Pufferbedingungen gleichzeitig durchgeführt. War dies nicht möglich, wurde zwischen den Inkubationen durch Zugabe der entsprechenden Salze die neuen Pufferbedingungen eingestellt, nach Ethanol-Präzipitation (Kap. 2.2.5.2) umgepuffert oder das benötigte Restriktionsfragment aus einem präparativen Agarosegel eluiert (Kap. 2.2.6.2, 2.2.6.3). Restriktionsansätze mit Plasmid-DNA, die durch alkalische Mini-Präparation (Kap. 2.2.4.1) isoliert worden war, wurden zusätzlich mit RNase-Cocktail versetzt.

Restriktionsanalysen wurden in einem Volumen von 10 μl durchgeführt und, wenn nicht anders vermerkt, nach 2 h Inkubation auf ein Agarosegel aufgetragen. Das Volumen für präparative Ansätze betrug 20 - 100 μl . Nach mindestens 1 h Inkubationszeit wurde kontrolliert, ob die DNA vollständig geschnitten worden war, gegebenenfalls erneut Enzym zugegeben und wenn nötig ü. N. inkubiert. Bei vollständiger Restriktion wurde der Ansatz auf ein präparatives Gel (Kap. 2.2.6.2) aufgetragen.

2.2.11 DNA-Sequenzierung mit LI-COR DNA-Sequenzierer

Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) im „LI-COR DNA Sequencer Long ReadIR 4200“ (MWG-Biotech, Ebersberg).

2.2.11.1 Sequenzierreaktion

Die Sequenzierreaktion wurde nach dem Protokoll des Herstellers unter Verwendung des „Thermo Sequenase DYEnamic Direct Cycle Sequencing Kit“ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt.

Pro kB der zu sequenzierenden DNA wurden ca. 65 ng DNA eingesetzt. Dazu wurden 0,8 μl IRD800-Fluorophor-markierten Primer (2 pmol/ μl) gegeben. Zur Relaxation der

Matrizen-DNA wurde der Ansatz mit 0,7 µl 50% DMSO versetzt und anschließend mit Wasser auf ein Endvolumen von 7 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde zu je 1,5 µl auf vier PCR-Gefäße aufgeteilt. Je 0,5 µl der vier Terminationsmixe wurden mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und jeweils zu einem der vier 1,5-µl-Aliquots gegeben. Alle Ansätze wurden mit 15 - 20 µl Chill-out 14 Liquid Wax (MJ Research) überschichtet und zur Sequenz-PCR eingesetzt.

2.2.11.2 PCR zur Sequenzierung

Die Reaktionen wurden in einem „Trio-Thermoblock“ (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Vor dem ersten Zyklus wurde die DNA 2 min bei einer Temperatur von 94 °C denaturiert. Während der 39 Zyklen denaturierte die DNA 35 s, die Hybridisierung der Primer erfolgte bei 50 °C für 35 s, und der DNA-Strang polymerisierte bei 70 °C für 60 s. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 3 µl Stoppuffer des Sequenzierkits (Kap. 2.2.11.1), dem Xylencyanol in einer Endkonzentration von 0,2% zugesetzt worden war, abgebrochen. Zur Denaturierung wurden die Reaktionsansätze 2 min auf 70 °C erhitzt und anschließend auf RT abgekühlt.

2.2.11.3 Acrylamid-Gelelektrophorese zur Sequenzierung

41,6 ml einer 4,6% Acrylamidgellösung (21 g Harnstoff, 5 ml 10x TBE, 0,5 ml DMSO, 5,6 ml Rapid Gel XL [USB, Bad Homburg], 30,5 ml H₂O) wurde im Vakuum oder durch Sonifizierung entgast und mit 350 µl 10% APS sowie 50 µl TEMED versetzt. Diese Gellösung wurde mit einer 60-ml-Spritze luftblasenfrei durch einen Sterilfilter zwischen zwei mit Wasser und Ethanol gereinigte Glasplatten gegossen, die durch 0,25 mm starke Abstandshalter getrennt und mit Schraubschienen zusammengedrückt wurden. Ein „Vorformer“-Kamm wurde in das Gel gedrückt, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach 1 h war die Polymerisation des Acrylamids abgeschlossen. Das Gel wurde in die Gerätekammer eingespannt und diese mit 1x TBE (10x TBE: 1,34 M Tris, 450 mM Borsäure, 25mM EDTA, pH 8,3 – 8,7 bei 50 °C) gefüllt.

Die Elektrophorese wurde mit 1x TBE als Laufpuffer bei 45 W und 45 °C durchgeführt. Nach einem 45minütigen Vorlauf wurden 1,0 - 1,8 µl jeder Sequenzierreaktion (Kap. 2.2.11.2) auf das Sequenziergel aufgetragen. Die Probestaschen wurden von einem „Haifischzahn“- Kamm gebildet, der leicht auf der Geloberfläche aufsaß. Die Gelelektrophorese dauerte 8 - 10 h.

Zur Auswertung der Sequenzen wurde die Software des Geräteherstellers sowie die Programme PCGene und PCSupp (Dr. W. Bönigk, IBI 1, Jülich) verwendet. Die Leseweiten betragen zwischen 600 und 1000 Bp.

2.2.12 Präparation von RNA

2.2.12.1 Präparation von Gesamt-RNA

Die Präparation von Gesamt-RNA erfolgte mit Guanidiniumthiocyanat (Handelsname: TRIZOL[®]) nach dem Protokoll des Herstellers (GIBCO BRL Life Technologies, Karlsruhe). Gewebe (Hypothalamus) wurde aus männlichen 6 - 8 Wochen alten Ratten (*Rattus norvegicus*, WISTAR, Schönwalde, Eigenzucht) entnommen, schockgefroren und mit TRIZOL[®]-Reagenz versetzt und mittels Teflon-Glas Homogenisator (B. BRAUN, Melsungen) homogenisiert. Das Homogenat wurde in Corexröhrchen umgefüllt und mit 1/5 Volumen bei 4°C gelagertes Chloroform versetzt, kurz geschüttelt und 2- 3 min inkubiert. Dadurch wurde eine Phasentrennung erzielt, wobei der Zellkern-Proteinkomplex denaturierte. In der wäßrigen, farblosen Phase reicherte sich die RNA an, während sich Proteine und – durch die pH-Wert-Verschiebung unter 7,0 - auch DNA vorwiegend in der Interphase bzw. in der rot gefärbten Phenol-Chloroform-Phase ansammelten. Nach 15minütiger Zentrifugation bei 12000 g und 4°C in der SORVALL RC28S Zentrifuge (DuPont) wurde die wäßrige Phase vorsichtig abpipettiert und zuerst mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform und im zweiten Schritt mit Chloroform extrahiert. Die RNA-Präzipitation erfolgte mit Isopropanol 10 min bei RT. Danach wurde 10 min bei 15 °C und 10000 g zentrifugiert; das erhaltene RNA-Pellet wurde mit 75% Ethanol gewaschen und entweder direkt für die cDNA-Synthese (Kap. 2.2.13) eingesetzt oder bei –20 °C bzw. – 80 °C in alkoholischer Lösung gelagert.

2.2.12.2 Präparation von polyadenylierter RNA

Polyadenylierte RNA wurde mit dem „FastTrack[®] 2.0 mRNA Isolation Kit“ (Invitrogen) nach Herstellerangaben isoliert. Ca. 1,3 g Gewebe (Herz) wurde aus männlichen 6-8 Wochen alten Ratten (*Rattus norvegicus*) entnommen, bei –80 °C schockgefroren, mit dem Aufschlußpuffer des Herstellers versetzt und mit einem Ultra-Turrax T25 mit dem Homogenisatorvorsatz S25N-18G (IKA-Labortechnik) homogenisiert. Im Anschluß wurde das Zellysat 60 min im Wasserbad bei 45 °C inkubiert. Nach Zugabe von 5 M NaCl wurde die Probenlösung mehrmals durch eine STERICAN Kanüle 20 GX 2 4/5 gepreßt, um die chromosomale DNA zu scheren. Anschließend wurde die RNA-Probe mit oligo(dT) Cellulose versetzt und 1 h bei RT geschüttelt.

Nach Zentrifugation (3000 g, 5 min, RT) folgten mehrmalige Waschprozeduren mit Puffern niedrigen Salzgehalts, um SDS und kontaminierte RNA (z. B. rRNA) zu entfernen. Über Säulenchromatographie wurde die polyadenylierte RNA eluiert und mit 0,15 Volumen 2 M Natriumacetat und 2,5 Volumen 100% Ethanol präzipitiert. Die RNA wurde entweder direkt für die cDNA-Synthese (Kap. 2.2.13) eingesetzt oder bei -20 °C bzw. -80 °C in alkoholischer Lösung gelagert.

2.2.13 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription

Die Synthese von cDNA erfolgte mit Random Hexamer Primern nach dem Protokoll von MBI Fermentas oder mit einem genspezifischen Primer mit dem „cDNA Cycle Kit (Version C)“ von Invitrogen.

Dazu wurde die in Ethanol gelagerte RNA (Kap. 2.2.12.1, 2.2.12.2) zunächst zentrifugiert, in DEPC-Wasser aufgenommen und quantifiziert (Kap. 2.2.14.1). Die RNA wurde anschließend mit 0,2 μg Random Hexamer (GIBCO BRL) versetzt, 5 min bei 70 °C inkubiert und sofort auf Eis gestellt. Dann wurde 4 μl 5x Puffer, 2 μl 10 mM 4 dNTP (Endkonzentration 1 mM, GIBCO BRL) und 20 U Ribonukleaseinhibitor (GIBCO BRL) und DEPC-Wasser bis zu einem Volumen von 18 μl hinzugegeben. Dieser Reaktionsansatz wurde für 5 min bei einer Temperatur von 25 °C inkubiert. Nun wurden 40 U des Enzyms M-MuLV Reverse Transkriptase (GIBCO BRL) pipettiert und weitere 10 min bei 25 °C gelassen. Anschließend lief die Reaktion 60 min bei 37 °C . Sie wurde gestoppt durch 10minütiges Erhitzen auf 70 °C .

Bei der alternativen Methode, um cDNA zu synthetisieren, wurde die in DEPC-Wasser aufgenommene und quantifizierte RNA mit dem genspezifischen Primer 2A-Rev (Endkonzentration 0,6 μM , Kap. 7.4) 10 min bei 65 °C inkubiert und 2 min bei 4 °C gelagert. Dann wurde 1 μl RNase Inhibitor, 4 μl 5x Puffer, 1 μl 100 mM dNTP, 1 μl 80 mM NaPP und 0,5 μl AMV-Reverse Transkriptase bis zu einem Volumen von 20 μl hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde 60 min bei einer Temperatur von 42 °C inkubiert und anschließend 2 min bei 95 °C inaktiviert.

2.2.14 Quantifizierung von Nukleinsäuren und Proteinen

2.2.14.1 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde entweder photometrisch mittels Gene Quant RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech, Cambridge) oder mit Hilfe der Ethidiumbromid-Fluoreszenz bestimmt.

Durch Ethidiumbromid-Fluoreszenz wurde die Nukleinsäurekonzentration ermittelt, indem die DNA zunächst in einem Agarosegel (Kap. 2.2.6.2) elektrophoretisch aufgetrennt wurde. Im Anschluß wurde die Konzentration unter UV-Licht (302 nm) durch Vergleich mit einem gleichzeitig aufgetragenen Größen- und Mengenstandard (Kap. 2.2.6.1) anhand der Bandenintensität abgeschätzt.

Als Indikator für die Reinheit wurde der Quotient OD_{260}/OD_{280} herangezogen, der bei reinen Nukleinsäuren zwischen 1,6 und 1,8 liegen sollte.

2.2.14.2 Quantifizierung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der photometrischen Methode (Bradford, 1976). 5 µl Proteinlösung wurden mit 45 µl H₂O sowie 50 µl 2 N NaOH versetzt und 10 min bei 60 °C inkubiert. Danach wurde in jede Probe 1 ml Bradford-Reagenz (100 mg Coomassie Brillantblau G250, 95% EtOH, 85% H₃PO₄) gegeben und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Programm KELL für Windows 6.0 (BIOSOFT, Cambridge, UK) anhand einer Eichkurve ermittelt, die vorher aus den Extinktionswerten eines Proteinstandards (1, 2, 5, 10, 20, 40 µg BSA, Merck) erstellt worden war.

2.3 Heterologe Genexpression in HEK 293-Zellen

2.3.1 Kulturbedingungen für HEK 293-Zellen

HEK 293-Zellen (Kap. 2.1.2) wurden bei 37 °C unter 10% CO₂ in Dulbecco's Modifiziertem Eagle's Medium (DMEM) mit 1000 mg/l Glucose unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum, 2mM L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin¹ bis zu 40 Passagen kultiviert. Die Generationszeit der Zellen betrug ca. 24 h. Sie wurden zweimal wöchentlich bei einer Zelldichte entsprechend von 90% Konfluenz passagiert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit Phosphatpuffer (PBS bestehend aus 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O und 1,5 mM KH₂PO₄; pH 7,4) gewaschen und danach mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%/0,02%) bei 32 °C abgelöst.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in DMEM resuspendiert und im CASY[®]1-Zellzählgerät (Schärfe System GmbH, Reutlingen) analysiert.

¹ im weiteren Kompletmedium genannt

2.3.2 Transiente Expression von Proteinen in HEK 293-Zellen

Die cDNA vom rCRF₁-Rezeptor (Kap. 2.1.2) im Expressionsvektor pcDNA3 sowie die klonierte cDNA vom rCRF_{2a}- und rCRF_{2b}-Rezeptor (Kap. 2.2) im Expressionsvektor pcDNA3-Max(Hygro)⁺ wurde mit Hilfe des Transfektionsmittels TransFAST™ (Liposomen-Technik) in die HEK 293-Zellen transfiziert.

Als Kontrolle wurde pcDNA3 ohne cDNA-Insertion bzw. mit Wasser (d. h. ohne Plasmid-DNA) transfiziert.

Vor jeder Zellaussaat für Bindungsassays wurden die Zellkulturplatten (24-Well-Format) mit Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) beschichtet. Für die Aufnahme von Sättigungsbindungskurven wurden $2,5 \times 10^4$ Zellen pro Well in eine Zellkulturplatte ausgesät. Für die Kompetitionassays wurden $5,0 \times 10^4$ Zellen pro Well verwendet. Für die Membranpräparationen wurden $1,2 \times 10^6$ Zellen pro Zellkulturschale (Ø 100 mm) ausgesät.

Tabelle 2.1: Transfektionsansätze für die transiente Transfektion von DNA in HEK 293-Zellen (Verhältnis DNA:TransFAST_ä = 1:3).

	Zellkulturplatte (24-Well-Format)	Zellkulturschale (Ø 100 mm)
DNA	0,25 µg /Well	8 µg/Schale
TransFAST™ (1 mM)	0,75 µl /Well	24 µl/Schale
DMEM ohne FKS + AB	200 µl /Well	5000 µl/Schale

Die Transfektionsansätze (Tab. 2.1) wurden 12 min bei RT inkubiert und anschließend auf logarithmisch wachsenden Zellen, die vor ca. 24 h ausgesät und mindestens einmal mit DMEM ohne FKS + AB gewaschen wurden, pipettiert. Nach 2stündiger Transfektion im Brutschrank bei 37 °C und 10% CO₂ wurde in jede Zellkulturplatte (24-Well-Format) 1 ml Medium bzw. in jede Kulturschale (Ø 100 mm) 10 ml Komplettmedium (Kap. 2.3.1) gegeben.

Die transient transfizierten Zellen wurden sowohl für die Bindungsassays (Kap. 2.4.2) als auch für die Membranpräparation (Kap. 2.3.4) 72 h unter den in Kap. 2.3.1 beschriebenen Bedingungen kultiviert.

2.3.3 Stabile Expression von Proteinen in HEK 293-Zellen

Für die stabile Expression der rCRF-Rezeptoren wurden $4,0 \times 10^5$ HEK 293-Zellen pro Zellkulturschale (Ø 60 mm) ausgesät. Nach 24 h Wachstum wurde die cDNA, die für den

rCRF₁⁻, rCRF_{2a}⁻ bzw. rCRF_{2b}-Rezeptor im entsprechenden Expressionsvektor kodiert, mit LipofectAMINE™ (2 mg/ml) nach dem Protokoll des Herstellers (GIBCO BRL Life Technologies, Karlsruhe) transfiziert. 48 h später erfolgte die Umsetzung der Zellen auf Zellkulturschalen (Ø 100 mm) mit Komplettmedium, das zusätzlich das entsprechende Antibiotikum (Tab. 2.2) zur Selektion stabiler Zellklone enthielt. Nach 10 - 12 d regelmäßigen Mediumwechsels wurden Einzelklone aus der Zellkulturplatte (24-Well-Format) in Zellkulturflaschen (25 cm²) überführt.

Tabelle 2.2: Selektionsantibiotika für die rCRF-Rezeptoren in Abhängigkeit des Expressionsvektors.

Rezeptorsubtyp	rCRF ₁	rCRF _{2a}	rCRF _{2b}
Expressionsvektor	pcDNA3	pcDNA3Max(Hygro) ⁺	pcDNA3Max(Hygro) ⁺
Resistenzgen	Neomycin	Hygromycin	Hygromycin
Antibiotikum	G418 (Geneticin)	Hygromycin B	Hygromycin B
Endkonzentration	400 µg/ml	150 µg/ml	150 µg/ml

G418-resistente Klone (zur Selektion von rCRF₁-Rezeptor exprimierenden Zellen) bzw. Hygromycin B-resistente Klone (zur Selektion von rCRF_{2a}⁻ oder rCRF_{2b}-Rezeptor exprimierenden Zellen) wurden isoliert und durch [¹²⁵I]Tyr⁰-Sauvagin-Kompetitionsbindungsassays (Kap. 2.4.2.2) auf Genexpression überprüft. Für jeden Rezeptorsubtyp wurde ein Klon identifiziert, der einen hohen Anteil an spezifischer Bindung zeigte. Dieser Klon wurde in allen späteren Bindungsstudien verwendet.

Die stabil transfizierten Zellen wurden sowohl für die Bindungsassays (Kap. 2.4.2) als auch für die Membranpräparation (Kap. 2.3.4) 96 h wie in Kap. 2.3.1 beschrieben kultiviert.

2.3.4 Präparation von Membranproteinen aus HEK 293-Zellen

Membranen für den funktionellen Adenylatcyclase Assay (Kap. 2.4.3.2) wurden aus HEK 293-Zellen präpariert, die zuvor transient (Kap. 2.3.2) oder stabil (Kap. 2.3.3) mit der entsprechenden rCRF-Rezeptor-DNA transfiziert worden waren.

Die Zellen wurden 4 d nach Zellaussaat bzw. 3 d nach transients Transfektion geerntet, zweimal mit PBS (Kap. 2.3.1) gewaschen und danach mit einem Zellschaber in PBS gesammelt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation 5 min bei 400 g und 4 °C pelletiert. Das Zellpellet wurde in Homogenisationspuffer, bestehend aus 20 mM

HEPES, 1 mM EDTA und 27% (w/v) Sucrose (pH 7,8), suspendiert und mit einem Teflon-Glas Homogenisator (B. BRAUN, Melsungen) 10 Hiebe bei 750 rpm homogenisiert. Danach wurde das Homogenat bei 20000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Membranpellet in einem weiteren Puffer, bestehend aus 20 mM HEPES und 1 mM EDTA (pH 7,8), resuspendiert. Bis zur Verwendung lagerten die Membransuspensionen aliquotiert bei -70 °C. Die Präparation der Membranproteine erfolgte im Kühlraum bei 4 °C.

2.4 Pharmakologische Charakterisierung der heterolog exprimierten CRF-Rezeptoren

2.4.1 Begriffsdefinitionen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten pharmakologischen Begriffe sind wie folgt definiert:

- B_{\max} = ist die maximale Rezeptorkonzentration bzw. maximale Menge des Liganden, die spezifisch von der Rezeptorfraktion gebunden wird (Rezeptorkapazität).
- EC_{50} = ist die Konzentration des biologisch wirksamen Liganden, bei der 50% des maximal möglichen Effekts erhalten wird (Potenz, $1/EC_{50}$).
- K_d = ist die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Liganden und stellt ein Maß für die Affinität ($1/K_d$) des Liganden zum Rezeptor dar.
- SF = ist der Selektivitätsfaktor und errechnet sich aus dem Quotienten der EC_{50} -Werte eines Liganden für den CRF_1 -Rezeptor und den CRF_2 -Rezeptor.

Die Aktivitäten der in dieser Arbeit untersuchten Agonisten werden durch die Parameter Affinität (aus den Bindungskurven) und Potenz (aus den Konzentrations-Wirkungskurven der funktionellen Assays) charakterisiert. Peptide der Peptidbibliotheken werden in den Struktur-Wirkungs-Untersuchungen durch die Aktivität beschrieben, die bei einer definierten Peptidkonzentration im funktionellen Assay ermittelt wurde.

2.4.2 Bindungsassays an intakten Zellen mit heterolog exprimierten CRF-Rezeptoren

Alle Peptide für die Testung in den Bindungsassays wurden in Tris-BAME (50 mM Tris, 0,15 mM Bacitracin, 0,0015% Aprotinin, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM EGTA, pH 7,2) gelöst und als 10^{-5} M Stammlösung angesetzt. Die Peptidkonzentrationen der Lösungen, bestehend

aus unmarkierten und markierten Liganden, wurden mit dem Bindungspuffer (Kap. 2.4.2.1) eingestellt, der zuvor mit 0,15 mM Bacitracin, STI (2 µg/µl), Aprotinin (1 µg/µl), 100 mM Benzamidin, 40 mM PMSF und 0,05% BSA (w/v) versetzt wurde.

Zur Unterbindung der unspezifischen Adsorption des radioaktiv markierten Liganden wurden spezielle silikonisierte Reaktionsgefäße sowie Pipettenspitzen (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf; Eppendorf, Hamburg) verwendet.

2.4.2.1 Sättigungsbindungsassay

Für die Aufnahme der Sättigungskurven von [¹²⁵I]Tyr⁰-Sauvagin (spezifische Aktivität 2200 Ci/mmol) an intakten Zellen erfolgte zunächst Zellaussaat und Transfektion der rCRF-Rezeptoren-DNA wie in Kap. 2.3.2 und 2.3.3 beschrieben. Die HEK 293-Zellen wurden anschließend in einer Zellkulturplatte (24-Well-Format) bei RT mit Bindungspuffer, bestehend aus 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 7,2 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, 1 mM CaCl₂ x 2H₂O und 10 mM MgCl₂ x 6H₂O, gewaschen. Danach wurden sie in einem Inkubat von 450 µl pro Well als Dreifachbestimmung mit steigender [¹²⁵I]Tyr⁰-Sauvagin-Tracerkonzentration (3,13 x 10⁻¹¹ bis 2,00 x 10⁻⁹ M) für 2 h bei einer Temperatur von 25 °C inkubiert. Die nichtspezifische Bindung wurde für alle Tracerkonzentrationen durch Zugabe von 1 µM Sauvagin bestimmt. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal auf Eis mit auf 4 °C vorgekühltem Bindungspuffer gewaschen. Dann wurden die Zellproben durch Zugabe von 500 µl 0,1 N NaOH pro Well lysiert und im γ-Counter WALLAC 1470 WIZARD (Perkin Elmer, Freiburg) gemessen.

Alternativ wurden 7 - 17 µg Membranprotein von HEK 293-Zellen, die den rCRF₁-Rezeptor stabil exprimierten (Kap. 2.3.4), als Dreifachbestimmung mit [¹²⁵I]Tyr⁰-Sauvagin-Tracer bei 25 °C für 2 h in 300 µl Bindungsmedium inkubiert, das aus 50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 100 mM NaCl, 0,1 µM GDP 10 mM MgCl₂, 0,2 mM EGTA, 1 mg/ml BSA und 0,15 mM Bacitracin bestand. Um den weiter gefaßten Konzentrationsbereich des Liganden von 5 x 10⁻¹² bis 2 x 10⁻⁷ M zu realisieren, wurden zwei Tracerstocklösungen hergestellt, in welchen die spezifische Radioaktivität durch unmarkiertes 3-I-Tyr⁰,Gln¹-Sauvagin von 2200 Ci/mmol auf 5 - 46 und 243 - 361 Ci/mmol reduziert wurde. Die nichtspezifische Bindung wurde für alle Tracerkonzentrationen durch Zugabe von 1 µM 3-I-Tyr⁰,Gln¹-Sauvagin bestimmt. Abschließend wurden die Proben durch GF/C Whatman-Filter in einem Brandelharvester gefiltert und im Counter gemessen.

2.4.2.2 Kompetitionsbindungsassay

Für den Oberflächenbindungsassay an intakten Zellen wurden nach Zellaussaat und Transfektion der rCRF-Rezeptoren-DNA (Kap. 2.3.2, 2.3.3) die Zellen, die eine mindestens 80%ig erreichte Konfluenz hatten, in einer Zellkulturplatte (24-Well-Format) mit Bindungspuffer (Kap. 2.4.2.1) bei RT gewaschen. Danach wurden die HEK 293-Zellen für 2 h bei 25 °C in Anwesenheit von 0,1 nM [¹²⁵I]Tyr⁰-Sauvagin und steigender Konzentration an Testpeptid (10⁻¹⁰ bis 10⁻⁶ M, dreifachbestimmt) in einem Endvolumen von 450 µl pro Well inkubiert. Sauvagin diente als Referenzpeptid bei allen Bindungsassays. Die nicht-spezifische Bindung wurde daher immer in Anwesenheit von 1 µM Sauvagin bestimmt. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal auf Eis mit 4 °C kaltem Bindungspuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellproben durch Zugabe von 500 µl 0,1 N NaOH pro Well lysiert und im γ-Counter WALLAC 1470 WIZARD (Perkin Elmer, Freiburg) gemessen.

2.4.3 Funktionelle Bioassays an heterolog exprimierten CRF-Rezeptoren

Für das Screening im HTS-Bioassay (Kap. 2.4.3.1) wurden die Peptidbibliotheken sowie die Peptidliganden in 10% DMSO und im Assaypuffer, bestehend aus 120 mM NaCl, 3 mM KCl, 40 mM HEPES, 50 mM Glucose, 3 mM CaCl₂ (pH 7,4), gelöst. Peptidliganden für die Testung im Adenylatcyclase Assay (Kap. 2.4.3.2) wurden in Tris-BAME (50 mM Tris, 0,15 mM Bacitracin, 0,0015% Aprotinin, 10 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, pH 7,2) aufgenommen. Alle Peptide wurden als 10⁻⁵ M Stammlösung zubereitet.

Zur Unterbindung der unspezifischen Adsorption der Peptidliganden wurden spezielle silikonisierte Reaktionsgefäße sowie Pipettenspitzen (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf; Eppendorf, Hamburg) verwendet.

2.4.3.1 Messung der Rezeptoraktivierung über die Bestimmung von intrazellulärem Calcium als Screening-Verfahren an intakten heterolog exprimierenden Zellen

Der ligandabhängige Einstrom von Ca²⁺-Ionen in die Zellen wurde durch ein Spektrofluorometer (fluorometric imaging plate reader; FLIPR) aufgenommen. Dazu wurden drei stabil transfizierte HEK 293-Zelllinien (Kap. 2.1.2) verwendet, die neben einem Ca²⁺-sensitiven cyclisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanal (cyclic nucleotide-gated ion channel, CNG-Ionenkanal) jeweils den CRF-Rezeptorsubtyp (rCRF₁-, rCRF_{2a}- bzw. rCRF_{2b}-Rezeptor) koexprimieren (Tab. 2.3).

Tabelle 2.3: Aufbau der Zelllinien zur Untersuchung der CRF-Rezeptoraktivierung im HTS-Bioassay.

Zelllinie	Rezeptorsubtyp	Biosensor	Zelltyp
1.	rCRF ₁	CNG-Ionenkanal	HEK 293
2.	rCRF _{2a}		
3.	rCRF _{2b}		
4.	ohne		

Als Kontrolle diente eine vierte Zelllinie, die nur den CNG-Ionenkanal ohne Rezeptorsubtyp exprimierte (Tab. 2.3).

Die Kultivierung dieser Zellen erfolgte bei 37 °C und 5% CO₂ in DMEM (4500 mg/l Glucosegehalt, GIBCO BRL) unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin sowie der Selektionsantibiotika G418 (1 mg/ml) und Hygromycin B (100 µg/ml).

Die Zellen mit den jeweils heterolog exprimierten rCRF-Rezeptorsubtypen wurden in einer Dichte von 5,0 – 6,5 x 10⁴ Zellen bei 37 °C und 5% CO₂ in oben genanntem Medium in Zellkulturplatten (96-Well-Format), die vorher mit Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) beschichtet worden war, ausgesät. Nach 24 h war eine 85 – 95%ige Konfluenz der Zellen erreicht, und sie wurden 60 min im Dunkeln bei RT mit Assaypuffer (Kap. 2.4.3) inkubiert, der 4 µM des cytoplasmatischen Ca²⁺-Indikators FLUO-4 AM (Molecular Probes, Leiden) sowie 2,5 mM Probenecid enthielt. Anschließend wurde diese Fluoreszenz-Farbstofflösung entfernt, und die Zellen wurden im Assaypuffer unter erneutem Zusatz von 2,5 mM Probenecid aufgenommen. Unter Zugabe der Peptidlösungen mittels Mehrkanalpipette wurde als Zweifachbestimmung die Ca²⁺-induzierte Fluoreszenz in den HEK 293-Zellen im FLUOstar/POLARstar „Galaxy“ (BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg) bei einer Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{Ex}} = 485$ nm und Emissionswellenlänge $\lambda_{\text{Em}} = 520$ nm sowie einer Temperatur von 30 °C gemessen.

Die Testung der Peptidbibliotheken erfolgte an allen drei rCRF-Rezeptoren bei 100 nM, 10 nM und 2 µM. Zur Aufnahme von Konzentrations-Wirkungskurven wurden die Peptidliganden im Konzentrationsbereich von 10⁻¹⁰ bis 10⁻⁶ M eingesetzt.

2.4.3.2 Adenylatcyclase Assay an heterolog exprimierten Membranproteinen

20 µg Membranprotein von HEK 293-Zellen, die jeweils den CRF-Rezeptor rCRF₁, rCRF_{2a} bzw. rCRF_{2b} rekombinant exprimierten (Kap. 2.3.4), wurden in einem Reaktionsgemisch aus 50 mM Tris/HCl (pH 7,4), 4 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 1 mM IBMX, 1 mM cAMP, 100 µM ATP, 10 µM GTP, 1 mM DTT, 0,75 µCi [α -³²P]ATP, 5,1 mg/ml Phosphocreatine, 1,32 mg/ml Creatine Phosphokinase, 12 mg/ml BSA in einem Endvolumen von 100 µl als Zweifachbestimmung für 20 min bei 32 °C inkubiert. Um Konzentrations-Wirkungskurven zu erhalten, wurden die zu untersuchenden Peptidliganden im Konzentrationsbereich von $3,2 \times 10^{-10}$ bis $1,0 \times 10^{-6}$ M hinzugegeben. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 500 µl einer Lösung bestehend aus 4 mM ATP, 1,4 mM cAMP, 2% SDS and 1 mM [³H]cAMP (~ 10000 cpm) gestoppt. [α -³²P]cAMP wurde durch sequentielle Säulenchromatographie an Dowex 50-X8 Kationenaustauscharz und Aluminiumoxid isoliert (Salomon et al., 1974). Das 3-ml-Eluat von jeder Aluminiumoxidsäule wurde mit 13 ml Aquasafe 300 Plus Szintillator (Zinsser Analytic, Frankfurt) equilibriert und die Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter WALLAC 1410 (Perkin Elmer, Freiburg) bestimmt.

2.4.4 Analyse der pharmakologischen Daten

Zur Berechnung der EC₅₀-Werte aus den Konzentrations-Wirkungskurven der funktionellen Bioassays (Kap. 2.4.3) wurde das iterative nichtlineare Kurvenanpassungs-Programm PRISM 3.0 (GraphPAD; San Diego, CA) verwendet. Daten aus den Sättigungs- (Kap. 2.4.2.1) und Kompetitionsbindungsassays (Kap. 2.4.2.2) zur Kalkulation der K_d-Werte wurden mit dem Programm KELL für Windows 6.0 (BIOSOFT, Cambridge, UK) angepaßt.

Alle berechneten Daten sind Durchschnittswerte \pm SD bzw. SEM von n Experimenten.

