

# **Isolierung und Charakterisierung der Hämorphine VV-H-7 und LVV-H-7 als endogene Liganden des humanen G- Protein gekoppelten Bombesin Rezeptors Subtyp 3**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation  
von  
Dipl. Biol. Hans-Peter Lammerich

geb. am 29. Januar 1973 in Köln/Porz

Referent: Prof. Dr. Werner Müller

Koreferent: Prof. Dr. Bernd Otto

Tag der Promotion: 15. November 2001

Datum der Veröffentlichung: 27. November 2001

*Meinen Eltern*

**Zusammenfassung:** Mit Hilfe eines fluoreszenzbasierten Kalziumassays (FLIPR-Assay) wurden die Hämorphine VV-H-7 und LVV-H-7 als endogene Liganden für den Orphan-G-Protein gekoppelten Rezeptor hBRS-3 aus einer humanen Plazentapeptidbank identifiziert und charakterisiert. VV-H-7 und LVV-H-7 induzieren eine konzentrationsabhängige intrazelluläre Kalziumfreisetzung mit  $EC_{50}$ -Werten für VV-H-7 bzw. LVV-H-7 von  $45 \pm 15 \mu\text{M}$  bzw.  $183 \pm 60 \mu\text{M}$  auf transfizierten CHO- $G\alpha_{16}$ -hBRS-3 Zellen. Bei weiteren Untersuchungen mit kleinzelligen Lungenkarzinomzellen (NCI-N417), die den hBRS-3 exprimieren, wurden mit  $19 \pm 6 \mu\text{M}$  bzw.  $38 \pm 18 \mu\text{M}$  für VV-H-7 bzw. LVV-H-7 niedrigere  $EC_{50}$ -Werte gemessen. Bei den Untersuchungen mit anderen Bombesin-Rezeptorsubtypen (GRP-R und NMB-R) exprimierenden Zellen zeigte sich, dass die isolierten Liganden an den BRS-3 binden. Somit konnte ein spezifischer Ligand isoliert werden, der diesen Rezeptorsubtyp bindet.

Darüberhinaus wurde die durch die isolierten Liganden aktivierte Signaltransduktion untersucht. Es konnte eine Beteiligung der Phospholipase C,  $\text{InsP}_3$ -abhängigen Kalziumspeichern und der Proteinkinase C an der Signaltransduktion gezeigt werden. Das Maximum des durch die isolierten Liganden ausgelöste Kalziumsignal zeigte eine Abhängigkeit von der extrazellulären Kalziumkonzentration.

Eine Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase  $p125^{\text{FAK}}$ , die von Ryan *et al.* (1998) beschrieben wurde, konnte nicht bestätigt werden.

Bei Untersuchungen zur Aktivierung der MAP-Kinase p42/p44 zeigte sich, dass die BRS-3-Liganden eine Phosphorylierung induzieren. Somit wurde eine Aktivierung der MAP-Kinase durch Liganden für den BRS-3-Rezeptor in nicht transfizierten humanen Zellen gezeigt. Eine mitogene Wirkung von VV-H-7 oder dem synthetischen Bombesinanalogue  $[\text{D-Phe}^6, -\beta\text{-Ala}^{11}, -\text{Phe}^{13}, -\text{Nle}^{14}]$  Bombesin(6-14) auf NCI-N417 Zellen konnte nicht nachgewiesen werden.

**Schlagerworte:** Bombesin Rezeptor Subtyp 3, Hämorphine, Signaltransduktion

## **Abstract**

Using a fluorescence-based calcium assay (FLIPR™), the hemorphins VV-H-7 and LVV-H-7 were isolated and characterized from a human placenta peptide bank as endogenous ligands for the orphan G-protein coupled receptor BRS-3. The peptides VV-H-7 and LVV-H-7 induced a concentration-dependent intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release with  $EC_{50}$ -values for VV-H-7 and LVV-H-7 of  $45 \pm 15 \mu\text{M}$  and  $183 \pm 60 \mu\text{M}$ , respectively, on transfected CHO- $G\alpha_{16}$ -hBRS-3 cells. The experiments with small cell lung cancer cells (NCI-N417) naturally expressing hBRS-3 resulted in  $EC_{50}$  values for VV-H-7 and LVV-H-7 of  $19 \pm 6 \mu\text{M}$  and  $38 \pm 18 \mu\text{M}$ , respectively. Cell lines expressing other bombesin receptor subtypes (GRP-R or NMB-R) did not bind the isolated hemorphins. This is the first time that two specific ligands for hBRS-3 were isolated from a biological source. Furthermore, the signal transduction cascade was

investigated. It was shown that, after application of VV-H-7, phospholipase C, InsP<sub>3</sub>-dependent calcium stores, and protein kinase C were activated. Activation of p125<sup>FAK</sup> was not observed. The maximum of the calcium signal was also dependent on the extracellular calcium concentration.

An activation of the MAP kinase p42/p44 through activation of the hBRS-3 receptor was shown for the first time in non-transfected cells. However, neither the isolated ligands nor the synthetic bombesin analog [D-Phe<sup>6</sup>,-β-Ala<sup>11</sup>,-Phe<sup>13</sup>,-Nle<sup>14</sup>] bombesin(6-14) did show mitogenic activity on NCI-N417 cells.

*Key words:* bombesin receptor subtype 3, hemorphins, signal transduction

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>11</b>
1.1	G-PROTEIN GEKOPPELTE REZEPTOREN (GPCR)	11
1.2	GRUPPIERUNG DER REZEPTORFAMILIEN	12
1.3	SIGNALTRANSDUKTION UND REGULATION DER GPCRS	14
1.4	ORPHAN GPCRS	17
1.4.1	<i>bisher identifizierte oGPCRs</i>	18
1.5	DER ORPHAN REZEPTOR BOMBESIN REZEPTOR SUBTYP 3 (BRS-3)	20
1.5.1	<i>Pharmakologie des BRS-3</i>	23
1.5.2	<i>Physiologische Bedeutung des BRS-3</i>	25
1.6	HÄMOFILTRAT- UND GEWEBEPEPTIDBANKEN ALS QUELLE BIOLOGISCH AKTIVER PEPTIDE	27
1.7	AUFGABENSTELLUNG	28
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>29</b>
2.1	PRÄPARATION DER PEPTIDBÄNKE	29
2.2	PRÄPARATION DER HUMANEN PLAZENTA-PEPTIDBANK	29
2.2.1	<i>Präparation des Rohextraktes</i>	29
2.2.2	<i>Präparative Chromatographie zur Herstellung der human Plazenta-Peptidbank</i>	30
2.2.2.1	pH-Stufenelution	30
2.2.2.2	Präparative „Reversed-Phase“ (RP)-Chromatographie zur Erstellung der Plazentapeptidbank	30
2.3	ISOLIERUNG DER LIGANDEN FÜR DEN hBRS-3 AUS HUMANER PLAZENTA	31
2.3.1	<i>Präparative RP-Chromatographie</i>	31
2.3.2	<i>Semipräparative Chromatographie</i>	32
2.3.3	<i>Analytische Chromatographie</i>	33
2.4	ANALYTISCHE METHODEN	33
2.4.1	<i>Massenspektrometrische Methoden</i>	33
2.4.1.1	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight (MALDI-TOF) Massenspektrometrie	33
2.4.1.2	Elektrospray-Ionenfallen-Massenspektrometer (LCQ)	34
2.4.2	<i>Peptidanalyse und Sequenzierung</i>	34
2.4.2.1	Kapillarzonenelktrophorese (CZE)	34
2.4.2.2	Sequenzierung der Peptide	35
2.4.3	<i>Resynthese der identifizierten Peptide</i>	35
2.5	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	36
2.5.1	<i>Molekularbiologischen Standardmethoden</i>	36
2.5.1.1	Verwendete Oligonukleotide	36
2.5.1.2	Sterilisation von Lösungen und Materialien	36
2.5.1.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	37
2.5.1.4	Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren	37
2.5.2	<i>Expressionsanalyse des transfizierten hBRS-3</i>	38
2.5.2.1	RNA-Extraktion	38
2.5.2.2	Northern Blot-Analyse	39

2.5.2.3	Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR).....	41
2.5.2.4	Herstellung von cDNA (Erststrangsynthese).....	41
2.5.2.5	Amplifikation der cDNA .....	41
2.5.3	<i>Stabile Transfektion von Zellen</i> .....	43
2.6	KULTIVIERUNG EUKARYOTISCHER ZELLEN.....	45
2.6.1	<i>Verwendete Zelllinien und Kulturmedien</i> .....	46
2.7	BIOASSAYS .....	47
2.7.1	<i>Intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Messungen</i> .....	47
2.7.1.1	Verifizierung der biologischen Aktivität (hydrolytische Spaltung durch Subtilisin; Konzentrationsabhängigkeit) .....	48
2.7.1.2	Pharmakologische Untersuchungen mit Modulatoren der Signaltransduktion .....	49
2.7.2	<i>Proliferationsassay (WST-1)</i> .....	50
2.8	IMMUNOWESTERNBLOT ZUR AUFKLÄRUNG DER SIGNALTRANSDUKTION .....	51
2.8.1	<i>Probenvorbereitung</i> .....	51
2.8.2	<i>Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i> .....	52
2.8.3	<i>Western-Immunoblot-Analyse</i> .....	52
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>56</b>
3.1	ETABLIERUNG DER HBRS-3 ÜBEREXPRIMIERENDEN CHO-ZELLEN .....	56
3.1.1	<i>Northern Blot Analyse zur mRNA-Expression des hBRS-3</i> .....	56
3.2	AUFREINIGUNG UND IDENTIFIZIERUNG PEPTIDERGER LIGANDEN FÜR DEN ORPHAN-REZEPTOR HBRS-3 .....	59
3.2.1	<i>Primäres Screening mit etablierten Peptidbanken</i> .....	59
3.2.1.1	Primäres Screening der Hämofiltrat-Peptidbank (HFPB) .....	59
3.2.1.2	Primäres Screening der Schweinegehirn-Peptidbank (pBPB) .....	60
3.2.1.3	Primärscreening der humanen Plazenta-Peptidbank (hPPB) .....	60
3.2.1.4	Verifizierung der biologischen Aktivität.....	62
3.3	ISOLIERUNG DER LIGANDEN DES HBRS-3 .....	63
3.3.1	<i>Isolierungsschritt 1</i> .....	63
3.3.2	<i>Isolierungsschritt 2</i> .....	64
3.3.3	<i>Isolierungsschritt 3</i> .....	65
3.3.4	<i>Isolierungsschritt 4</i> .....	66
3.4	IDENTIFIZIERUNG DES BIOLOGISCH AKTIVEN, PEPTIDERGEN LIGANDEN .....	67
3.4.1.1	Bestätigung der biologischen Aktivität durch resynthetisierte Peptide .....	69
3.5	PHARMAKOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DES REZEPTORS IM FLIPR-ASSAY .....	70
3.5.1	<i>Pharmakologische und physiologische Untersuchungen der Rezeptor-Liganden Beziehung</i> .....	70
3.5.1.1	Charakterisierung des hBRS-3 Rezeptors auf NCI- N417 Zellen.....	70
3.5.1.2	Vergleich der biologischen Wirkung zwischen den isolierten Hämorphinen und bekannten endogenen Liganden.....	73
3.5.2	<i>Aufklärung der Struktur-Funktions-Beziehung</i> .....	74
3.6	FUNKTIONELLE ANALYSE DER ISOLIERTEN LIGANDEN .....	76
3.6.1	<i>Proliferationsassay (WST-1)</i> .....	76

3.6.2	<i>Pharmakologische Untersuchungen mit Modulatoren der Signaltransduktion</i> .....	78
3.6.2.1	Charakterisierung des induzierten Ca <sup>2+</sup> -Signals in Abhängigkeit von der extrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Konzentration .....	78
3.6.2.2	Pharmakologische Untersuchungen der Signaltransduktion .....	80
3.6.3	<i>Aktivierung intrazellulärer Kinasen nach Ligandenbindung</i> .....	82
3.6.3.1	Cytosolische fokale Adhäsionskinase (p125 <sup>FAK</sup> ) .....	82
3.6.3.2	MAP-Kinase .....	84
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>85</b>
4.1	SPEZIFITÄT DES SCREENINGSYSTEMS .....	85
4.2	IDENTIFIZIERUNG VON VV-HÄMORPHIN-7 UND LVV-HÄMORPHIN-7 ALS ENDOGENE LIGANDEN DES HBRS-3.....	87
4.3	LIGANDEN-REZEPTOR-STUDIEN .....	88
4.4	STRUKTUR-FUNKTIONSBEZIEHUNG DER HÄMORPHINE UND ANDERER, STRUKTURVERWANDTER PEPTIDE ALS LIGAND FÜR DEN HBRS-3 .....	90
4.5	BIOLOGISCHE EFFEKTE VON VV-H-7 UND LVV-H-7 .....	91
4.5.1	<i>Signaltransduktion</i> .....	91
4.5.2	<i>Aktivierung der MAP-Kinase</i> .....	93
4.5.3	<i>Bisher bekannte biologische Funktionen der Hämorphine</i> .....	95
4.6	AUSBlick.....	96
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>98</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	„American Type Culture Collection“
Bomb9er	[D <sup>6</sup> Phe <sup>6</sup> ,β-Ala <sup>11</sup> ,Phe <sup>13</sup> ,Nle <sup>14</sup> ] Bombesin(6-14) Bombesinanalogue
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA, die bei der reversen Transkription von RNA
CMV	Cytomegalievirus
CSPD	Dinatrium 3-(4-methoxyspiro(1,2-dioxiethan-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3,3.1.1 <sup>3,7</sup> ] decan)-4-yl) Phenylphosphat
Da	Dalton
ddH <sub>2</sub> O	Aqua bidestillata
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„Desoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-nucleosid-triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EC <sub>50</sub>	halbmaximale effektive Konzentration
EDT	Ethandithiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	Fötale Kälberserum
FLIPR™	Fluometric Imaging Plate Reader System
Fmoc	9-Fluorenyl-methoxycarbonyl
g	Erdbeschleunigung
GDP	Guanidindiphosphat
GPCR	G-protein coupled Receptor (G-Protein gekoppelter Rezeptor)
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptor Kinasen
GRP	„Gastrin releasing peptide“
hBRS-3	humaner Bombesin Rezeptor Subtyp 3
HFPB	humane Hämofiltratpeptidbank
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol

HPLC	„high performance liquid chromatography“ (Hochleistungsflüssig-chromatographie)
HRP	„Horse-Radish-Peroxidase“, Meerrettich-Peroxidase
IC <sub>50</sub>	halbmaximale inhibitorische Konzentration
InsP <sub>3</sub>	Inositol (1,4,5)-Trisphosphat
J	Joule
kb	Kilobase/n
LVV-H-7	LVV-Hämorphin-7
MALDI-TOF	„Matrix-assisted-laser-desorption ionisation - time of flight“
MAPK	Mitogen aktivierte Protein-Kinase
MCH	„Melanin-concentrating hormone“
MTBE	Methylteriärbutylmethylether
NMB	Neuromedin B
NMP	N-Methyl-2-Pyrrolidin-on
OD	Optische Dichte
oGPCR	orphan G-protein coupled Receptor
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	„Phosphate Buffered Saline“
PCR	„Polymerase Chain Reaction“ (Polymerasekettenreaktion)
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PPB	Plazentapeptidbank
PPBÄ	Plazentapeptidbankäqui valent
RAMP	„receptor activity modifying proteins“ (Rezeptoraktivität-modulierendes Protein)
RNA	„Ribonucleic acid“ (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
SCLC	„small cell lung cancer“ (kleinzelliger Lungentumor)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	„Standard Saline Citrate“
TBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,1,3,3-tetramethyl-uronium-tetrafluoroborat
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
ün	über Nacht
UV	Ultraviolett
VV-H-7	VV-Hämorphin-7

# 1 Einleitung

## 1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR)

Die Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) setzt sich zusammen aus integralen Membranproteinen, die als Zelloberflächenrezeptoren für die Übertragung extrazellulärer Signale in das Zellinnere verantwortlich sind. Namensgebend, und eines der wichtigsten Merkmale dieser Gruppe ist die Initiierung einer G-Protein abhängigen Signalkaskade nach Ligandenbindung. Mit ca. 1000 Genen, die GPCRs codieren, repräsentieren sie eine der größten Proteinfamilien in eukaryotischen Zellen (Strader *et al.*, 1994). Die Struktur der GPCRs ähnelt denen des Bacteriorhodopsins (Henderson und Schertler, 1990) und sie teilen verschiedene strukturelle Merkmale. Dazu gehören sieben  $\alpha$ -helikale Transmembrandomänen (Attwood und Findlay, 1994), die von 20 – 30 Aminosäuren gebildet werden. Die Transmembrandomänen werden durch drei extra- und drei intrazelluläre Domänen miteinander verbunden. Die kürzlich durchgeführte Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse von Rhodopsin bestätigte die angenommene Struktur von sieben dicht gepackten Transmembranhelices (Palczewski *et al.*, 2000).

Zu den natürlichen Liganden der GPCRs zählen biogene Amine, Peptide und Proteine, Lipide, Eicosanoide, Purine und Nukleotide, exzitatorische Aminosäuren und Ionen (Flower, 1999). Darüber hinaus reagieren die Rezeptoren auf spezielle Stimuli wie Licht, Geschmack und Geruch.

Obwohl die GPCRs unterschiedlichste Liganden binden, ist ihre Struktur erstaunlich ähnlich. Bei dem Großteil der G-Protein gekoppelten Rezeptoren ist die N-terminale Sequenz extrazellulär und der C-Terminus intrazellulär lokalisiert. Die Transmembrandomänen der Rezeptoren stellen die Kerndomäne dar.

Im N-terminalen Bereich fast aller GPCRs sind Konsensus-Sequenzen (Asn-Xaa-Ser/Thr) für eine N-Glykosylierung lokalisiert. Für einige Rezeptoren lässt sich diese Annahme durch Behandlung des Proteins mit einer N-Endoglycosidase bestätigen (Stiles *et al.*, 1984). Bei den meisten GPCRs sind zwei konservierte Cysteinreste (je einer in der ersten extrazellulären Schleife und einer in der zweiten) zu finden, die eine Disulfidbrücke bilden. Wahrscheinlich wird dadurch die Packung und eine begrenzte Konformationen der sieben Transmembranhelices beeinflusst, die für die Ligandenbindung essentiell ist.

Im C-terminalen Sequenzabschnitt besitzen GPCRs eine posttranslationale Modifikation in Form einer Palmitoylierung. Die Palmitoylierung erfolgt an einem Cysteinrest und dient möglicherweise zur Membranverankerung des C-Terminus. Durch zielgerichtete Mutagenese von Cysteinen in diesem Sequenzabschnitt wurde bei  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren eine Entkopplung von den assoziierten G-Proteinen beobachtet (O'Dowd *et al.*, 1989).

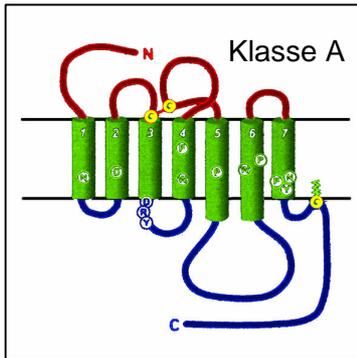
Mutationen in GPCR-Genen führen zu einer Reihe von Krankheiten. Beschrieben sind z.B. für das Rhodopsin Mutationen, die zu Retinitis pigmentosa (Drya und Li, 1995) führen, Mutationen im V<sub>2</sub> Vasopressinrezeptor führen zu X-chromosomal gekoppeltem nephrogenen Diabetes insipidus (Pan *et al.*, 1992) und Zwergwuchs wird durch Mutationen im Growth-hormone releasing hormone-Rezeptor (Wajnrach *et al.*, 1996) hervorgerufen.

## **1.2 Gruppierung der Rezeptorfamilien**

GPCRs werden aufgrund ihrer Aminosäuresequenz in sechs Klassen eingeordnet (Probst *et al.*, 1992). Die umfangreichste Klasse, die Klasse A, umfasst die Rhodopsin ähnlichen Rezeptoren und ist unterteilt in die Gruppen I - XV. In der Gruppe II der Klasse A sind die Rezeptoren für peptiderge Liganden zusammengefasst.

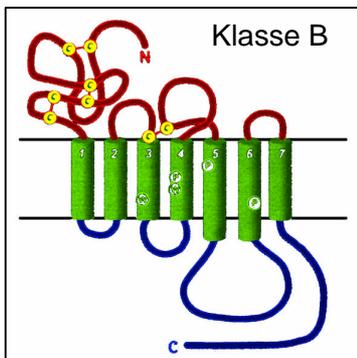
Die Klasse B ist die zweitgrößte Klasse mit 14 verschiedenen Gruppen. In dieser Klasse sind die Sekretin ähnlichen Rezeptoren zusammengefasst.

Zur Klasse C der GPCRs zählen fünf Gruppen, die mit metabotropen Glutamatrezeptoren verwandt sind. In der Klasse D sind die Pheromonrezeptoren von Hefen enthalten. Die Familie E enthält cAMP-Rezeptoren, deren Expression bisher nur in dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* nachgewiesen ist. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte noch keine Expression in Vertebraten nachgewiesen werden. Die Klasse 5 umfasst „frizzled“ und „smoothend“ Rezeptoren, die eine Rolle in der Embryonalentwicklung und Segmentierung spielen. Abbildung 1 zeigt die Einteilung der Rezeptoren in die Familien der GPCRs.



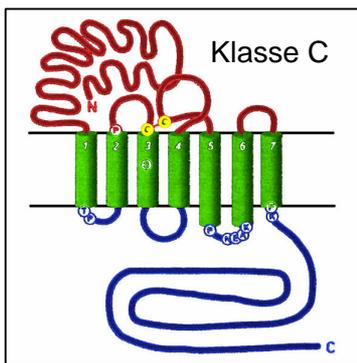
**Rhodopsin ähnliche Rezeptoren**

- I Amine
- II Peptide
- III Protein hormone
- IV Rhodopsin
- V Geruchsrezeptoren
- VI Prostanoid
- VII Nucleotid ähnliche
- VIII Cannabis
- IX Platelet activating Factor
- X Gonadotropin releasing Hormon
- XI Thyreotropin releasing Hormon
- XII Melatonin
- XIII virale Rezeptoren
- XIV Lysosphingolipid und Lysophosphatidsäure
- XV Klasse A Orphanrezeptoren (u.a. BRS-3)



**Secretin ähnliche Rezeptoren**

- I Calcitonin
- II Corticotropin releasing Faktor
- III Gastric inhibitory Peptide (GIP)
- IV Glucagon
- V Growth hormone releasing hormone
- VI Parathyroid Hormon
- VII PACAP
- VIII Secretin
- IX Vasoaktives intestinales Peptid
- X diuretische Hormone
- XI Egf-Modul enthaltender Mucin ähnlicher Rezeptor 1
- XII Latrotoxin
- XIII Gehirn spezifischer Angiogenese-Inhibitor (BAI)
- XIV Klasse B Orphanrezeptoren



### Metabotrophe Glutamat- und Pheromonrezeptoren

- I Metabotrophe Glutamatrezeptoren
- II Kalzium-Rezeptoren
- III putative Pheromonrezeptoren
- IV GABA-B Rezeptoren
- V Orphan GPCR 5

### Klasse D fungale Pheromonrezeptoren

- I fungales Pheromon STE-2 ähnlich
- II fungales Pheromon STE-3 ähnlich

### Klasse E cAMP Rezeptoren (*Dictyostelium*)

### Frizzled / Smoothened Familie

#### Abbildung 1: Darstellung der Familien der GPCRs

Die Einteilung in GPCR-Klassen und Untergruppen nach Horn et al. (1998)

#### 1.3 Signaltransduktion und Regulation der GPCRs

Einer der am besten untersuchten Rezeptoren ist das Rhodopsin, bei dem die Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse gelang. Es bindet untypisch für die meisten GPCRs seinen Liganden (Retinal) kovalent. Nach Photoaktivierung ändert sich die Konformation des Retinals von der 11-*cis* zur all-*trans*-Konformation. Diese Konformationsänderung aktiviert den Rezeptor, d.h. es kommt zu einer Umlagerung der umgebenden Helices, die zu einer Komplexbildung mit einem heterotrimeren G-Protein führt (Palczewski *et al.*, 2000). Die Konformationsänderung der Helices mit nachfolgender Komplexbildung und Aktivierung des G-Proteins wird auch für andere GPCRs angenommen.

Diejenigen G-Proteine, welche von den GPCRs aktiviert werden, bestehen aus der  $\alpha$ -Untereinheit, die die Guaninnukleotidbindungstelle trägt und der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit, die ein festverbundenes Dimer bilden. Bisher sind 20  $\alpha$ -, 6  $\beta$ - und 12  $\gamma$ -Genprodukte bekannt (Hamm, 1998).

Inaktive G-Proteine sind Heterotrimere, die aus der GDP-tragenden  $\alpha$ -Untereinheit bestehen, und mit dem  $\beta\gamma$ -Dimer assoziiert sind. Aktivierte GPCRs dienen als GDP/GTP-Austauscher und fördern somit die Abspaltung von GDP und die Bindung von GTP an die  $\alpha$ -Untereinheit,

was wiederum zur Dissoziation der  $\alpha$ -Untereinheit und des  $\beta\gamma$ -Dimers führt. Wesentlich ist, dass die  $G\alpha$ -Untereinheit das GTP zu GDP hydrolysiert und mit der  $G\beta\gamma$ -Untereinheit reassoziert, um wieder das inaktive heterotrimere G-Protein zu bilden.

Man kann die G-Proteine aufgrund der  $G\alpha$ -Untereinheit in vier verschiedene Klassen einteilen:  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$  und  $G_{12}$ . Die wichtigsten Effektoren, die durch die  $G\alpha$ -Untereinheit reguliert werden, sind Adenylatzyklasen und Phospholipasen. Auf die ebenfalls wichtigen cGMPspezifischen Phosphodiesterasen und Ionen-Kanäle wird im weiteren Verlauf nicht eingegangen. Die Mitglieder der  $G_{12}$ -Unterfamilie  $G\alpha_{12}$  und  $G\alpha_{13}$  sind an regulatorische Moleküle wie p115 (ein Guaninnukleotidaustauschfaktor p115 RhoGEF) (Kozasa *et al.*, 1998) RasGAP1 (GTPase-aktivierendes Protein) und Bruton's-Tyrosin-Kinase (Jiang *et al.*, 1998) als direkte Effektoren gekoppelt.

Die Adenylatzyklase als Effektor, der durch GPCRs aktiviert wird, katalysiert die Bildung von 3'-5'-zyklischem AMP (cAMP) aus ATP. Das cAMP ist ein weitverbreitetes Signalmolekül, das primär über die Aktivierung von Proteinkinasen wirkt. Der Synthese steht der Abbau und Inaktivierung durch Phosphodiesterasen gegenüber.

Eine weitere große Klasse von Effektormolekülen, die durch GPCRs aktiviert werden, sind die Phospholipasen des Typs C. Phospholipasen sind Enzyme, die Phospholipide spalten. Anhand der Spezifität des Angriffspunktes am Phospholipid werden Phospholipasen des Typs A1, A2, C und D unterschieden. Von besonderer regulatorischer Bedeutung ist die Spaltung von Inosit-haltigen Phospholipiden durch die Phospholipase C. Die Phospholipase C katalysiert die Freisetzung von Diacylglycerol und Inositol-1,4,5-trisphosphat aus Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat. Damit kommt der Phospholipase C eine Schlüsselfunktion in der Bildung der intrazellulären Botenstoffe Diacylglycerol, Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $\text{InsP}_3$ ) und  $\text{Ca}^{2+}$  zu. Es gibt mehrere Typen der Phospholipase C. Die wichtigsten sind die des Typs  $C\beta$  ( $\text{PLC}\beta$ ) und  $C\gamma$  ( $\text{PLC}\gamma$ ). Die  $\text{PLC}\beta$  wird durch  $G\alpha_q$ -Proteine aktiviert, die  $\text{PLC}\gamma$  durch Rezeptor-Tyrosinkinasen. Als Heterodimer üben die  $G\beta$ - und  $G\gamma$ -Untereinheit ebenfalls eine regulierende Funktion auf Phospholipasen aus (van Biesen *et al.*, 1995).

Durch die Bildung von  $\text{InsP}_3$  durch die  $\text{PLC}\beta$  kommt es zu einer Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern des endoplasmatischen Reticulums mit Hilfe von  $\text{InsP}_3$ -abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen. Die freigesetzten Kalzium-Ionen binden u.a. an die Proteinkinase C, die auch durch Diacylglycerol aktiviert werden kann. Die Proteinkinase C kann ihrerseits Substratmoleküle phosphorylieren. Zu diesen Molekülen zählen der Epidermal Growth Factor-Rezeptor, der Inhibitor I $\kappa$ B des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B sowie das Protein Ras und Ionenkanäle.

Ras-Proteine sind regulatorische GTPasen, die in einer inaktiven GDP-Form und in einer aktiven GTP-Form vorliegen. In seiner aktiven Form kann das Ras-Protein die Raf-Kinase

aktivieren, wobei der weitere Signalübertragungsweg in die Proteinkinase-Kaskade des mitogen-aktivierten Protein-Kinase-(MAPK)-Weges führt. MAP-Kinasen werden auch als extrazellulär regulierte Kinasen (= ERK) bezeichnet. Der ERK ist eine weitere Proteinkinase, die MAP/ERK-Kinase (MEK), vorgeschaltet.

Die zentrale Funktion der MAP-Kinasewege besteht in der Aktivierung der Genexpression. Die Aktivierung wird über die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren vermittelt. Beispielsweise wird der Transkriptionsfaktor Elk-1 durch ERK positiv reguliert. Zu den Genen, die von Elk-1 reguliert werden, gehören die Gene für die Transkriptionsfaktoren c-fos und c-jun (Hipskind *et al.*, 1991).

Da G-Protein gekoppelte Rezeptoren wichtige Vorgänge steuern, existieren Mechanismen, die Länge und Stärke des GPCR-Signals regulieren. In vielen Fällen ist eine zeitabhängige Abnahme zellulärer Reaktionen auf extrazelluläre Signale, auch in Gegenwart von Agonisten, zu beobachten. Die Abschwächung des Signals ist bekannt als Desensitivierung (Lefkowitz, 1993). Die Desensitivierung kann auf der Ebene der Rezeptoren und der G-Proteine stattfinden. Auf der Ebene der Rezeptoren erfolgt sie durch Phosphorylierung. Die intrazellulären Domänen der Rezeptoren sind reich an Serin- und Threoninresten und befinden sich in Konsensus-Sequenzen, die typisch für Phosphorylierungen sind.

Die Phosphorylierung erfolgt durch G-Protein gekoppelte Rezeptor Kinasen (GRK). Die GRKs bilden eine Familie von sechs Serin/Threonin-Proteinkinasen, die nur Rezeptoren phosphorylieren, die einen Agonisten gebunden haben (Premont *et al.* 1995). In Anlehnung an das gängige Modell für Rhodopsin- oder  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptordesensitivierung interagieren durch GRKs phosphorylierte Rezeptoren mit Arrestin oder Arrestin-ähnlichen Proteinen und verhindern eine weitere Kopplung an G-Proteine (Dohlman *et al.* 1991, Premont *et al.* 1995). Außerdem ermöglicht die Bindung von Arrestin die Ausbildung von „Coated Pits“ und eine Internalisierung des Rezeptors. Nach der Internalisierung erfolgt der Transport des Rezeptors in Endosomen, wo durch eine pH-Änderung der Ligand vom Rezeptor dissoziiert. Der Ligand wird im Lysosom abgebaut und der Rezeptor entweder zurück an die Zelloberfläche transportiert oder ebenfalls im Lysosom abgebaut. Zusätzlich gibt es Literaturhinweise, die einen  $\beta$ -Arrestin und Clathrin-unabhängigen Weg der Rezeptorendocytose postulieren (Zhang *et al.*, 1996, Menard, 1997).

Rezeptor(homo- oder hetero)-dimerisierung kann ebenfalls die pharmakologische Spezifität bestimmen und stellt somit einen weiteren Regulationsmechanismus dar. Zum Beispiel bilden Opioidrezeptoren ( $\kappa$  und  $\delta$ -Typ) ein Heterodimer, das andere Affinitäten zu Liganden aufweist als die jeweiligen Rezeptoren alleine (Jordan und Devi, 1999). Sogar die Kopplung zwischen einem GPCR und einem Liganden-gesteuerten Ionenkanal wird beschrieben (Liu *et al.*, 2000).

Auf der Ebene der G-Proteine beschreiben Berman und Gilman (1998) die Desensitivierung durch RGS-Proteine (regulators of G-protein signaling). Die RGS-Proteine beschleunigen die Hydrolyse des an der G $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins gebundenen GTP und führen zu einer Deaktivierung von G-Proteinen.

Eine weitere Möglichkeit der Regulation von GPCRs wurde kürzlich von McLatchie *et al.* (1998) entdeckt. Bestimmte GPCRs aus der Familie C der GPCRs, wie z. B. der Calcitoninrezeptor-ähnliche Rezeptor, können mit Proteinen, die eine Transmembrandomäne aufweisen, interagieren. Diese Proteine werden „receptor activity modifying proteins“ (RAMPs) genannt. Die Interaktion des Rezeptors mit einem bestimmten RAMP legt fest, wie der Rezeptor glycosyliert wird und welcher natürliche Ligand eine relevante Affinität für diesen GPCR besitzt.

#### **1.4 Orphan GPCRs**

Bis jetzt sind ca. 300 offene Leseraster in öffentlich zugänglichen Datenbanken identifiziert worden, die einen putativen GPCR kodieren. Von den 300 Genen werden 191 bekannte Rezeptoren, die von etwa 70 bekannten Liganden aktiviert werden, und 108 Orphan-GPCRs (oGPCR) codiert. Darin sind Geschmacks- und Geruchsrezeptoren, die etwa 1200 Rezeptoren ausmachen, nicht enthalten (Howard *et al.*, 2001). Orphan GPCRs teilen die Struktur motive mit anderen GPCRs, jedoch ist der (endogene) Ligand, der ihre Aktivität kontrolliert, nicht bekannt. Die Homologie der Aminosäuresequenz beträgt oft nicht mehr als 30 - 40 % zu bekannten GPCRs. Die oGPCRs repräsentieren eine wichtige Familie von Zielproteinen für die pharmazeutische Industrie, da mehr als 50% der vermarkten Medikamente als Agonisten oder Antagonisten von bekannten GPCRs dienen (Drews, 1996). Somit könnten die oGPCRs und ihre noch zu beschreibenden Liganden in Zukunft als Ziel für neue Therapeutika dienen.

In der klassischen Pharmakologie wird meist von einer funktionellen Aktivität ausgegangen und es wird ein Ligand gesucht, der für diese Aktivität verantwortlich ist. Mit funktionellen Untersuchungen wird versucht die biologische Funktion bzw. Pathophysiologie aufzuklären. Danach wird ein Rezeptor für den Liganden gesucht und über Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen Substanzen identifiziert, die ebenfalls an den Rezeptor binden. Anschließend werden diese Substanzen zur Medikamentenentwicklung in klinischen Studien untersucht.

In der „Reversen-Pharmakologie“ wird ausgehend von der Bioinformatik und molekulargenetischen Daten ein Rezeptor identifiziert, für den man einen Liganden sucht. Ist ein Ligand gefunden, wird die biologische Funktion aufgeklärt und aus dem Liganden ein Medikament entwickelt.

Um die Funktion von oGPCRs und deren therapeutischen Nutzen aufzuklären, ist es daher oft notwendig einen hochselektiven Liganden für einen oGPCR zu identifizieren. Dazu kann

man einen Agonisten eines Rezeptors gegen verwandte oGPCRs dieses Rezeptors testen. Weiterhin kann man das Expressionsmuster eines oGPCR und eines putativen Liganden bestimmen, um ein Gen mit einem pharmakologisch identifizierten Rezeptor in Verbindung zu bringen. Liganden können auch aus Gewebeextrakten isoliert werden, indem man einen funktionellen Assay zur Reinigung und Charakterisierung benutzt. Ferner kann man oGPCRs mit schon bekannten Liganden, die in kommerziell erhältlichen Substanzbibliotheken zusammengefasst sind, testen.

### 1.4.1 bisher identifizierte oGPCRs

Mit den vorher beschriebenen Ansätzen konnten in den letzten 13 Jahren über 25 Liganden für oGPCRs identifiziert werden. Es konnten sowohl unbekannte Liganden (z.B. Ghrelin) als auch bekannte Liganden (z.B. MCH) isoliert werden (siehe Tabelle 1)

**Tabelle 1: bisher identifizierte Liganden für oGPCRs (mod. nach Howard et al., 2001)**

Identifizierter Rezeptor	Entdeckungs Datum	Isolierung	Rezeptor-Familie	Funktion
5-HT <sub>1A</sub> (G-21)	1988	Homologie	Adrenozeptor (35%) <sup>b</sup>	Angst, Hypertension
Adenosin A <sub>1</sub> , A <sub>2A</sub> (RDC7, RDC8)	1990 – 1991	Homologie, cAMP-Assay	Adrenozeptor (24%)	Regulation der Thrombozytenfunktion, Angst
Nociceptin/Orphanin FQ (ORL1)	1995	Homologie, Peptid-isolierung, cAMP-Assay	Opioid (60%)	Schmerzregulation
Anaphylatoxin C3a	1996	Homologie, cAMP Assay	C5a Rezeptor (~37%)	Entzündung
Wachstumshormon secretagogue (Ghrelin Rezeptor)	1996 - 1999	Peptidisolierung Ca <sup>2+</sup> - Assay	Neurotensin (~30%)	Wachstum
Prolactin-releasing Peptid (hGR3/GRP10)	1998	Peptidisolierung, Arachidonsäure-Ausschüttung	NPY (35%)	Prolactin-ausschüttung
Calcitonin gene-related Peptid, Adrenomedullin, RAMPs	1996 – 1998	Homologie, cAMP-Assay	VIP/PACAP (29%)	Schmerz
Orexin/Hypocretin	1998	Peptidisolierung, Ca <sup>2+</sup>	Adrenozeptor	Energie-

(HPRAJ70), Orexin 1 und 2 Rezeptoren		Ausschüttung, subtraktives Klonen	(30%)	homöostase
Apelin (APJ)	1998	Homologie, Peptid-isolierung, Mikrophysiometrie	Angiotensin (35%)	HIV-Co-rezeptor
Thyrotropin-releasing Hormon (trh <sub>2</sub> )	1999	Homologie	TRH <sub>1</sub> (54%)	Nociception (?)
Cysteinyl leukotrienes: CysLT <sub>1</sub> (HMTMF81, HG55)	1999	Datenbanken, Ca <sup>2+</sup> -Assay	PAF, P2 (32%)	Asthma
CysLT <sub>2</sub> (HG57)	2000		CysLT <sub>1</sub> (38%)	
Motilin (GPR38)	1999	Homologie, Liganden-screening	GHS (52%)	Verdauungs-traktmotilität
Melanin-concentrating Hormon (GPR24, SLC-1)	1999	Homologie, Peptidisolierung, Ligandenscreening, Ca <sup>2+</sup> -Assay	Somatostatin (34%)	Fettleibigkeit, Energie-regulation
Urotensin II (GPR14, SENR)	1999	Homologie, Peptid isolierung, Ligandenscreening, Ca <sup>2+</sup> -Assay	Somatostatin, Opioid, Galanin (~25%)	Vaso-konstriktion
Sphingosine-1-phosphat: Edg1, edg3, edg5, edg8	1998 – 2000	Homologie, Bindung, Ca <sup>2+</sup> -Assay	Edg (~35–50%), CB <sub>1</sub> (~30%)	Entzündung, Apoptose
Lysophosphatidyl-säure: edg2, edg4, edg7	1999 – 2000	Homologie, Bindung, Ca <sup>2+</sup> -Assay	Edg (~35–50%), CB <sub>1</sub> (~30%)	Wundheilung
Allatostatin-ähnliches Peptid	1999	Homologie, Peptid-isolierung, Elektrophysiologie	Somatostatin, Galanin, Opioid (50–70%)	?
Histamine H <sub>3</sub> (GPCR97)	1999	Homologie, Bindung, cAMP-Assay	Adrenozeptor (α <sub>2</sub> ), Muskarinrezip.	CNS, Fettleibigkeit

			(M <sub>1</sub> ) (31%)	
CCR10, Eskine (GPR2)	2000	Homologie, Ca <sup>2+</sup> -Assay	CCR (~21%)	Lymphozyten- Migration
UDP-Glukose, (KIAA0001)	2000	Homologie, Isolierung, Hefefunktions- screening	Nucleotid- ähnlich, PAF, PAR (28–34%)	Gewebestress
Sphingosinphos- phorylcholin (OGR1)	2000	Homologiescreening, Ca <sup>2+</sup> -Assay	P2Y (30%)	Wundheilung
Neuromedin U (FM-3, FM-4, TGR-1)	2000	Homologie, Ca <sup>2+</sup> -Assay	Neurotensin, GHS (~30 %)	Fressverhalten
Neuropeptide FF (HG31, NPGPCR, AF119815, EP884387)	2000	Datenbanken, Screening, Ca <sup>2+</sup> -Assay	Orexin 2, Y <sub>2</sub> (32%)	Schmerz

Abkürzungen: CB1: Cannabinoid Typ 1 Rezeptor; CCR: CC Chemokinrezeptor; GHS: growth hormone secretagogue; HPRAJ70: Hypocretin (Orexin) 1 Rezeptor; NPGPCR: Neuropeptid G-Protein-gekoppelter Rezeptor; NPY: Neuropeptid Y; oGPCR: orphan G-Protein gekoppelter Rezeptor; OGR1: ovarian cancer G-Protein-gekoppelter Rezeptor 1; PAF: Platelet-activating Faktor; PAR: Protease-activated Rezeptor; PRL: Prolactin; RAMPs: Receptor activity modifying proteins; TRH: Thyrotropin-releasing Hormon; VIP/PACAP: vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylyl cyclase activating peptide.

b) Die Prozentzahl in Klammern gibt die Homologie auf Aminosäureebene des oGPCRs mit den aufgeführten Rezeptoren an

### 1.5 Der Orphan Rezeptor Bombesin Rezeptor Subtyp 3 (BRS-3)

Bombesin ist ein amidiertes Tetradecapeptid, dass aus den Hautsekreten des Frosches *Bombina bombina* (Anastasi *et al.*, 1971) isoliert wurde. Bis heute wurden über 10 Bombesin-ähnliche Peptide aus Amphibien isoliert und in drei Unterfamilien (Bombesin-, Ranatensin- und Phyllolitorin-Unterfamilie) eingeteilt. Die Einteilung erfolgt auf Grund der drei carboxyterminalen Aminosäuren. Bei Säugetieren sind zwei bombesin-ähnliche Peptide isoliert und charakterisiert worden, das Gastrin-releasing Peptid (GRP) aus der Bombesin-Subfamilie und das Neuromedin B (NMB) aus der Ranatensin-Subfamilie. Ein Peptid aus der Phyllolitorin-Subfamilie ist bei Säugetieren bis jetzt noch nicht gefunden worden.

Die Bombesin-ähnlichen Peptide in Säugern regulieren ein weites Spektrum biologischer Aktivitäten. Das GRP induziert die Sekretion gastrointestinaler Peptidhormone (McDonald *et al.*, 1978), kontrolliert verschiedene gastrointestinale Funktionen wie z.B. die Motilität

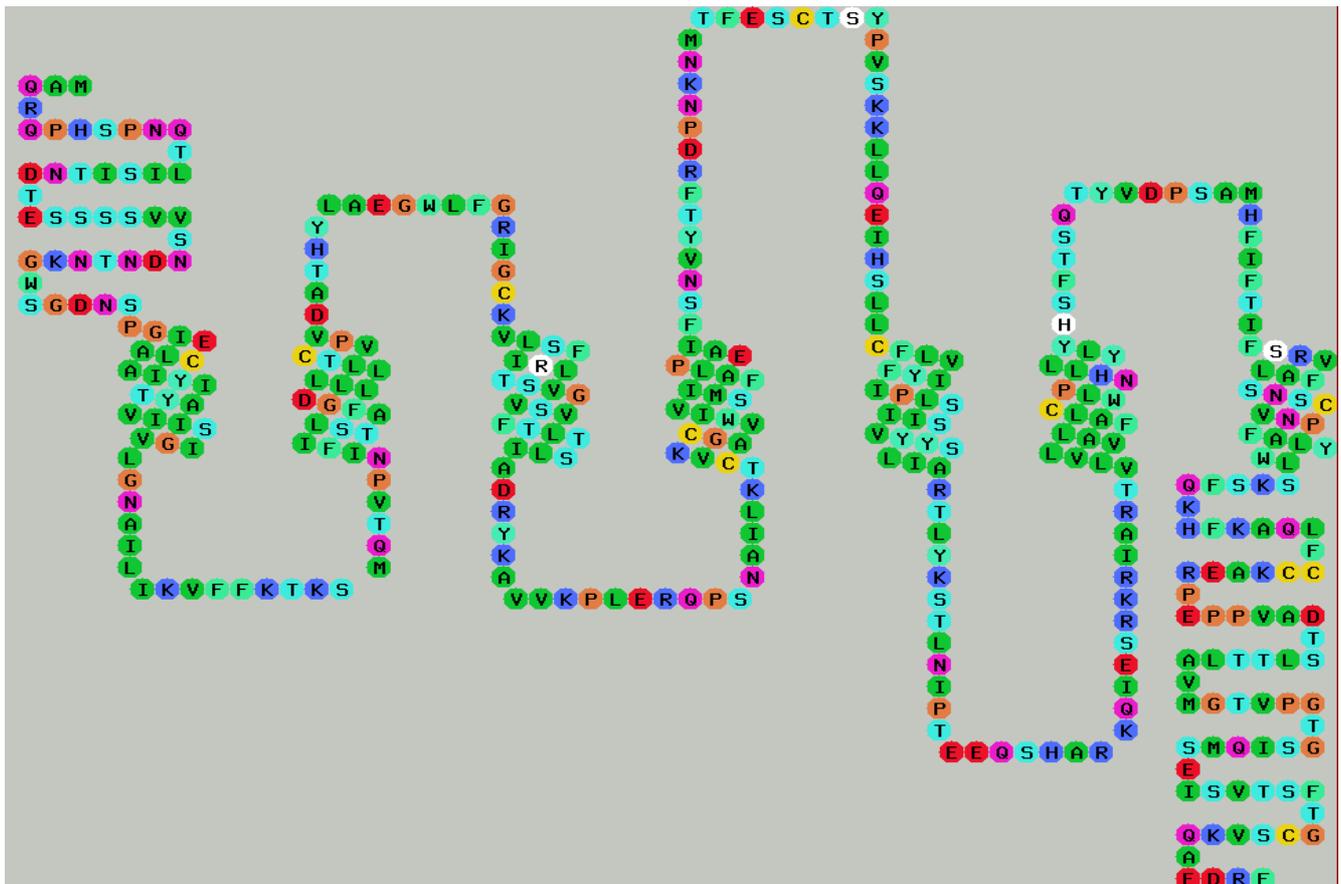
(Bertaccini und Impicciatore, 1975), und die Sekretion von Anionen (Kachur *et al.*, 1982). GRP ist außerdem ein Wachstumsfaktor für gastrointestinales Gewebe (Lehy *et al.*, 1983). GRP wird auch während der Entwicklung der Lunge exprimiert (Johnson *et al.*, 1982) und gilt als autokriner Wachstumsfaktor von kleinzelligen Lungentumor-Zelllinien (SCLC) (Cuttitta *et al.*, 1985). Die humane cDNS, die Neuromedin B codiert, wurde von Wada *et al.* (1991) isoliert, wobei NMB im zentralen Nervensystem und Gastrointestinaltrakt exprimiert wird. Es zeigt eine starke kontraktile Wirkung auf glatte Muskelzellen (Minamino *et al.*, 1983). SCLC-Zelllinien exprimieren NMB und den NMB-Rezeptor, so dass auch eine autokrine Wirkung auf diese Art von Lungentumoren angenommen wird (Corjay *et al.*, 1991).

Mit bekannten natürlichen und synthetischen Peptiden wurden vier verschiedene Bombesinrezeptor-Subtypen charakterisiert (Spindel *et al.*, 1990, Battey *et al.*, 1991, Wada *et al.* 1991, Corjay *et al.*, 1991, Fathi *et al.*, 1993, Nagalla *et al.*, 1995). Die vier Bombesinrezeptor-Subtypen sind der Bombesinrezeptor 1 (BB<sub>1</sub>) oder Neuromedin B-Rezeptor (NMB-R); der Bombesinrezeptor 2 (BB<sub>2</sub>) oder Gastrin-releasing peptide Rezeptor (GRP-R) und der Bombesinrezeptor Subtyp 3 (BRS-3). Das Gen des vierten Bombesinrezeptors (BB<sub>4</sub>) konnte bisher nur in Amphibien nachgewiesen werden.

Die erste Klonierung des BRS-3 gelang Gorbulev *et al.* (1992) aus dem Uterus von Meerschweinchen. Der klonierte Rezeptor weist 399 Aminosäuren auf und das Gen umfasst drei Exons und zwei Introns. Die Sequenzanalyse zeigt sowohl potentielle N-Glykosylierungsstellen als auch eine potentielle Phosphorylierungsstelle für die Proteinkinase C in der dritten intrazellulären Schleife. In der C-terminalen Region finden sich zwei Cysteinreste, die palmitoyliert werden können (Ovchinnikov *et al.*, 1988). Der Vergleich der Aminosäuresequenz zeigt 52 % Übereinstimmung des BRS-3 mit dem Maus-Gastrin-releasing-peptide-Rezeptor und 47 % Homologie zu dem Ratten-Neuromedin B-Rezeptor. Der von Fathi *et al.* (1993) klonierte humane BRS-3 (hBRS-3) umfasst ebenfalls 399 Aminosäuren, drei Exons und zwei Introns und ist, wie auch der GRP-Rezeptor (Giladi *et al.*, 1993), auf dem X-Chromosom lokalisiert. Der humane BRS-3 zeigt eine 86,5 %ige Aminosäuresequenzhomologie zu dem BRS-3 aus Meerschweinchen und zeigt die gleiche Verteilung der potentiellen N-Glykosylierungs- und Phosphorylierungsstellen. Zusätzlich konnten Phosphorylierungsstellen im C-Terminus identifiziert werden, die möglicherweise die Desensibilisierung des Rezeptors regulieren (Bouvier *et al.*, 1988, Hausdorff *et al.*, 1989). Die Expression des Rezeptors konnte im Hoden (sekundären Spermatozyten) und in verschiedenen Lungenkarzinomzelllinien, unabhängig vom histologischen Typ nachgewiesen werden (Fathi *et al.*, 1993). Darüber hinaus konnte eine Expression im Uterus von trächtigen Meerschweinchen (Gorbulev *et al.* 1992), im Gehirn der Maus (Hypothalamus) (Ohki-Hamazaki *et al.*, 1997a) und in humanen Brust- und epidermalen Krebszelllinien nachgewiesen werden (Gorbulev *et al.*, 1994).

Da der NMB-R, GRP-R und BB<sub>4</sub>-Rezeptor Affinitäten zu Bombesin im nanomolaren, der BRS-3 jedoch nur im mikromolaren Bereich aufweist, wurden von Akeson *et al.* (1997) am GRP-R und Sainz *et al.* (1998) am NMB-R Untersuchungen durchgeführt, die aufklären sollten, welche Aminosäuren die unterschiedliche Affinität zu Bombesin determinieren. Es wurde angenommen, dass die Aminosäuren, die für die hochaffine Bindung von Bombesin an den NMB-R, GRP-R und BB<sub>4</sub> konserviert sein müssen, sich von den entsprechenden Aminosäuren im BRS-3 unterscheiden. Neun Aminosäuren in den extrazellulären Schleifen oder in der äußeren Hälfte der Transmembranhelices erfüllen diese Voraussetzung. Durch zielgerichtete Mutagenese wurden Aminosäuren im BRS-3 gegen die entsprechenden Aminosäuren aus dem GRP-R ausgetauscht und die Affinität zum GRP bestimmt. Es stellte sich heraus, dass vier Aminosäuren für die Bindung von Bombesin, GRP und NMB entscheidend sind (Gln-121, Pro-199, Arg-288, Ala-308). Diese vier Aminosäuren bilden möglicherweise eine Tasche, die in der Mitte zwischen den Transmembranhelices III, VI, und VII an der Grenzfläche zwischen Membran und umgebender Lösung liegt. Werden die entsprechenden Aminosäuren (Arg-127-Gln, Ser-205-Pro, His-294-Arg und Ser-315-Ala) im BRS-3 verändert, steigt die Affinität zu Bombesin, GRP und NMB um das 100-fache. Ausgehend von diesen Ergebnissen wird angenommen, dass ein endogener Ligand für den BRS-3 sich in mindestens einer Aminosäure im C-Terminus von Bombesin, GRP und NMB unterscheiden muss, da sich die vier C-terminalen Aminosäuren dieser Peptide fast gleichen (GH(L/F)M-NH<sub>2</sub>).

Ein Strukturmodell des hBRS-3 ist in Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2:** Strukturmodell (Schlangenmodell) des hBRS-3

*In der Abbildung ist eine modellhafte Struktur des hBRS-3 dargestellt. Oben ist die extrazelluläre Seite des Rezeptors. Gut zu erkennen sind die sieben Transmembranhelices mit den drei extrazellulären und drei intrazellulären Schleifen*

### 1.5.1 Pharmakologie des BRS-3

Gorbulev *et al.* (1992) konnten zeigen, dass GRP und Neuromedin C (=GRP10) die Bindung von  $^{125}\text{I}$ -Bombesin mit einer halb-maximalen Inhibition von  $\text{IC}_{50} = 290$  bzw.  $320$  nM beeinflusst, wohingegen Neuromedin B eine bedeutend geringere Affinität besitzt ( $\text{IC}_{50} = 20$   $\mu\text{M}$ ). Eine funktionelle Charakterisierung des Rezeptors über Liganden-induzierte Chloridströme in transient-transfizierten *Xenopus*-Oocyten zeigt, dass Bombesin, GRP, NMB, und  $\text{Phe}^8$ -Phyllolitorin einen Chloridstrom erst bei  $10^{-5}\text{M}$  erzeugen. Andere Bombesin-ähnliche Peptide erzeugen auch bei noch höheren Konzentrationen kein biologisches Signal. Damit muss davon ausgegangen werden, dass keines der bekannten Bombesin-ähnlichen Peptide der endogene Ligand des humanen BRS-3 ist.

Zur besseren pharmakologischen Charakterisierung des Rezeptors wurden synthetische Liganden hergestellt. Wu *et al.* (1996) konnten durch chemische Modifikation von Bombesin

zu D-Phe<sup>6</sup>-Phe<sup>13</sup>-Bombesin(6-13)-propylamid den EC<sub>50</sub>-Wert von 1 µM bis auf 5 nM in Balb/3T3-Zellen, die mit dem BRS-3 transfiziert wurden, senken. Generell zeigten die natürlichen Peptide aus der Ranatensin-Klasse (carboxyterminales Ende: -His-Phe-Metamid) die größte Affinität zum BRS-3. Darüber hinaus wiesen die natürlichen Bombesin-ähnlichen Peptide in dem verwendeten Kalzium-Mobilisierungsassay bei 1 µM eine schwache biologische Aktivität auf (Wu *et al.*, 1996). Es wurden weitere synthetische Liganden für den BRS-3 entwickelt. Mantey *et al.* (1997) synthetisierte einen iodinierbaren hochaffinen Liganden (D-Tyr<sup>6</sup>, β-Ala<sup>11</sup>, Phe<sup>13</sup>, Nle<sup>14</sup>)Bn-(6-14) für den BRS-3. Bindungsstudien zeigten eine Affinität des Liganden von K<sub>D</sub> = 8,9 nM mit hBRS-3 transfizierten Balb 3T3-Zellen. Später konnte gezeigt werden, dass dieser Ligand eine hohe Affinität (K<sub>D</sub> = 1 - 8 nM) zu allen vier Bombesin-Rezeptorsubtypen besitzt (Pradhan *et al.*, 1998).

Einen für den hBRS-3 spezifischen Liganden konnte Mantey *et al.* (2001) synthetisieren. (D-Tyr<sup>6</sup>, (R)-Apa<sup>11</sup>, Phe<sup>13</sup>, Nle<sup>14</sup>)Bn-(6-14) zeigt mit 4,1 nM eine hohe Affinität zu hBRS-3, wohingegen die Affinität zu hGRP-R bzw. hNMB-R 60- bzw. 100-fach geringer ist. Damit steht ein Agonist für den hBRS-3 zur Verfügung, mit dem die physiologische Rolle des Rezeptors aufgeklärt werden kann.

Die intrazelluläre Signaltransduktion wurde mit dem nicht-selektiven Liganden mit hBRS-3 - transfizierten BALB 3T3-Zellen und hBRS-3-transfizierten NCI-H1299 durchgeführt (Ryan *et al.*, 1998). Die Experimente zeigten, dass es nach Ligandenbindung zu einer Erhöhung von Inositol-(1,4,5)-trisphosphat und einer Erhöhung der Phospholipase C-Aktivität kommt. Infolgedessen kommt es zu einem schnellen Anstieg der cytosolischen Kalziumkonzentration. Des Weiteren kommt es bei beiden getesteten Zelllinien zu einer Stimulierung der Tyrosinphosphorylierung der cytosolischen fokalen Adhäsionskinase (p125<sup>FAK</sup>), die für das Zellwachstum und Motilität wichtig ist (Seckl *et al.*, 1993; Sinnott-Smith *et al.*, 1993). Dabei ist die Aktivierung der p125<sup>FAK</sup> im Gegensatz zu anderen GPCRs unabhängig von der PKC-Aktivierung und Kalziummobilisierung. Eine Veränderung des cAMP-Spiegels konnte nach Ligandenbindung im Gegensatz zu GRP-R nicht beobachtet werden. Es konnte bei diesen Studien auch ein Antagonist für den hBRS-3 mit einer nennenswerten Affinität gefunden werden. Es handelt sich dabei um ein Somatostatin-Oktapeptid mit der Sequenz [(D)Nal-Cys-Tyr-(D)Trp-Lys-Val-Cys-Nal-NH<sub>2</sub>], das als selektiver NMB-R-Antagonist gilt (Orbuch *et al.*, 1993). Dieser kompetitive Antagonist inhibiert die hBRS-3 Aktivierung mit einem K<sub>i</sub>-Wert von 504 nM (Ryan *et al.*, 1998).

Die Untersuchungen zur intrazellulären Signaltransduktion mit transfizierten Zellen konnte mit Lungentumorzellen bestätigt werden (Ryan *et al.*, 1998). Die verwendeten Zelllinien NCI-N417 und NCI-H720 exprimieren den hBRS-3 endogen, wobei die NCI-N417-Zellen nur den hBRS-3 und keinen weiteren Bombesinrezeptorsubtyp exprimieren. Es konnte bestätigt

werden, dass der hBRS-3 mit Phospholipase C- und auch Phospholipase D-Aktivität gekoppelt ist. Daneben konnte ebenfalls ein Anstieg von Kalzium aus Inositol-(1,4,5) trisphosphat sensitiven Speichern beobachtet werden. Die Bindung des Liganden (D-Tyr<sup>6</sup>,  $\beta$ -Ala<sup>11</sup>, Phe<sup>13</sup>, Nle<sup>14</sup>)Bn-(6-14) bewirkt dagegen keine Änderung der Adenylatzyklaseaktivität, des <sup>3</sup>[H]-Thymidineinbaus in die DNS oder der Zellproliferation. Über Messung der extrazellulären Azidifizierung konnte nach Ligandenbindung eine Erhöhung der Stoffwechselaktivität gezeigt werden.

Weber *et al.* (2001) beschrieben die Kopplung der hBRS-3 Aktivierung mit der MAP-Kinase-Signaltransduktion. Es konnte gezeigt werden, dass es nach Ligandenbindung [(D-Tyr<sup>6</sup>,  $\beta$ -Ala<sup>11</sup>, Phe<sup>13</sup>, Nle<sup>14</sup>)Bn-(6-14)] auf mit dem hBRS-3 transfizierten NCI-H1299 Lungenkarzinomzellen zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels kommt. Ferner kommt es zur Phosphorylierung von zwei Subtypen (p42 und p44) der Mitogen-aktivierten-Protein-Kinase (MAP-Kinase). Diese Phosphorylierung wird katalysiert durch Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase-Kinase MEK-1. Weiterhin kommt es zur Aktivierung von Elk-1, einem Transkriptionsfaktor. Im weiteren Verlauf wurde auch eine Erhöhung der Genexpression von *c-fos* und *c-jun* beobachtet.

Die dargestellten Untersuchungsergebnisse zeigen, dass es nach Bindung eines spezifischen Liganden an den hBRS-3 zu einer Phosphoinositidhydrolyse durch die Phospholipase C kommt. Die PLC wird durch die Mitglieder der G $\alpha_q$ -Unterfamilie, die G $\alpha_q$ , G $\alpha_{11}$ , G $\alpha_{14}$  und G $\alpha_{15/16}$  beinhalten, aktiviert (Gutowski *et al.*, 1991; Smrcka *et al.*, 1991; Majerus, 1992; Sternweis und Smrcka, 1992; Kozasa *et al.*, 1993;). Das konnte von Jian *et al.* (1999) für den hBRS-3 bestätigt werden.

### 1.5.2 Physiologische Bedeutung des BRS-3

Neben der oben beschriebenen Expression des BRS-3 in verschiedenen Geweben wie Plazenta, Hoden und Gehirn, ist auch bei Krebszelllinien, die von humanem Lungengewebe, Brust- und epidermalen Gewebe abstammen, eine Expression nachgewiesen worden (Gorbulev *et al.* 1992; Fathi *et al.*, 1993; Gorbulev *et al.*, 1994; DeMichele *et al.*, 1994; Ohki-Hamazaki *et al.*, 1997a). DeMichele *et al.* (1994) konnten im Gegensatz zu Frankel *et al.* (1994) auch in humanen Bronchialepithelzellen eine (mRNA)-Expression des BRS-3 nachweisen.

Bei einer Studie über die Expression der Bombesinrezeptorsubtypen bei Lungenkrebszelllinien konnte bei 5/20 kleinzelligen Lungentumorzelllinien und 1/13 nicht-kleinzelligen Lungentumorzelllinien die mRNA-Expression von BRS-3 nachgewiesen werden (Toi-Scott *et al.*, 1996). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass der GRP-R am häufigsten in den Lungentumorzellen exprimiert wird, jedoch ließ sich keine Korrelation zwischen Alter, Geschlecht, Zeitraum des Rauchens und der Expression der Bombesinrezeptorsubtypen

finden. Jedoch wurde gezeigt, dass in bronchialen Sekreten von nicht-symptomatischen Rauchern eine hohe Konzentration von Bombesin-ähnlichen Peptiden zu finden ist (Aguayo *et al.*, 1989), möglicherweise sekretiert von hyperplastischen bronchialen neuroendokrinen Zellen, die oft in erkrankten Luftwegen zu finden sind. Möglicherweise begünstigt die erhöhte Konzentration von Bombesin-ähnlichen Peptiden in bronchialen Sekreten von Rauchern die Entstehung von Lungentumoren.

Bei *in vitro*-Untersuchungen zur Wirkung eines cytotoxischen Bombesin/Gastrin-releasing peptide Analogs auf H-69-Zellen (humane kleinzellige Lungenkarzinomzelllinie, SCLC) konnte die Transkription der Gene für den GRP-R und BRS-3 in diesen Zellen nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigten die behandelten Zellen eine verminderte Transkription des BRS-3 Gens (Kiaris *et al.*, 1999).

Desweiteren konnte in klinischen Isolaten von epithelialen Ovarial- (Chatzistamou *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2000a) und Prostatakarzinomen (Plonowski *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2000b) die Transkription des BRS-3 Gens nachgewiesen werden. Allerdings scheint die Transkriptionsrate der beiden anderen Bombesinrezeptorsubtypgene in den untersuchten noch höher sein. Im Gegensatz dazu ließ sich die mRNA des BRS-3 in humanem colorektalen Krebs und normaler Mucosa nicht nachweisen (Chave *et al.*, 2000).

Durch den Nachweis einer erhöhten GRP bzw. GRP-R mRNA-Expressionsrate in embryonalen Lungengewebe wurde für die GRP/GRP-R eine Beteiligung an der Lungenentwicklung postuliert (Wharton *et al.*, 1978; Sunday *et al.*, 1998), die für den BRS-3 jedoch nicht belegt werden konnte.

Eine mögliche wichtige physiologische Bedeutung des hBRS-3 konnte durch Untersuchungen an BRS-3 knock-out-Mäusen nachgewiesen werden (Ohki-Hamazaki *et al.*, 1997b). Der BRS-3 scheint bei der Regulation des Körpergewichtes und der Kontrolle des Insulin- und Glucosemetabolismus beteiligt zu sein. Diese Mäuse entwickelten eine milde Fettleibigkeit, die mit Bluthochdruck und einem gestörten Glucosemetabolismus einhergeht. Die Mäuse sind normoglykämisch, zeigen aber eine Hyperinsulinämie und weisen eine Glucose- und Insulinintoleranz auf. Weiterhin zeigten sie eine reduzierte metabolische Rate, erhöhte Futterverwertung und Fresssucht. Es kommt ebenfalls zu einer verminderten Sekretion von Wachstumshormon. Im Gegensatz dazu konnte bei Untersuchungen von fettleibigen Japanern eine Mutation oder ein Polymorphismus im hBRS-3-Gen nicht festgestellt werden (Hotta *et al.*, 2000). Da die Kontrolle des Körpergewichtes für das Überleben sehr wichtig ist, ist nicht ausgeschlossen, dass es redundante Mechanismen gibt, welche die Regulation bei Ausfall eines Mechanismus übernehmen.

Neben der Veränderung im Metabolismus zeigen die BRS-3-k.o.-Mäuse ein geändertes Verhalten. Sie zeigen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine größere Vorliebe für süßen

Geschmack und eine größere Abneigung gegen Bitteres (Yamada *et al.*, 1999). Das nicht-aggressive Verhalten, wie z.B. das Beschnupern und Beschnüffeln, Hinterherlaufen und Aufstellen, ist bei den genetisch-veränderten Mäusen reduziert, das aggressive Verhalten dagegen unverändert (Yamada *et al.*, 2000). Durch geeignete Liganden könnten diese Ergebnisse bestätigt werden und mögliche Verbindungen zur humanen (Patho)physiologie hergestellt werden.

### **1.6 Hämofiltrat- und Gewebepeptidbanken als Quelle biologisch aktiver Peptide**

Zirkulierende Peptide werden entweder direkt in die Blutbahn sezerniert oder sie diffundieren vom interstitiellen in den vaskulären Raum. Fast alle regulatorischen Peptide wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Immun-, Neuro- und Ionenkanalmodulatoren sind im Plasma zu finden. Deshalb stellt Plasma eine Quelle für systemisch zirkulierende regulatorische Peptide dar (Forssmann W.-G. *et al.*, 1993).

Für die Isolierung von solchen bioaktiven Substanzen, die zumeist nur in pikomolaren Konzentrationen zirkulieren, werden große Mengen an Plasma benötigt. Außerdem liegt ein ungünstiges Verhältnis zwischen regulatorischen Peptiden und anderen Plasmaproteinen, wie z.B. Albumin, vor. Forssmann K. *et al.* (1986) konnten jedoch durch die Isolierung von  $\alpha$ -atrialen natriuretischen Polypeptid ( $\alpha$ ANP) aus humanem Hämofiltrat (HF) zeigen, dass HF eine zu Plasma vergleichbare Quelle zur Isolierung von bioaktiven Peptiden darstellt.

In der IPF PharmaCeuticals GmbH wurde das Konzept zur Isolierung von Plasmapeptiden aus HF in größeren Maßstab realisiert und Extraktions- und Analyseverfahren etabliert (Forssmann W.-G. *et al.*, 1993). Hämofiltrat wird von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz gewonnen und enthält Peptidhormone in ähnlichen Konzentrationen wie sie auch in Blutplasma detektierbar sind (Schepky *et al.*, 1994).

Auf der Basis einer etablierten „Large-Scale“-Aufreinigung werden routinemäßig 10.000 L HF-Chargen aufgearbeitet, aus denen nach 2 Kationenaustauschchromatographien sowie einer Reversed-Phase-Chromatographie die humane Peptidbank generiert wird. Diese Peptidbank setzt sich aus ca. 300 Fraktionen zusammen, von denen Aliquots für das „Screening“ in unterschiedlichen Bioassays benutzt werden (Schulz-Knappe *et al.*, 1997). Neue Entwicklungen und Generierung von Gewebepeptidbanken aus Thymus, Hirn, Placenta und Sperma wurden in den letzten Jahren am IPF entwickelt (Seiler *et al.*, 1999), so dass nicht nur potentielle zirkulierende Formen aus Hämofiltrat sondern auch gewebe-spezifische Liganden isoliert werden können.

Aus der vorliegenden Hämofiltratpeptidbank konnten schon viele biologisch aktive Peptide isoliert werden (u. a. Kuhn *et al.*, 1993, Hess *et al.*, 1995, Schulz-Knappe *et al.*, 1996), so

dass die Verwendbarkeit der humanen Hämofiltratbank zur Auffindung von Liganden hinreichend bewiesen ist.

Im Zuge der Suche nach Liganden für oGPCRs wurden verschiedene Quellen benutzt. Entweder wurden Substanzbibliotheken mit schon bekannten Peptiden verwendet (u.a. Szekeres *et al.*, 2000), oder es wurden durch die Extraktion von verschiedenen Geweben bekannte, aber auch bisher unbekannte, Liganden identifiziert (Reinscheid *et al.*, 1995; Sakurai *et al.*, 1998; Hinuma *et al.*, 1998; Tatemoto *et al.*, 1998; Saito *et al.*, 1999; Kojima *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2001).

Mit den am IPF etablierten Peptidbanken sind somit die optimalen Bedingungen vorhanden, um neue endogene Liganden zu isolieren und identifizieren.

### **1.7 Aufgabenstellung**

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Isolierung und Charakterisierung eines endogenen Liganden für den humanen Orphanrezeptor BRS-3. Aufgrund der Expression des hBRS-3 im Uterus von trächtigen Meerschweinchen (Gorbulev *et al.* 1992) und im Gehirn der Maus (Hypothalamus) (Ohki-Hamazaki *et al.*, 1997a) besteht die Möglichkeit, dass der Ligand des Rezeptors entweder in der Plazenta und im Gehirn über einen autokrinen, parakrinen, oder über den Blutkreislauf über einen exokrinen, Mechanismus wirkt. Deshalb sollte über ein initiales Screening eine biologische Aktivität in einer der etablierten Hämofiltrat-, Schweinegesamthirn- oder Plazentapeptidbanken gefunden werden. Nach Verifizierung der biologischen Aktivität sollte der endogene Ligand isoliert und pharmakologisch charakterisiert werden. Dazu wurden die pharmakologischen Eigenschaften mit einem schon bekannten synthetischen und niedrig-affinen endogenen Liganden verglichen. Weiterhin sollte eine mögliche Funktion und die durch den Liganden ausgelöste Signaltransduktion über Immunoblot-Analyse und pharmakologische Untersuchungen aufgeklärt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Präparation der Peptidbänke

Die humane Hämofiltratpeptidbank und die Peptidbank aus Schweinegesamthirn wurde hergestellt wie beschrieben (Schulz-Knappe *et al.*, 1997; Seiler *et al.*, 1999).

### 2.2 Präparation der humanen Plazenta-Peptidbank

#### 2.2.1 Präparation des Rohextraktes

Verwendete Lösungen und Materialien:

Extraktionspuffer:	1 M Essigsäure 20 mM Ascorbinsäure 1 mM EDTA pH 2,6
Diafiltrationspuffer:	0,5 M Essigsäure 10 mM Ascorbinsäure 0,5 mM EDTA pH 2,6
Zentrifugation:	Sigma 6K10 (Sigma Zentrifugen, Osterode) Rotor Nr. 12500 30 min 16.000 g
Filtration:	Filtrationsstand mit Büchnertrichter Papierfilter (Schleicher und Schüll, 520 a, Ref-No.: 331422, Dassel)
Ultra- und Diafiltration	Sartocon Mini-Crossflow-System SM 17521 (Sartorius, Göttingen) 4 Ultrasart-Module SM (0,4 m <sup>2</sup> , Ausschlußgröße: 50 kDa)

Die humanen Plazenten wurden direkt nach der Geburt bei -20°C eingefroren. 34,7kg Gewebe wurde nach dem Auftauen mit Extraktionspuffer und Eis (2 kg Puffer + 2 kg Eis, 1 kg Gewebe) gemischt und in einem Mixer homogenisiert. Das Homogenisat wurde nach pH-Korrektur auf 2,5 zur Extraktion über Nacht bei 4°C gerührt. Durch Zentrifugation wurden unlösliche Bestandteile abgetrennt, das Sediment verworfen und der Überstand über Papierfilter grob filtriert. Die anschließende Ultra-/Diafiltration diente der Abtrennung hoch molekularer Proteine. Das Permeat wurde bis zur weiteren Aufarbeitung bei 4°C gelagert.

## 2.2.2 Präparative Chromatographie zur Herstellung der human Plazenta-Peptidbank

### 2.2.2.1 pH-Stufeneleution

Das resultierende Permeat der Ultrafiltration wurde auf eine Kation-Austauscher-Säule aufgetragen und stufenweise mit sechs verschiedenen Puffern eluiert.

Anlage:	Autopilot, PerSeptive Biosystems (Framingham, USA)
Säule:	Vantage VA 250, Amicon (England), 8,3 L
Chromatographiematerial:	Fractogel TSK SP 650 (M) Merck (Darmstadt)
Flußrate:	1 l/min
Verwendete Eluenten:	0,1 M Citronensäure, pH 3,3 0,1 M Essigsäure, 0,1 M Natrium-Acetat, pH 4,5 0,1 M Malat, pH 5 0,5 M Ammonium-Acetate, pH 7,0 H <sub>2</sub> O 0,1 M NaOH
Detektionswellenlänge:	280 nm

### 2.2.2.2 Präparative „Reversed-Phase“ (RP)-Chromatographie zur Erstellung der Plazentapeptidbank

Die Eluate der pH-Stufeneleution aus pH-Pool 4, 5 und 6 wurden zu Pool 4 zusammengefasst, Pool 0 entspricht dem Durchlauf. Die resultierenden Eluate der Elution (7 bis 30 l) wurden anschließend durch eine „Reversed-Phase“-Chromatographie (RP) weiter aufgetrennt.

Anlage:	Merck (Darmstadt)
Säulendimensionen:	20 cm x 15,5 cm
Chromatographiematerial:	Source RPC 15 (15-20 µm, 300 Å), Pharmacia (Freiburg, Deutschland)
Flußrate:	400 ml/min
Laufmittel A:	10 mM HCl in Wasser
Laufmittel B	80% (v/v) Acetonitril, 10 mM HCl, 20 % (v/v) Wasser
Gradient:	von 0% B bis 50 % B in 60 min
Detektionswellenlänge:	280 nm
Fraktionsgröße:	200 ml

Durch diese präparative „Reversed-Phase“-Chromatographie entstehen 240 Fraktionen (fünf pH-Pools zu je 48 Fraktionen). Aliquots der Peptidbankfraktionen, die 250 mg Äquivalent

plazentalem Gewebe entsprachen, wurden im Bioassay (s.u.) getestet. Die Aliquots, die ein spezifisches Signal im FLIPR-System auslösten, wurden weiter untersucht. Die korrespondierenden Fraktionen wurden mit einer präparativen RP-Säule weiter gereinigt.

### **2.3 Isolierung der Liganden für den hBRS-3 aus humaner Plazenta**

#### **2.3.1 Präparative RP-Chromatographie**

Allgemein gilt für die Proben, dass sie entweder in Laufmittel A gelöst oder damit verdünnt wurden und vor dem Auftrag auf die Säule unlösliche Bestandteile durch Filtration (Minisart (17597) 0,2 µm, Sartorius, Göttingen) abgetrennt wurden. Zur Herstellung der Puffer wurde entmineralisiertes Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Millipore, Eschborn) verwendet. Die organischen Pufferkomponenten entsprachen der Reinheitsstufe "gradient grade" bzw. "prepsolv". Die Laufmittel wurden vor der Verwendung 10 min mit Helium entgast. Die biologisch aktiven Fraktionen wurden durch die folgende Chromatographie aufgetrennt.

HPLC-Anlage:	BioCad 60, PerSeptive Biosystems (Freiburg)
Säulendimensionen:	300 mm x 47 mm PrepPak Cartridge
Chromatographiematerial:	Bakerbond RP C18 (15-30 µm, 300 Å), Millipore (Milford, USA)
Flußrate:	40 ml/min
Laufmittel A:	30% (v/v) Methanol, 10 mM HCl, 70 % Wasser
Laufmittel B:	10 mM HCl in Methanol
Gradient:	von 20% B bis 70 % B in 47,5 min
Detektionswellenlänge:	214 / 280 nm
Fraktionsgröße:	50 ml

Das biologisch aktive Material wurde auf der gleichen HPLC-Anlage und mit der gleichen Säule rechromatographiert. Je nach Isolierungsstrategie wurden Laufmittel und Gradient angepasst.

Anlage:	BioCad 60, PerSeptive Biosystems (Freiburg)
Säulendimensionen:	300 mm x 47 mm PrepPak Cartridge
Chromatographiematerial:	Bakerbond RP C18 (15-30 $\mu\text{m}$ , 300 $\text{\AA}$ ), Millipore (Milford, USA)
Flußrate:	40 ml/min
Laufmittel A:	0,1% (v/v) TFA in Wasser
Laufmittel B:	80% (v/v) Acetonitril, 0,1% (v/v) TFA, 19,9% Wasser
Gradient:	von 20% B bis 50 % B in 50 min
Detektionswellenlänge:	214 / 280 nm
Fraktionsgröße:	50 ml

### 2.3.2 Semipräparative Chromatographie

Zur weiteren Reinigung wurde eine semipräparative RP-Säule genutzt.

HPLC-Anlage:	2 Doppelkolbenpumpen Typ 420, Durchflußphotometer Typ 432 Steuercomputer Data-System Typ 450, Kontron (Henningen) Fraktionssammler 2110, Bio-Rad (München)
Säulendimensionen:	250 x 20 mm
Chromatographiematerial:	RP C4 (5 $\mu\text{m}$ , 100 $\text{\AA}$ ), Biotek (Heidelberg)
Flußrate:	5 ml/min
Laufmittel A:	0,1% (v/v) TFA in Wasser
Laufmittel B:	80% (v/v) Acetonitril, 0,1% (v/v) TFA, 19,9% Wasser
Gradient:	von 25% B bis 65 % B in 45 min
Detektionswellenlänge:	214 / 280 nm
Fraktionsgröße:	5 ml

### 2.3.3 Analytische Chromatographie

Für den letzten Reinigungsschritt wurde eine analytische RP C18-Säule verwendet.

HPLC-Anlage:	2 Doppelkolbenpumpen Typ 420, Durchflußphotometer Typ 432 Steuercomputer Data-System Typ 450, Kontron, (Henningen) Fraktionssammler 2110, Bio-Rad (München)
Säulendimensionen:	250 x 4,6 mm
Chromatographiematerial:	RP C18 Aqua (5 µm, 125 Å), Phenomenex (Aschaffenburg)
Flußrate:	0,7 ml/min
Laufmittel A:	0,1% (v/v) TFA in Wasser
Laufmittel B:	80% (v/v) Acetonitril, 0,1% (v/v) TFA, 19,9% Wasser
Gradient:	isokratisch mit 34 % B
Detektionswellenlänge:	214 / 280 nm
Fraktionsgröße:	0,7 ml

Die Bestandteile der gereinigten Fraktionen konnten durch analytische Methoden wie Massenspektrometrie und Edmann-Abbau identifiziert werden.

## 2.4 Analytische Methoden

### 2.4.1 Massenspektrometrische Methoden

#### 2.4.1.1 Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight (MALDI-TOF) Massenspektrometrie

Die Messungen erfolgten im linearen Modus in dem Flugzeit-Massenspektrometer LaserTec RBT II der Firma PerSeptive/Vestec (Houston, USA). Das Gerät ist mit einer 1,2 m langen Flugröhre und mit einem bei 337 nm emittierenden Stickstofflaser ausgestattet. Positive Ionen werden bei 25 keV erzeugt und bis zu 30 Laserimpulse pro Probenposition akkumuliert. Als Steuersoftware und zur Kalibrierung wurde die Voyager RP BioSpectrometry Workstation Version 3.07.01 (PerSeptive Biosystems, USA) eingesetzt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Grams/386 Level II, Version 3.0 (Galactic Industries, USA). Als Matrix diente  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure in einer Konzentration von 5 mg/ml in 50 % (v/v) Acetonitril, 0,05 % (v/v) TFA unter Beimischung von L-Fucose als Co-Matrix, ebenfalls in einer Konzentration von 5 mg/ml. Der Probenauftrag erfolgte nach der „dried-drop“-Methode. Dabei wird 1 µl der Matrix auf der Probenplatte mit 1 µl der Probe vermischt. Anschließend werden die Proben mit Hilfe eines Ventilators bei Raumtemperatur getrocknet.

### 2.4.1.2 Elektrospray-Ionenfallen-Massenspektrometer (LCQ)

Gerät:	Elektrospray-Ionenfallen-Massenspektrometer (ThermoQuest, Egelsbach)
Messparameter:	automatischer Verstärkungsmodus
Anzahl der im MS-Modus gemessenen Ionen:	$5 \cdot 10^7$
Anzahl der im CID-Modus gemessenen Ionen:	$2 \cdot 10^7$
Spannung des Photomultiplier:	- 850 V
Spannung zwischen Nadel und beheizter Kapillare:	4 kV

Das Ionenfallen-Massenspektrometer (ThermoQuest, Egelsbach, Deutschland) wurde mit automatischer Verstärkung während der Messung betrieben. In diesem Modus wählt das System die Parameter der Ionenfalle automatisch, um die Anzahl der Ionen in der Ionenfalle konstant zu halten. Im MS-Modus wurde die Ionenfalle mit drei Mikroskans gescannt und 10 Scans wurden gemittelt. Im CID-Modus sammelten sich in der Ionenfalle bis zu drei Sekunden lang die erzeugten Ionen in Abhängigkeit von der Anzahl der Ionen pro Zeiteinheit, die in die Ionenfalle eintraten. Unterschiedliche Dissoziationsenergien wurden für die Aufnahme von optimalen MS/MS-Spektren verwendet. Die Daten von bis zu 15 Spektren wurden summiert und dann gemittelt. Um die Identität der Peptide zu ermitteln, wurde mit Hilfe der durch CID erhaltenen Spektren eines jeden Peptidions eine Sequenzdatenbankrecherche mit der Sequest-Software durchgeführt (Eng *et al.* 1994, Yates *et al.* 1995, Yates *et al.* 1996). Alle Parameter der Datenbankrecherche wurden von Figeys *et al.* (1996) beschrieben.

## 2.4.2 Peptidanalyse und Sequenzierung

### 2.4.2.1 Kapillaronenelektrophorese (CZE)

Die Kapillaronenelektrophorese ist eine hochauflösende Analysenmethode, die hier zur Reinheitsüberprüfung von Peptiden eingesetzt wurde.

Als Elektrophoresesystem wurde ein Gerät der Firma Beckman (P/ACE 2000, Beckman, München) verwendet. Die Auswertung der Elektropherogramme erfolgte mit der Software "Gold Version 6.01" (Beckmann Instrument Inc., USA). Zur Trennung der Peptide wurde eine 57 cm lange unbeschichtete "fused silica" Kapillare (Typ TSP 075375, Composite Metal Services Ltd. UK) verwendet. Die Detektionswellenlänge betrug 220 nm.

Die Probe wurde durch Anlegen eines geringen Überdruckes für 1 - 20 s in die Kapillare injiziert. Das Injektionsvolumen betrug 6 nl bei einer Peptidkonzentration von 1 mg/ml und einer Injektionsrate von 6 nl/s. Bei geringer konzentrierten Lösungen wurde proportional länger injiziert. Die Messung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 120  $\mu$ A, die aus

einer angelegten Hochspannung von 15 - 17 kV resultierte. Die Temperatur wurde mit einer Flüssigkühlung auf 25 °C eingestellt. Als Puffer wurde 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mit 0,02 % Hydroxypropylmethylcellulose pH 2,5 verwendet.

#### 2.4.2.2 Sequenzierung der Peptide

Die Peptidsequenzierungen wurden mit Hilfe eines automatischen Edman-Sequenzanalysegerätes der Firma Applied Biosystems Modell 473A (ABI, Weiterstadt) durchgeführt. Die Datenaufnahme und Auswertung erfolgte mittels der Model 610A Data Analysis Software (Version 1.2.1, ABI, Weiterstadt).

Zur Sequenzierung wurden ca. 100 pMol Peptid zwischen zwei Filterplättchen aus BioPren™ appliziert. Zwischen den Filterplättchen bildet sich das eigentliche Reaktionsvolumen aus, auf das die Reagenzien nach Angaben des Herstellers appliziert werden. Die Analyse der Aminosäuren erfolgte über RP-Chromatographie, die Detektion bei 256 nm.

#### 2.4.3 Resynthese der identifizierten Peptide

Die isolierten Peptide und deren Derivate wurden mittels der Fmoc-Festphasen Peptidsynthese an einem polymeren Fmoc-Phe-Wang Harz mit einer Beladung von 0,87 mmol/g hergestellt. Die Aktivierung der zu koppelnden Aminosäure wurde mit TBTU/HOBt in NMP durchgeführt. Zur Fmoc-Abspaltung wurde das Harz 15 min mit 20% Piperidin in NMP behandelt. Die Kopplungszeit der einzelnen Aminosäuren betrug jeweils 30 min. Um eine ausreichende Menge an bioaktiven Peptiden für die biologische Charakterisierung zu erhalten wurde ein Synthesemaßstab von 1,0 mmol für die Darstellung von VV-Hämorphin-7 und LVV-Hämorphin-7 gewählt. Hämorphin-7 und Hämorphin-8 wurden an einem automatischen Peptidsynthesizer ABI 433A unter Verwendung von Standard Synthesesyklen in einem Maßstab von 0,1 mmol synthetisiert. In Tabelle 2 sind die synthetisierten Peptide aufgeführt.

**Tabelle 2: synthetisierte Peptide**

Name	Sequenz	M <sup>+</sup> <sub>(Theorie)</sub>	M <sup>+</sup> <sub>(Exp.)</sub>
VV-Hämorphin-7	VVYPWTQRF	1195,3 Da	1194,7 Da
LVV-Hämorphin-7	LVVYPWTQRF	1308,5 Da	1308,0 Da
Hämorphin-7	YPWTQRF	997,1 Da	996,7 Da
Hämorphin-8	VYPWTQRF	1096,3 Da	1095,7 Da

Zur Abspaltung des Peptides vom Harz und der Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen wurde das harzgebundene Peptid mit einer frisch angesetzten Abspaltnischung (cleavage cocktail) aus TFA:EDT:H<sub>2</sub>O (94:3:3, v/v/v) für 3 h bei Raumtemperatur behandelt. Pro g Harz wurden 20 ml Abspalllösung eingesetzt. Danach wurde das Harz über eine Glasfritte (Por 4)

abgesaugt und das in TFA gelöste Peptid in eiskaltem MTBE ausgefällt. Das ausgefallene Peptid wurde anschließend durch Zentrifugation pelletiert, getrocknet und über eine präparative HPLC (Prep-Pak 500 Waters C18, 47 × 300 mm, 15-20 µm, 40 ml/min) (Solvent A: 0.07% TFA, Solvent B: 80% CH<sub>3</sub>CN, 0.05% TFA) mit einem Gradienten von 35-55% Solvent B gereinigt. Die einzelnen Fraktionen wurden über ESI-MS (Perkin Elmer, API 100, Biomolecular Mass Analyzer) und analytische HPLC (Vydac C18, 4.6 × 250 mm, 5 µm, 0.8 ml/min) auf ihre Reinheit hin überprüft. Fraktionen, die das gewünschte Peptid enthielten, wurden gepoolt und lyophilisiert.

## 2.5 Molekularbiologische Methoden

### 2.5.1 Molekularbiologischen Standardmethoden

#### 2.5.1.1 Verwendete Oligonukleotide

In Tabelle 3 sind die in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide aufgeführt.

**Tabelle 3: verwendete Oligonukleotide**

		Bemerkungen
hBRS-3	CCTGGCTTTTGGAGATCTTTTACTT AACAAAGCCATGCCCGTAAGC	Primer für den Nachweis der mRNA-Transkription des h-BRS-3 in transfizierten CHO G $\alpha_{16}$ -Zellen
hBRS-3	CAGAATCATCAAGCTCTGTG AGTCTTTCAGGATGGCATTGG	Primer zur Amplifikation der revers transskribierten RNA
hNMB-R	CGGACTCTGCTGGAAAGGA CCAGCAACACGGAGACCAC	„
hGRP-R	CAAAGAGCCCGGCATAGA AGCGCCGTGAGTGTGAAG	„

#### 2.5.1.2 Sterilisation von Lösungen und Materialien

Die Sterilisation von thermostabilen Lösungen und Laborgeräten erfolgte für 20 min bei 120°C und 2 bar in einem Dampfdruckautoklaven (Bioclav 3021001, Schütt Labortechnik, Göttingen). Lösungen, die nicht durch feuchte Hitze sterilisiert werden konnten, wurden sterilfiltriert (Filtropur, Sarstedt; 0,22 oder 0,45 µm). Alle Lösungen, Puffer und Nährmedien wurden mit deionisiertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Milli-QUFplus, Millipore) angesetzt. Glas-, Keramik- und Metallwaren wurden für 4 h bei 180°C trockener Hitze sterilisiert.

Alle Chemikalien und Materialien wurden in Analysenqualität verwendet und stammen, soweit nicht anders angegeben, ausschließlich von den Firmen BioWhittaker, Life Technologies™, Costar, Falcon, Greiner, Roth und SIGMA.

### 2.5.1.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration wurde ein Aliquot der zu bestimmenden Probe mit Nukleinsäuren bekannter Konzentration auf ein Agarosegel aufgetragen und im Vergleich der Bandenintensität die Probenkonzentration abgeschätzt. Zur genauen Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen in wässrigen Lösungen wurden die Proben entsprechend mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und die optische Dichte bei 260 nm in einer Quatzküvette mit 1 cm Schichtdicke gemessen. Die Berechnung der Konzentration erfolgte über die Gleichung:

$$c = OD_{260} \cdot \varepsilon \cdot V$$

V = Verdünnungsfaktor

c = Konzentration in ng/μl

OD<sub>260</sub> = Wert der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm

ε = Extinktionskoeffizient:    einzelsträngige RNA: ε = 40

                                  doppelsträngige DNA: ε = 50

                                  einzelsträngige DNA: ε = 37

                                  einzelsträngige Oligos: ε = 20

Um einen Anhaltspunkt über die Reinheit der Nukleinsäuren zu erhalten, wurde zusätzlich die optische Dichte bei 280 nm bestimmt. Der Quotient von OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> gibt Auskunft über den Reinheitsgrad der Probe. Dieser Wert sollte bei einer proteinfreien Nukleinsäurelösung zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

### 2.5.1.4 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die analytische oder präparative Trennung von Nukleinsäuren erfolgte nach dem jeweiligen Trennungsziel in 0,8-1,5%igen (w/v) Agarose-Gelen durch horizontale Gelelektrophorese. Zur Sichtbarmachung der DNA unter UV-Licht wurde dem Gel vor der Polymerisierung Ethidiumbromid (0,1 μg/ml) zugegeben. Die Auftrennung erfolgte in 1 x TAE Puffer bei 10 V/cm. Zur Visualisierung der Lauffront und zur Sedimentation der Proben in den Taschen wurden die DNA-Proben vor der Applikation auf das Gel 1:5 mit 5 x Blaumarker versetzt. Die Größe der isolierten DNA-Fragmente wurde anhand eines im Gel aufgetrennten DNA-Größenstandards bestimmt (1 kbp-Leiter (0,5 μg/Spur) bzw. 100 bp-Leiter (3 μg/Spur), Life Technologies™).

<u>Ethidiumbromid-Stammlösung:</u>	1 mg/ml Ethidiumbromid in ddH <sub>2</sub> O
<u>50 x TAE-Puffer:</u>	2 M Tris 100 mM EDTA 1 M Essigsäure
<u>5 x DNA-Blaumarker:</u>	70% Glycerin 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 1 mM EDTA 0,05% (w/v) Bromphenolblau

### 2.5.2 Expressionsanalyse des transfizierten hBRS-3

Die Expressionsanalyse des transfizierten Rezeptors mittels molekularbiologischer Methoden wurde durch Detektion des Primärtranskripts aus den selektionierten Zellklonen durchgeführt. Dazu wurde RNA aus den Zellklonen isoliert und nach reverser Transkription durch PCR mittels rezeptorspezifischen Primern amplifiziert oder als Northern Blotting mittels einer rezeptorspezifischen Sonde detektiert. Die Anzahl der Primärtranskripte der untersuchten Zellklone wurde durch Intensität der Ethidiumbromid-gefärbten PCR-Bande unter UV-Bestrahlung bzw. durch die Bandenschwärzung der Autoradiographie abgeschätzt. Wenn mehrere Zellklone den Rezeptor exprimierten, wurden bevorzugt Zellklone mit unterschiedlichen Expressionsstärken für das Screening der Peptidbanken ausgewählt.

#### 2.5.2.1 RNA-Extraktion

Alle Arbeiten mit RNA wurden unter besonderen Schutzmaßnahmen (Verwendung von gestopften Pipettenspitzen, Tragen von Handschuhen, Verwendung von RNase-freien Lösungen) durchgeführt, um die RNA vor der Hydrolyse durch RNasen zu schützen. Isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung in ddH<sub>2</sub>O gelöst und bei – 80°C gelagert.

Zur Isolierung von RNA wurde der RNA-Isolierungs Kit RNeasy MiniKit (Qiagen, Düsseldorf) verwendet. Zur RNA-Isolation wurde eine 90 %ig konfluente 75 cm<sup>2</sup>-Flasche verwendet. Nach einmaligem Waschen mit PBS, trypsinieren und pelletieren, wurde das Zellpellet in 600 µl Lysis-Puffer (RLT-Puffer, Qiagen) aufgenommen. Die Suspension wird zum Zellaufschluss auf kleine Säulchen pipettiert (QIA-Shredder) und zentrifugiert. Das Lysat wird darauf in 70% Ethanol aufgenommen und auf eine RNA-bindende Säule pipettiert und nochmals zentrifugiert. Nach einem Wasch- und Zentrifugationsschritt mit RW1-Puffer (Qiagen), zwei weiteren Wasch- und Zentrifugationsschritten mit RPE-Puffer (Qiagen) wird die RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert.

Zur Bestimmung der Konzentration und Qualität der isolierten RNA wurde anschließend eine photometrische Analyse durchgeführt. Aus einer 90% konfluent gewachsenen 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit transfizierten CHO-Zellen wurde durchschnittlich 40 µg RNA erhalten.



Vor der eigentlichen Hybridisierung wird noch vorhandenes Glyoxal durch eine einstündige Inkubation der Membran in Deglyoxalisierungslösung bei 65°C entfernt. Die Membran wurde vor der eigentlichen Hybridisierung für eine Stunde bei 65°C deglyoxaliert. Unmittelbar danach erfolgte die Prähybridisierung (2 h bei 68°C) mit Hering-Spermien DNA, damit es zu keiner unspezifischen Hybridisierung der Sonde kommt. Danach wird die denaturierte Sonde in die Prähybridisierungslösung gegeben und bei 68°C über Nacht inkubiert.

<u>Deglyoxalisierungslösung:</u>	20 mM Tris, pH 8,0
<u>Prähybridisierungslösung:</u>	250 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,2
	1 mM EDTA
	20% SDS
	0,5 % Blockierungslösung (Roche)
	50 µg/ml Hering Spermien DNA (Roche)
<u>Blockierungslösung:</u>	10 % (w/v) Blockreagenz in
	0,1 M Maleinsäure, pH 7,5
	0,15 M NaCl

Nach der Hybridisierung wurde die Membran zur Detektion dreimal für je 20 min in Waschpuffer 1, anschließend für 5 min in Waschlösung 2 bei Raumtemperatur gewaschen. Die Membran wurde dann für eine Stunde in Blockierungslösung bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem anti-DIG-alkalische Phosphatase Antikörper (1:1500 verdünnt) für 30 min bei RT. Nach viermaligem Waschen für 10 min mit Waschpuffer 2 bei RT, erfolgte die Zugabe des Substratpuffers für fünf Minuten. Danach wird das Substrat (CSPD) 1:100 verdünnt zugesetzt und für weitere fünf Minuten inkubiert. Die Substratlösung wurde danach entfernt und die Membran auf einen Chemilumineszenzfilm gelegt. Die Exposition erfolgte zwischen 5 min bis über Nacht.

<u>Waschlösung 1:</u>	20 mM Phosphatpuffer, pH 7,2
	1 mM EDTA
	1% SDS
<u>Waschlösung 2:</u>	0,1 M Maleinsäure, pH 8,0
	3 M NaCl
	0,3 % Tween 20
	0,5 % Blocklösung (s.o.)
<u>Substratpuffer:</u>	0,1 M Tris, pH 9,5
	0,1 M NaCl

### 2.5.2.3 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Bei der RT-PCR wird die mRNA eines Gewebes vor der PCR in DNA umgeschrieben. Die aus den Gewebe oder Zelllysaten extrahierte Gesamt-RNA wird zunächst mit einem Oligo(dT) Primer hybridisiert. Hierbei bilden sich zwischen dem Poly(A)-Tail eukaryontischer mRNAs und der Oligo(dT)-Sequenz des Primers doppelsträngige Bereiche aus, die einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase, RT) unter geeigneten Reaktionsbedingungen als Startpunkt für die Synthese des komplementären Stranges dient. Das Produkt dieser Reaktion ist ein DNA/RNA Hybrid, wobei der DNA-Strang eine revers-komplementäre Kopie (cDNA) des entsprechenden mRNA-Moleküls ist. Der RNA-Strang des Hybrides wird im Anschluß an die reverse Transkription mit RNase-H abgebaut. Die Produkte der Reaktion (cDNA-Erststrang) repräsentieren somit theoretisch die polyadenylierte mRNA Population einer RNA-Probe. Durch geeignete PCR-Strategien kann anschließend die Genexpression eines Gewebes oder von kultivierten Zellen untersucht oder die mRNA-Sequenz eines neuen Gens durch Amplifikation der entsprechenden cDNA ermittelt werden.

### 2.5.2.4 Herstellung von cDNA (Erststrangsynthese)

Zum spezifischen Nachweis geringer RNA-Mengen wurde mit Hilfe des viralen Enzyms Reverse Transkriptase komplementäre DNA (cDNA) generiert.

Für die Reaktion wurden je 2 µg lyophilisierte RNA eingesetzt, die in ddH<sub>2</sub>O und 250 ng „random“ Primer (Life Technologies™) gelöst wurde. Nach 10-minütiger Denaturierung bei 72°C und schnellem Abkühlen auf Eis fand die Anlagerung der Oligonukleotide an die RNA statt. Nach kurzer Zentrifugation wurde dem Ansatz jeweils 4 µl Erststrang-Puffer (Life Technologies™), 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl dNTPs (je 10 mM) (Life Technologies™) und 0,5 µl RNasin (Promega) zugesetzt. Für die vergleichende Analyse wurden diese Komponenten in einem gemeinsamen Ansatz gemischt, um auftretende Pipettierfehler zu minimieren. Nach dem Mischen erfolgte eine Äquilibration des Reaktionsansatzes für 2 min bei 42°C und die Zugabe von je 1 µl SUPERSRIPT II RNase H (Life Technologies™). Die reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) erfolgte bei 42°C für 50 min und wurde durch anschließende Inkubation bei 70°C für 10 min durch Inaktivierung des Enzyms abgebrochen. Die so erhaltene cDNA wurde bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert. Als Maßeinheit für die vergleichende Quantifizierung wurde die zugrundeliegende RNA-Äquivalentmenge benutzt.

### 2.5.2.5 Amplifikation der cDNA

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Technik, die es ermöglicht, aus geringsten DNA-Mengen definierte DNA-Abschnitte *in vitro* zu vervielfältigen (Saiki *et al.*, 1988). DNA-abhängige DNA-Polymerasen benötigen als Startpunkt für die Synthese des zur Matrize

komplementären Stranges kurze, doppelsträngige Sequenzbereiche. Für die PCR verwendet man zwei synthetische Oligonukleotide („Primer“), die jeweils zu einem der beiden Stränge der Matrizen-DNA komplementär sind und die gewünschte Sequenz (Amplikon) einschließen (Sense- und Antisenseprimer). Ein Zyklus der Polymerase-Kettenreaktion beinhaltet die temperaturgesteuerte Reaktionsfolge von Denaturierung, Annealing und Extension.

Zunächst wird das zu untersuchende DNA-Gemisch ("Template") bei hoher Temperatur (94-99°C) denaturiert und zusammen mit den synthetischen Oligonukleotiden abgekühlt ("Annealing"). Während des Annealings bilden sich Hybride zwischen den Einzelsträngen des Amplikons und den entsprechenden Primern aus. Diese doppelsträngigen DNA-Bereiche dienen einer hitzestabilen, DNA-abhängigen DNA-Polymerase (z.B. Taq-DNA Polymerase) als Startpunkte für die Synthese des komplementären Stranges (Extension). Die Extension der Primer wird bei einer Temperatur durchgeführt, die über der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Primer liegt und den Annealingvorgang beendet (65-75°C). Da das Extensionsprodukt des einen Primers im nächsten Zyklus als Template des anderen dient, wird theoretisch der durch die Primer eingeschlossene DNA-Abschnitt nach n-Zyklen um  $2^n$  vermehrt.

Die in dieser Arbeit verwendeten PCR Protokolle werden durch Variation der Primerkonzentration, der Annealingtemperatur, Reaktionszeiten („Annealingzeit“) und der Zyklusanzahlen optimiert. Alle Reaktionen werden im Gen-Amp Cycler 2400 der Firma Perkin Elmer durchgeführt.

10 x Taq-DNA-Polymerase-Puffer (Biomol):	100 mM Tris-HCl 500 mM KCl 15 mM $MgCl_2$ pH 8,8
$MgCl_2$ -Lösung:	50 mM/25mM
Oligonukleotide:	10 $\mu$ M
dNTP-MIX:	10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10mM dGTP, 10mM dTTP
Taq-DNA-Polymerase (Biomol):	4U/ $\mu$ L/3U/ $\mu$ L
PCR-Standardansatz:	10 mM Tris-HCl (pH8,8) 50 mM KCl 1,5 mM $MgCl_2$ 0,4 $\mu$ M jeder Primer 200 $\mu$ M dNTPs 0,04 U/ $\mu$ L Taq-DNA-Polymerase

PCR-Standardansätze werden in einem Endvolumen von 50 µL durchgeführt. Die Ansätze werden unmittelbar vor ihrer Verwendung aus den angegebenen Lösungen erstellt, wobei als Template Erststänge, bzw. PCR-Voramplifikationen eingesetzt werden. Die Amplifikationen mit der Taq-Polymerase werden als "hot start" durchgeführt. Die Zugabe der Taq-DNA Polymerase erfolgte generell in einem geeigneten Volumen (5-10 µL) 1x Taq-DNA-Polymerase-Puffer bei 78°C nach einer initialen Denaturierung der PCR-Ansätze von 3 min bei 94°C. Im letzten Zyklus jeder PCR-Reaktion wird die Extensionszeit auf 5 – 10 min Minuten verlängert, um sicherzustellen, dass begonnene Polymerisationen vollständig abgeschlossen werden. Anschließend werden die Ansätze bis zu ihrer Entnahme aus dem Gerät auf 4°C gekühlt.

Temperaturprotokoll zur Amplifikation des hBRS-3:

94°C	3 min	Initiale Denaturierung
<u>78°C</u>	<u>-----</u>	<u>Zugabe von Taq-Pol</u>
94°C	30s	Denaturierung
58°C	40 min	Annealing
<u>72°C</u>	<u>45 min</u>	<u>Extension 30 Zyklen</u>
<u>72°C</u>	<u>10 min</u>	<u>Extension</u>
4°C		Reaktionsende

Temperaturprotokoll zur Amplifikation des hNMB-r:

94°C	3 min	Initiale Denaturierung
<u>78°C</u>	<u>-----</u>	<u>Zugabe von Taq-Pol</u>
94°C	30 sec	Denaturierung
62°C	30 sec	Annealing
<u>72°C</u>	<u>30 sec</u>	<u>Extension 40 Zyklen</u>
<u>72°C</u>	<u>5 min</u>	<u>Extension</u>
4°C		Reaktionsende

Temperaturprotokoll zur Amplifikation des hGRP-R:

94°C	3 min	Initiale Denaturierung
<u>78°C</u>	<u>-----</u>	<u>Zugabe von Taq-Pol</u>
94°C	30 sec	Denaturierung
52°C	30 sec	Annealing
<u>72°C</u>	<u>45 sec</u>	<u>Extension 40 Zyklen</u>
<u>72°C</u>	<u>5 min</u>	<u>Extension</u>
4°C		Reaktionsende

### 2.5.3 Stabile Transfektion von Zellen

Das Einschleusen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen mittels eines Vektors (Plasmid oder virales Konstrukt), der die Expression der Fremd-DNA in der Wirtszelle ermöglicht, wird als Transfektion bezeichnet. Man unterscheidet zwischen transienter und stabiler

Transfektion. Bei der transienten Transfektion erfolgt die Expression des Fremdgens nur vorübergehend in einem zeitlichen Fenster (etwa 24-72 h) nach der Transfektion, während bei der stabilen Transfektion die Fremd-DNA ins Zellgenom integriert wird und dauerhaft exprimiert wird. Im Hinblick auf die beabsichtigten Screeningversuche fiel die Entscheidung für die stabile Transfektion, weil definierte Zelllinien die Vorbereitung für die Screeningversuche vereinfachen und außerdem eine bessere Reproduktion der Ergebnisse erreicht wird. „Nackte“ DNA wird von Säugerzellen nur mit äußerst geringer Effizienz aufgenommen, weshalb verschiedene Methoden zur Verbesserung der Aufnahme entwickelt wurden. Bei transienter Expression wird die Fremd-DNA direkt abgelesen, während für die stabile Transfektion eine Integration ins Zellgenom erforderlich ist. Dies erfolgt über seltene Rekombinationsereignisse, wobei je nachdem wie viele Fremd-Moleküle inseriert werden und der Locus im Zellgenom (beides sind Zufallsereignisse) dazu führen, dass verschiedene Zellklone unterschiedliche Expressionslevel der Fremd-DNA aufweisen. Da die Integration ins Zellgenom ein seltenes Ereignis (nur 1 von 10000 Zellen) ist, erfordert dies eine Selektion der Zellklone. Dies ist z.B. mit Hilfe des Resistenzgens, das auf dem Expressionskonstrukt kodiert ist, möglich.

Die cDNA des humanen BRS-3 wurde freundlicherweise von Dr. J.F. Battey, Laboratory of Molecular Biology, NIDCD, NIH, zur Verfügung gestellt. Nach der Subklonierung der codierenden Region des hBRS-3 (Acc.Nr.: L08893; durchgeführt von Cadus Pharmaceuticals Corp. (New York, USA)) in den Expressionsvektor pcDNA3.1neo (Invitrogen, USA) wurde eine  $G\alpha_{16}$  exprimierende CHO-Zelllinie (Molecular Devices, USA) mit diesem Vektor transfiziert.

Die Expression der Rezeptor-cDNA erfolgt in diesem Vektor unter Kontrolle des CMV-Promoters, der eine hohe Expressionsrate in Säugerzellen gewährleistet. 5'-wärts vom Promoter ist eine Multiple-Cloning-Site (MCS) mit einer Vielzahl von Restriktionsschnittstellen, die eine einfache und oft zielgerichtete Subklonierung der zu exprimierenden cDNA ermöglicht. Das Polyadenylierungssignal und die Transkriptionsterminationssequenz des bovinen Wachstumshormons (BGH) verstärken die Stabilität der gebildeten mRNA und damit die Expression der Rezeptoren. Der verwendete Expressionsvektor pcDNA 3.1neo vermittelt eine Resistenz gegen Ampicillin für die Vermehrung des Vektors in Bakterienzellen und gegen Geneticin (G418), da er das Gen für die Neomycin-Phosphotransferase enthält. Die Zugabe von Geneticin (G418) führt zur Selektion von pcDNA 3.1neo positiven Zellen. Als Kontrolle wurden CHO- $G\alpha_{16}$ -Zellen verwendet, die nicht mit dem Plasmid transfiziert worden sind.

Zur Transfektion wurde das Effectene-Transfektions-Reagenz der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Dabei wird die zu transfizierende Plasmid-DNA mit einem kondensierenden Agenz („Enhancer“, Qiagen) in einem dafür geeignetem Puffersystem („Puffer EC“, Qiagen)

in eine kompakte Form überführt. Zur Bildung des DNA-Transfektions-Komplexes werden Lipide („Effectene“, Qiagen) zugegeben, die den DNA-Enhancer-Komplex in Micellen verpacken. Die eigentliche Transfektion findet durch Fusion der Lipide mit der Membran der Zellen statt, wodurch die zu transfizierende DNA ins Innere der Zellen „geschleust“ werden kann. Für die zu transfizierenden CHO-G $\alpha_{16}$ -Zellen stellte sich folgendes Transfektionsprotokoll als optimal heraus: Die Zellen werden 24 h vor der Transfektion in 6-well Schalen mit einer Dichte von  $2 \cdot 10^5$  ausgesät und am Tag der Transfektion sollte eine Dichte von 80% Konfluenz erreicht sein. Die Zellen werden einmal mit PBS gewaschen und 1,6 ml Medium pro Well vorgelegt. Der Transfektionsansatz besteht aus 96  $\mu$ l Puffer EC, 0,4  $\mu$ g DNA, 3,2  $\mu$ l Enhancer. Nach Vortexen und 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 10  $\mu$ l Effecten hinzugegeben. Der komplette Transfektionsansatz wurde anschließend auf die Zellen gegeben und 3 h bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C inkubiert. Nicht aufgenommener Komplex wurde dann über Waschschrte mit PBS entfernt, die Zellen mit frischem Medium versorgt und für 48 h inkubiert.

48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und zur Verdünnung auf 10 cm Schalen überführt. Es erfolgte die Zugabe von Selektionsmedium (Medium incl. 400  $\mu$ g/ml Geneticin), um die stabil transfizierten Zellklone zu selektionieren. Nach etwa 72 h beginnt das Absterben der nicht transfizierten Zellen und nach 5-15 Tagen werden die stabil transfizierten Zellklone als Zellhaufen sichtbar. Wenn die Zellhaufen eine Größe von 50 - 100 Zellen erreicht haben, wurden einzelne Zellklone markiert, mit einer sterilen Pipettenspitze abgesaugt (100  $\mu$ l) und in 24-Well-Schalen überführt. Nach etwa 7 Tagen wurden die konfluent gewachsenen Klone in 25 cm<sup>2</sup> Flaschen überführt und nach Erreichen der Konfluenz als dauerhafte Einfrierkulturen angelegt. Zusätzlich wurden Zellpellets in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei – 80°C für spätere RNA-Expressionsanalysen gelagert.

## **2.6 Kultivierung eukaryotischer Zellen**

Die verwendeten Zelllinien wurden anschließend mit den in Tabelle 4 ausgeführten Zellkultur-Flaschen und Medien kultiviert. Zellen aus flüssigem Stickstoff wurden in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und anschließend in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkultur-Flasche mit 20 ml des entsprechenden Mediums überführt.

Tabelle 4: verwendete Materialien zur Kultivierung der Zellen

Medien und sonst. Zellkulturmaterial	Anbieter, Katalog-Nr.
Nutrient Mixture F-12 (HAM) w L-Glutamin	Life Technologies, 21765-029
RPMI 1640 w/o L-Glutamin	Life Technologies, 31870-074
Fötales Kälberserum	BioWhittaker, 14-701F, Lot-Nr. 7SB0001
PBS Dulbecco's	Life Technologies, 144190-094
Trypsin/EDTA-Lösung (10x)	Life Technologies, 35400-027
10000 µg/ml Penicillin/Streptomycin (100x)	Life Technologies, 15140-114
200 mM (100x) L-Glutamin	Life Technologies, 25030-024
500 mg/ml Geneticin (G418)	Life Technologies, 10131-027
Hygromycin	Life Technologies, 10678-010
Zellkultur-Flaschen	Anbieter, Katalog-Nr.
75 cm <sup>2</sup> Zellkultur-Flaschen, Filterdeckel	Sarstedt, 83.1813.002
175 cm <sup>2</sup> Zellkultur-Flaschen, Filterdeckel	Sarstedt, 83.1812.002
6 well-Platten	Corning, Costar 316
24 well-Platten	Corning, Costar 3524
96 well-Platten	Corning, Costar 3599

### 2.6.1 Verwendete Zelllinien und Kulturmedien

In Tabelle 5 sind die verwendeten Zelllinien und Kulturmedien aufgeführt. Alle Zellen wurden in einer gesättigten Wasserdampf-atmosphäre bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Tabelle 5: verwendete Zelllinien und Kulturmedien

Zelllinie	Charakteristika der Zellen	Verwendetes Kulturmedium
Transfizierte CHO-G $\alpha_{16}$ -BRS-3 (Molecular Devices)	Chinese hamster ovary Zellen, stabil transfiziert mit G $\alpha_{16}$ und hBRS-3, adhären	Nutrient Mixture F12 (HAM), 5% FCS, 200 µg/ml Hygromycin, 400 µg/ml Geneticin, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin
NCI-N 417 (ATCC: CRL-5809)	human, Small cell lung cancer, exprimieren hBRS-3, Suspensionszellen	RPMI 1640, 10% FCS, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin
BHY (DSMZ: ACC 404)	human, oral squamous cell carcinoma, exprimieren hGRP-Rezeptor, adhären	Dulbecco's MEM (4,5 g/l Glucose), 5% FCS, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin
Hat 29 (ATCC: HTB-38)	human, colorectales Adenocarcinom, adhären	McCoy's 5a-Medium, 10% FCS, 1,5 mM L-Glutamin, 1% (Pen/Strep)

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die adhären wachsenden Zellen in den entsprechenden Zellkulturmedien unter sterilen Bedingungen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach Erreichen von 70 – 90 % Konfluenz wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, und mit 1x Trypsin/EDTA bei 37°C vom Kulturflaschenboden gelöst. Nach Abstoppen der Trypsin-Reaktion mit 10 ml frischem Medium incl. FCS wurden die Zellen für 5 min bei 150 g (1000 U/min) zentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und je nach Zelltyp 1:3 – 1:20 in neue Kulturflaschen überführt. Suspensionszellen wurden ohne Trypsin-Behandlung direkt zentrifugiert.

Zum Einfrieren in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, zentrifugiert und mit einer Dichte von 1·10<sup>6</sup> Zellen/ml in Einfriermedium resuspendiert.

<u>Einfriermedium:</u>	Medium	entsprechend der Zelllinie
	FCS	20%
	DMSO	10%

Nach dem Aliquotieren in Einfriergefäße (Cryovial®, Roth) wurden die Zellen durch Isopropanol bei 1°C/min langsam bis auf –80°C abgekühlt (Cryo-Einfriergerät, Nalgene) und innerhalb von 24 h in flüssigen Stickstoff überführt.

## 2.7 Bioassays

### 2.7.1 Intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Messungen

Zur Messung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Änderungen wurde das FLIPR™-System (Fluorimetric Imaging Plate Reader) von Molecular Devices (Sunnyvale, USA) verwendet. Das System besteht aus vier Komponenten: Computer, Argon-Laser, 96-Kanal-Pipettor und einer CCD-Kamera und nutzt die kalziumbindenden und fluoreszierenden Eigenschaften des Farbstoffes Fluo-4 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande). Der Farbstoff wird als Acetoxy-Methyl-Ester (Fluo-4 AM) passiv von den Zellen aufgenommen. Die Permeabilität des Farbstoffes wird durch die Zugabe des Detergenz Pluronic F-127 (Molecular Probes) erhöht. Durch intrazelluläre Esterasen wird der Ester gespalten, so dass er nicht mehr aus den Zellen diffundieren kann und sich in den Zellen anreichert. Eine gewisse Restpermeabilität der freien Säure über Ionenkanäle wird durch die Zugabe von Probenecid verhindert. Der Farbstoff wird mit einem Argon-Laser angeregt und das Fluoreszenzsignal mit der CCD-Kamera detektiert. Das Besondere an diesem System ist der Einfall des Laserlichtes auf die Zellschicht. Und zwar ist der Laser so konzipiert, dass das Anregungslicht von der Seite, und in einem schrägen Einfallswinkel auf die Zellschicht gerichtet ist. Dadurch wird der Anteil möglicher unspezifischer Fluoreszenz sehr gering. Wäre der Lichteinfall von unten auf die Zellen gerichtet, wäre die über den Zellen liegende Pufferschicht für ein höheres Hintergrundsignal ausschlaggebend.

Durch Bindung von freiem, intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  erhöht sich die Fluoreszenz-Intensität des Fluo-4 um mehr als das 100-fache. In Tabelle 6 sind die verwendeten Lösungen für die jeweiligen Zelllinien aufgeführt.

**Tabelle 6: verwendete Lösungen für die jeweiligen Zelllinien im FLIPR-Assay**

Verwendete Lösungen	CHO-G $\alpha_{16}$ -hBRS-3-Zellen	NCI-N417
Waschpuffer: HBSS-Puffer, pH 7,4; 20 mM HEPES	+	+
Beladungsmedium	Waschpuffer inkl. 2 $\mu\text{M}$ Fluo-4 AM, 2,5 mM Probenecid	Zellkulturmedium inkl. 2 $\mu\text{M}$ Fluo-4 AM, 2,5 mM Probenecid

Für die Messungen wurden die CHO-G $\alpha_{16}$ -hBRS-3-Zellen in schwarzen 96 Well Platten (Costar, Großbritannien) mit je 20.000 Zellen pro Well in Kompletmedium ausplattiert und  $\text{in } \text{CO}_2$  unter Standardbedingungen kultiviert. Bevor die Zellen mit Fluo-4-AM beladen wurden, wurden sie einmal mit Waschpuffer gewaschen. Zur Beladung wurden die Zellen für 30 min bei 37°C mit dem Beladungsmedium inkubiert. Die Wells wurden anschließend je dreimal mit Waschpuffer gewaschen und in einem Volumen von 100  $\mu\text{l}$  Waschpuffer 15 min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Messung im FLIPR-System.

Die NCI-N417 Zellen wurden einmal mit Waschpuffer gewaschen, in Beladungsmedium aufgenommen und 30 min bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Danach wurden sie dreimal mit Waschpuffer gewaschen und in 15 ml Waschpuffer aufgenommen. Je 150  $\mu\text{l}$  pro Well werden in schwarzen 96 Well Platten ausplattiert (Zellzahl:  $1 \cdot 10^7$  Zellen/ml), bei 500 U/min zentrifugiert. Nach zehnminütiger Inkubation bei 37°C erfolgt die Messung im FLIPR-System.

Die Anregung der Zellen erfolgte mit einem Argon-Laser bei 488 nm, die Emission wurde bei 516 nm gemessen. Nach dem Start der Datenaufnahme für 30 sec zur Ermittlung einer Basislinie, erfolgte die Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  der Gewebeextrakte, Fraktionen oder synthetischen Substanzen, die in Waschpuffer gelöst wurden. Danach wird für 180 sec der Verlauf der Fluoreszenzänderung gemessen.

#### 2.7.1.1 Verifizierung der biologischen Aktivität (hydrolytische Spaltung durch Subtilisin; Konzentrationsabhängigkeit)

Zur Verifizierung einer spezifischen biologischen Aktivität und um festzustellen, ob es sich dabei um ein Peptid / Protein handelt, wird ein hydrolytischer Abbau durch die Endoprotease Subtilisin durchgeführt. Hierzu werden Aliquots aus den biologisch aktiven Fraktionen entnommen und mit Hydrolysepuffer versetzt. Subtilisin wird im Verhältnis 1:100 (Enzym/Substrat) zugesetzt, um eine möglichst vollständige Hydrolyse zu gewährleisten.

Nach der Inkubation erfolgt die Inaktivierung des Enzyms durch Erhitzen auf 70°C. Die Probe und entsprechende Kontrollen werden dann im FLIPR-Assay (s.o.) getestet. Ist nach der Hydrolyse keine biologische Aktivität zu messen, kann man davon ausgehen, dass es sich um ein Peptid/Protein handelt.

Hydrolysepuffer:                    50 mM Tris-HCl, pH 7,8  
    20 mM CaCl<sub>2</sub>

Inkubation:                         2 h, 37°C

#### *2.7.1.2 Pharmakologische Untersuchungen mit Modulatoren der Signaltransduktion*

Zur Charakterisierung der Signaltransduktion wurden die in Tabelle 7 aufgeführten Substanzen mit den angegebenen Konzentrationen verwendet. Es wurde 10 µM VV-H-7 entweder nach einer Vorinkubationszeit von 10 – 30 min oder direkt mit den Substanzen appliziert. Die intrazelluläre Kalziumausschüttung wurde dann mit dem FLIPR-Assay getestet.

Tabelle 7: verwendete Substanzen zur Charakterisierung der Signaltransduktionskaskade

Substanz	Endkonzentration	Substanz	Endkonzentration
<b>Rezeptorantagonisten</b>		<b>Ca<sup>2+</sup>-Kanal-modulatoren</b>	
<i>Bombesinrezeptor-antagonisten</i>		<i>L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal-Inhibitor</i>	
D-Phe 6, Leu (R)-p-chloro-Phe 14-Bombesin (6-14)	10 µM	Diltiazem	10 µM
D-Phe,Leu-NHEt 13, des-Met14-Bombesin (6-14)	10 µM	Verapamil	10 µM
Somatostatin-Oktapeptid [(D)Nal-Cys-Tyr-(D)Trp-Lys-Val-Cys-Nal-NH <sub>2</sub> ]	10 µM	<i>CRAC-Inhibitor</i>	
<i>Opiodrezeptorantagonisten</i>		Miconazole	10 µM
Naloxone	< 1 µM	<b>PKC-Inhibitoren</b>	
<b>PLC-Inhibitor</b>		Chelerythrin	3 µM
U-73122	3 µM	Bisindoylmaleimid	3 µM
<b>IP3-Rezeptorantagonist</b>		D-erythro-Sphingosin	10 µM
Xestospongine C	20 µM	<b>Phosphoinositid-3-kinase-Inhibitor</b>	
<b>Ca<sup>2+</sup>/ATPase Inhibitor</b>		Ly 294002	3 µM
Thapsigargin	1 µM		
Cyclopiazonsäure	10 µM		

### 2.7.2 Proliferationsassay (WST-1)

Zur Bestimmung der mitogenen Wirkung einer Substanz, kann man u.a. den Tetrazoliumsalz-basierten WST-1 Proliferationsassay (Roche, Mannheim) verwenden. Die Tetrazoliumsalze werden von mitochondrialen Dehydrogenasen zu Formazan umgewandelt. Eine Erhöhung der Lebendzellzahl führt zu einem Anstieg der Gesamtaktivität der Dehydrogenase. Die Erhöhung dieser Enzymaktivität führt zur Erhöhung des gebildeten

Formazans und ist proportional zur Zahl der metabolisch aktiven Zellen. Die Menge des Farbstoffs wird über ein Multiwell-Spektrophotometer (ELISA-Reader) (BioTek-Instruments, USA) bestimmt. NCI-N417 Zellen, transfizierte und nicht-transfizierte CHO-Zellen ( $5 \cdot 10^3$ /well;  $15 \cdot 10^3$ /well) wurden in 96-well Platten im entsprechenden Medium, das 0 % und 2% FCS enthält, ausplattiert und für 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Wechsel des Mediums (ohne FCS) werden die zu testenden Substanzen (VV-H-7 und [DPhe<sup>6</sup>,β-Ala<sup>11</sup>,Phe<sup>13</sup>, Nie<sup>14</sup>]Bombesin(6-14)) in verschiedenen Konzentrationen und 10 % - 20 % FCS appliziert. Nach 48 stündiger Inkubation werden 10 µl WST-1 pro well hinzugegeben und für weitere 3 h bei 37°C inkubiert. Die Absorption des gebildeten Formazans wird bei 450 nm (Referenzwellenlänge 630 nm) mit dem ELISA-Reader gemessen.

## 2.8 Immunowesternblot zur Aufklärung der Signaltransduktion

### 2.8.1 Probenvorbereitung

Um intrazelluläre Proteine (z.B. MAP-Kinase), die an der Signaltransduktion beteiligt sind, zu detektieren, wurden NCI-N417 Zellen 48 h vor der Stimulation in serumfreiem Medium, dem 0,25 % BSA zugesetzt worden ist, kultiviert. Zur Stimulation wurden die Zellen direkt in Eppendorfgefäße überführt und 30 - 60 min stimuliert. Um die Zellen nach der Stimulation zu pelletieren, wurden sie zentrifugiert und mit 75 µl 2x Probenpuffer versetzt.

Die transfizierten CHO G $\alpha_{16}$ -hBRS-3 Zellen wurden in 24 well Platten ausgesät und 24 h in FCS haltigem Medium kultiviert. Zwei Stunden vor der Stimulation wurden die Zellen serumfrei gesetzt. Nachdem die Zellen 30 – 60 min stimuliert worden sind, wurde 100 µl 2x Probenpuffer zugesetzt.

<u>2x Probenpuffer:</u>	1 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
	1 ml 0,5 M Imidazol, pH 6,8
	4 ml 10 % SDS
	1 ml Glycerin
	0,2 ml $\beta$ -Mercaptoethanol
	0,8 ml 0,1 % Bromphenolblau

Die durch den hohen Gehalt an DNA zähe Zell-Lysis-Flüssigkeit wurde mit je drei mal 2 sec bei höchster Leistung mit einem Zell-Sonifizierer (Sonics & Materials, Danbury, Connecticut, USA) homogenisiert. Anschließend wurden die Proben 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis kurz abgekühlt und mit einer Tischzentrifuge 1 min bei 13.000 g zentrifugiert. Die Proben wurden entweder direkt aufs Gel aufgetragen oder bei – 20°C gelagert.

### 2.8.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurde das System nach Laemmli (1970) verwendet. Als Gelapparatur diente die Mini-Protean II-Kammer (BIO-Rad, München).

<u>10% Polyacrylamid-Trenngel:</u>	2,5 ml 38% Acrylamid, 2% Bisacrylamid (T = 40/C = 2), Rotiphorese Gel 40 (Roth, Karlsruhe) 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 4 ml 50 % Glycerin 850 µl A. bidest. 100 µl 10 % SDS 10 % Ammoniumpersulfat 5 µl TEMED
<u>4% Sammelgel:</u>	488 µl 38% Acrylamid, 2% Bisacrylamid (T = 40/C = 2), Rotiphorese Gel 40 (Roth, Karlsruhe) 1,25 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 3,05 ml A. bidest. 100 µl 10 % SDS 10 % Ammoniumpersulfat 5 µl TEMED
<u>Elektrodenpuffer:</u>	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS

Nach dem Auftragen der Proben in die Geltaschen wurden die Proteine für 20 min bei 80 V und anschließend für 1,75 h bei 150 V elektrophoretisch getrennt. Als Molekulargewichtsstandard dient der See-Blue® Prestained Standard (Invitrogen, USA). Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden die Glasplatten voneinander getrennt, das Sammelgel abgeschnitten und das Gel auf eine vorbereitete PVDF-Membran (s.u.) gelegt, damit die Proteine auf diese Membran geblottet werden können.

### 2.8.3 Western-Immunoblot-Analyse

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen wurden die Proben durch ein Spannungsfeld mit Hilfe einer Blottingkammer (Transblot SD, BioRad, München) auf eine Membran transferiert. Zum Transfer der elektrophoretisch getrennten Proteine wurde eine PVDF-Membran (0,2 µm, NEN und Filterpapier (Whatman 3MM)) in der Größe des Gels zugeschnitten.

Vor Beginn des Transfers werden die PVDF-Membranen für 5 min in 100 % Methanol aktiviert, danach in Blotpuffer äquilibriert. Die Filterpapiere werden ebenfalls in Blotpuffer äquilibriert.



Tabelle 8: verwendete Antikörper

Primäre Antikörper				
	Beschreibung/Epitop	Spezies	Eingesetzte Verdünnung	Hersteller
pMAP-Kinase 42/44	Phospho-MAP-Kinase, gegen phosphoryliertes T202 / Y204	Kaninchen	1:2000	New England Biolabs, USA
p125 <sup>FAK</sup>	Phospho-fokale Adhäsionskinase, gegen Y397	Maus	1:1000	BD Biosciences
Sekundärer Antikörper				
Anti- Kannichen IgG	Affinitätsgereinigt HRP- gekoppelt	Ziege	1:25000	New England Biolabs, USA
Anti-Maus IgG	HRP-gekoppelt	Ziege	1:30000	New England Biolabs, USA

Zur Chemilumineszenz-Detektion des primären Antikörpers wurde die Membran kurz und anschließend dreimal je 5 min mit TBS-Tween gewaschen und mit den sekundären Antikörpern (gegen den primären Antikörper) in 1x Roti®-Block-Lösung für 1 h inkubiert. Nach nochmals dreimaligem Waschen für je 5 min mit TBS-Tween wurde die Membran kurz mit Wasser abgespült und das West-Dura-Detektionsreagenz (Pierce®) appliziert. Nach einminütiger Inkubation wurde die Membran in Zellofanfolie luftblasenfrei verschlossen und je nach Intensität des Signals 30 sec bis 24 h auf einen Film (CL-X-Posure, Pierce®) gelegt.

West-Dura-Detektionsreagenz (Super Signal West Dura Extended Duration Substrate, Pierce®):

750 µl/Membran      Super Signal West Dura Stable  
PeroxidasePuffer

750 µl/Membran      Super Signal West Dura  
Luminol/Enhancer-Lösung  
auf RT erwärmen

Film-Entwickler (1:25):

100 ml      Rodinal (Agfa)

2400 ml      H<sub>2</sub>O

Film-Fixierer (1:7):

250 ml      Tetenal Superfix 1 (Agfa)

1500 ml      H<sub>2</sub>O

Zur Quantifizierung des jeweils eingesetzten Proteingehalts, wurden die Membranen mit ddH<sub>2</sub>O gespült und in India Ink-Lösung (Pelikan, Hannover) 2 h bei RT gefärbt. Nach dem Spülen mit ddH<sub>2</sub>O konnte die eingesetzte Proteinmenge dokumentiert werden.

India Ink-Lösung:

50 ml

TBST

0,15 ml

Fount India Ink (Pelikan)

### 3 Ergebnisse

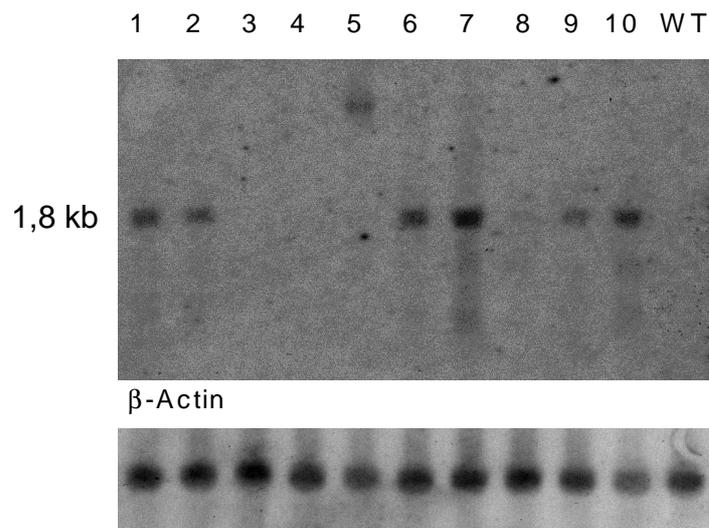
#### 3.1 Etablierung der hBRS-3 überexprimierenden CHO-Zellen

Zum Screening von Substanzbibliotheken oder etablierten Peptidbanken ist es notwendig ein stabiles und zuverlässiges Detektionssystem zu besitzen. Dazu wurden stabile Zelllinien etabliert und Einzelzellklone selektiert. In der Arbeit wurde ein Standardprotokoll zur Transfektion von CHO-Zellen mit Effectene entwickelt, das im wesentlichen auf den Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) beruht (s. 2.5.3). Als optimal für die Transfektion stellte sich ein Verhältnis von DNA [ $\mu\text{g}$ ] : Enhancer [ $\mu\text{l}$ ] : Effecten [ $\mu\text{l}$ ] von 1 : 8 : 25 heraus. Zur Selektion der Zellen wurde dem Medium Geneticin zugesetzt, um die stabil transfizierten Zellklone zu selektionieren. Nach etwa 72 h beginnt das Absterben der nicht transfizierten Zellen und nach 5-15 Tagen wurden die transfizierten Zellklone als Zellhaufen sichtbar. Mit der Selektion der Zellklone wurde erst begonnen, nachdem die entsprechenden Kontrollzellen (CHO-G $\alpha_{16}$ ) abgestorben waren. Die Zellhaufen wurden nach Erreichen einer Größe von ca. 50 - 100 Zellen markiert, mit einer sterilen Pipettenspitze abgesaugt, in 24-Well-Schalen überführt und als Einzelzellklone (EK) bezeichnet, da der Zellhaufen aus einer singulären Zelle entstanden ist. Jeweils 14 EK wurden in 24-Well-Schalen überführt, um mindestens 10 EK für spätere Analysen zur Verfügung zu haben. Nach etwa 7 Tagen wurden die konfluent gewachsenen EK in 25 cm<sup>2</sup> Flaschen und nach Erreichen der Konfluenz in 75 cm<sup>2</sup> Flaschen überführt.

Das wichtigste Merkmal der Selektion war die Überprüfung der Transkription des hBRS-3-Gens mit Hilfe von Northern Blots. Ausgewählt für die weiteren Untersuchungen wurden die Klone, die eine hohe mRNA-Expressionsrate aufwiesen. Ist eine Transkription nachgewiesen worden, folgte die Kontrolle der Funktionalität der entsprechenden Einzelzellklone im FLIPR-Assay. Die Zellen sollten eine möglichst hohe Änderung der Fluoreszenz und eine Konzentrationsabhängigkeit nach Applikation des synthetischen Liganden [D-Phe<sup>6</sup>, - $\beta$ -Ala<sup>11</sup>, -Phe<sup>13</sup>, -Nle<sup>14</sup>] Bombesin(6-14) zeigen. Zellen, die nicht mit dem hBRS-3 transfiziert wurden, durften im FLIPR-Assay kein positives Signal erzeugen.

##### 3.1.1 Northern Blot Analyse zur mRNA-Expression des hBRS-3

Nach Abschluss der Selektion konnten die Zellen in 75 cm<sup>2</sup> Flaschen überführt und nach Erreichen der Konfluenz für Northern Blots vorbereitet werden.

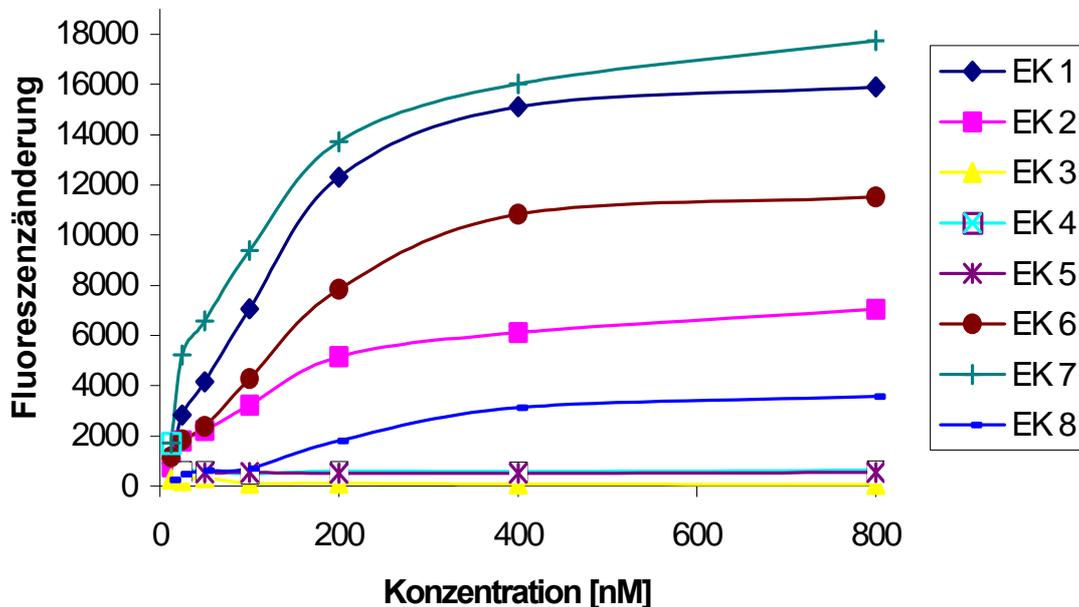


**Abbildung 3: Northern Blot-Analyse von verschiedenen, mit dem hBRS-3 transfizierten CHO-G<sub>a16</sub>-Zellklonen**

*In der Abbildung ist die Transkription des hBRS-3-Gens der verschiedenen Einzelzellklone dargestellt. V.l.n.r.: 1 – 10 = Einzelklon 1 – 10, WT: Wildtyp CHO-Zellen. Zur Abschätzung der eingesetzten RNA-Menge wurde die Transkription des **b-Actin**-Gens überprüft*

Es wurden insgesamt 10 Klone ausgewählt, wovon sechs im Northern Blot ein positives Signal mit der erwarteten Größe von 1,8 kb erzeugten (s. Abbildung 3).

Zusätzlich wurden die Einzelzellklone 1 – 8 im FLIPR-Assay auf ihre Responsivität mit dem synthetischen Bombesinanalogen [D-Phe<sup>6</sup>,β-Ala<sup>11</sup>,Phe<sup>13</sup>,Nle<sup>14</sup>] Bombesin(6-14) getestet (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Dosis-Wirkungskurve der selektierten hBRS-3-Einzelzellklone**

Die verschiedenen Einzelzellklone wurden mit dem synthetischen Liganden [D-Phe<sup>6</sup>,-b-Ala<sup>11</sup>, -Phe<sup>13</sup>, -Nle<sup>14</sup>] Bombesin(6-14) in den abgebildeten Konzentrationen getestet.

Es konnte gezeigt werden, dass die durch [D-Phe<sup>6</sup>,-β-Ala<sup>11</sup>, -Phe<sup>13</sup>, -Nle<sup>14</sup>] Bombesin(6-14) induzierte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationserhöhung mit dem Einzelzellklon EK-7 sowohl am größten ( $f_{max} = 17000$  Einheiten) als auch am effektivsten war ( $EC_{50} = 50$  nM). Dieser Einzelzellklon zeigte somit das beste Signal-Rausch-Verhältnis, so dass alle folgenden Experimente mit diesem Einzelzellklon 7 durchgeführt wurden. Die Einzelzellklone EK 3, EK 4 und EK 5 zeigten keine durch den Agonisten induzierte Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationserhöhung. Diese mit dem funktionellen Assay erhaltenen Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen der Northern Blot-Analyse. Die Transkription des hBRS-3 Gens ist bei dem Einzelzellklon 7 am größten und konnte bei den Einzelzellklonen 3, 4 und 5 nicht nachgewiesen werden (s. Abbildung 3).

Interessanterweise zeigte sich, dass es nach Erreichen einer hohen Passagenzahl der Zellen zu einer Abnahme der Transkription des transfizierten hBRS-3 Gens kam. Das ließ sich sowohl in einer Verringerung der Expressionsstärke im Northern Blot als auch durch

Abnahme des durch das synthetische Bombesinanalogue induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals im FLIPR-Assay nachweisen.

### **3.2 Aufreinigung und Identifizierung peptiderger Liganden für den Orphan-Rezeptor hBRS-3**

Ziel dieser Arbeit war die Isolierung peptiderger Liganden für den humanen Orphanrezeptor BRS-3 aus etablierten Peptidbanken. Es sind verschiedene Read-out-Systeme und Screeningsysteme zur Identifizierung von Liganden für Orphanrezeptoren beschrieben worden. 80% der Liganden für Orphanrezeptoren wurden durch die Messung der transienten  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentrationsänderung identifiziert. Über 50% dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung wurden mit dem FLIPR-System (Howard *et al.*, 2001) durchgeführt. Dieses System ermöglicht die Messung im „96-well“ Format mit simultaner Messung aller „96 wells“, wodurch ein großer Probendurchsatz erreicht wird.

Die Sensitivität der Kalziumdetektion ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Eine wichtige Rolle spielen hierbei sowohl der gewählte Fluoreszenzfarbstoff, der Beladungszustand der Zellen als auch physiologische Faktoren wie pH-Wert,  $\text{CO}_2$ -Gehalt und Temperatur. Es wurden Versuche mit unterschiedlichen Fluo-4 AM Konzentrationen (1-4  $\mu\text{M}$ ), Beladungszeiten (20-60 min) und unterschiedlichen FCS-Konzentrationen im Beladungsmedium durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Beladungsdauer von 30 min ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) mit 1-2  $\mu\text{M}$  Fluo-4 für transfizierte CHO-Zellen optimal ist. Eine Erhöhung der Farbstoffkonzentration und eine Verlängerung der Inkubationszeit zeigten keinen signifikanten Unterschied in der durch den peptidergen Agonisten induzierten Fluoreszenz.

#### **3.2.1 Primäres Screening mit etablierten Peptidbanken**

In Abhängigkeit vom Expressionsmusters des hBRS-3 wurden Peptidbanken für das primäre Screening ausgewählt. Dieses Screening wurde mit den oben beschriebenen CHO- $\text{G}\alpha_{16}$ -hBRS-3-Zellen durchgeführt. Als Kontrollzelllinien dienten Orphanrezeptoren mit einem ähnlichen Expressionsmuster (z.B. GPR34).

##### **3.2.1.1 Primäres Screening der Hämofiltrat-Peptidbank (HFPB)**

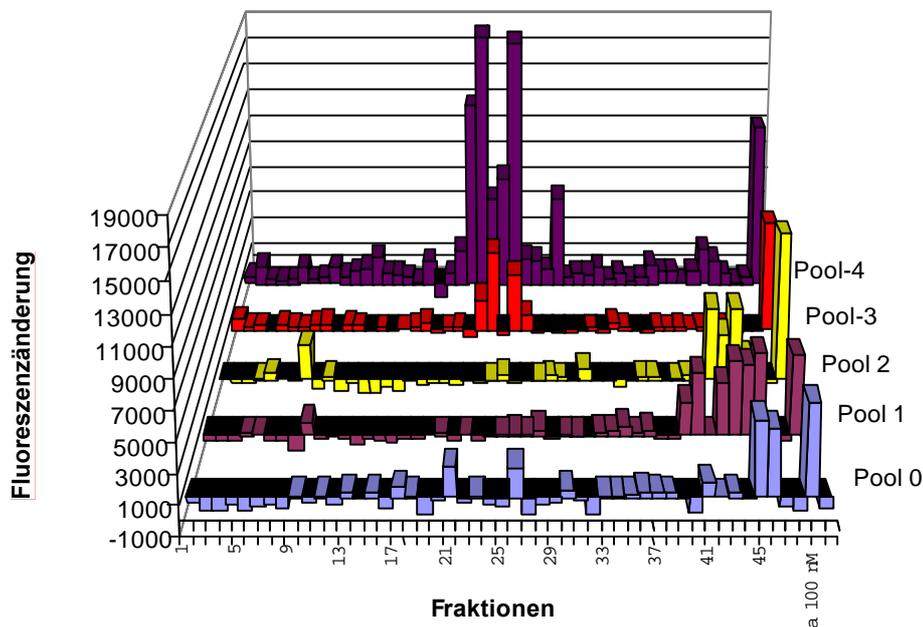
Löslichkeitsexperimente und Erfahrungen aus vorangegangenen Isolierungen mit humanem Hämofiltrat zeigten, dass die eingesetzten Aliquotmengen zwischen 100 ml und 500 ml liegen sollten. Das primäre Screening der Hämofiltratbank wurde somit mit den Äquivalentmengen 500 ml, 250 ml und 100 ml in Duplikaten durchgeführt. Mit diesem Aufbau des Experiments konnte keine spezifische biologische Aktivität für den hBRS-3 detektiert werden.

### 3.2.1.2 Primäres Screening der Schweinegehirn-Peptidbank (pBPB)

Die gewonnenen Erfahrungen bei dem Screening mit der Schweinehirnbank zeigten, dass die zu verwendenden Aliquotmengen zwischen 1,5 g und 12 g Äquivalent liegen sollten. Das Primärscreening der Schweinegehirnbank wurde mit den Äquivalentmengen 1,5 g, 3 und 6 g in Duplikaten durchgeführt. Es konnte eine biologische Aktivität in pH-Pool 5, Fraktion 15-17, detektiert werden. Im weiteren Verlauf der Reinigung konnte die Aktivität jedoch nicht wiedergefunden werden.

### 3.2.1.3 Primärscreening der humanen Plazenta-Peptidbank (hPPB)

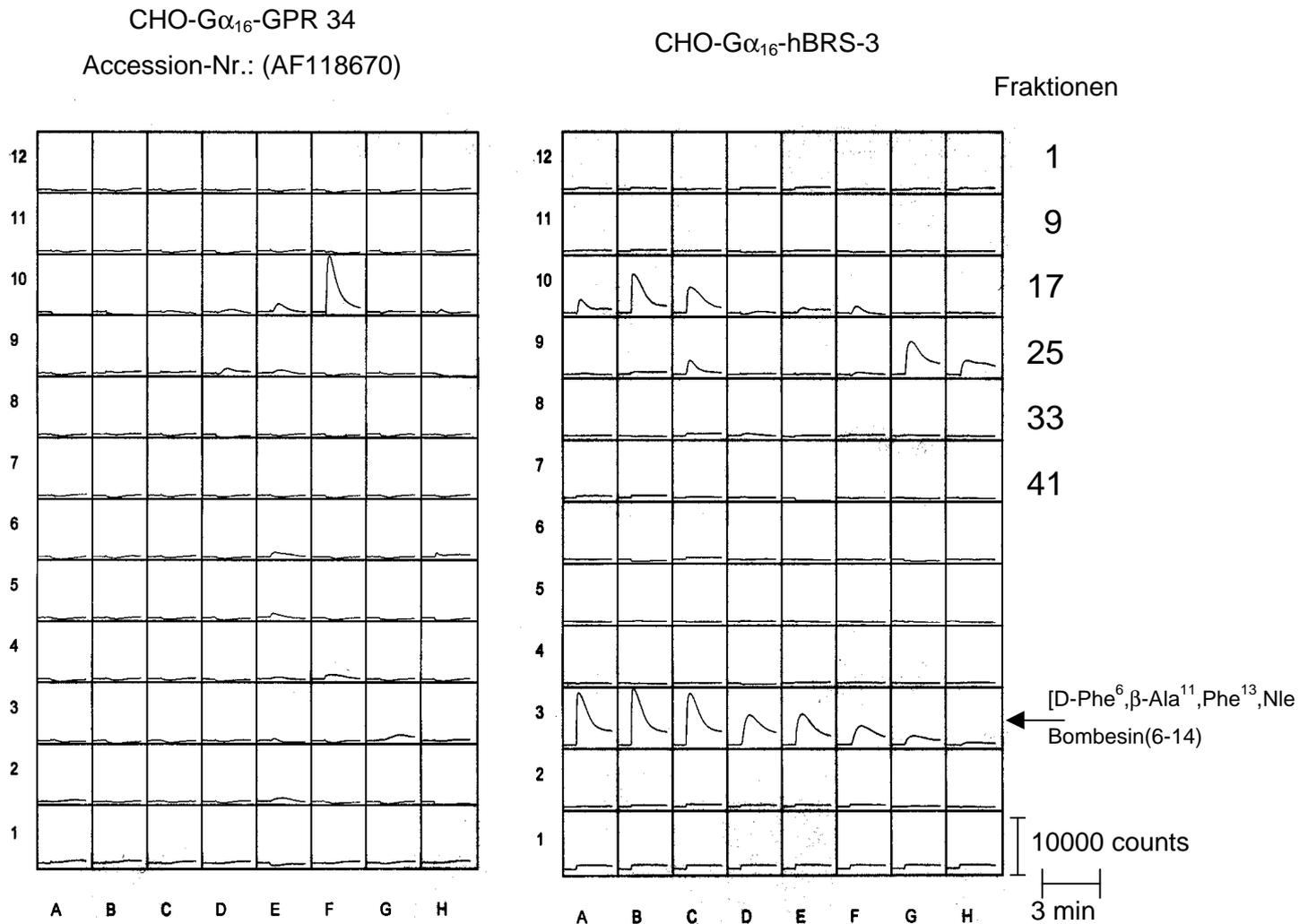
Das primäre Screening der Plazentapeptidbank zeigte, dass die Fraktionen 22, 23 und 25, 26 des pH-Pool 4 und pH-Pool 3 (500 mg Plazentapeptidbank-Äquivalent [PPBÄ]) eine transiente  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsänderung auf CHO-G $\alpha_{16}$ -hBRS-3 Zellen hervorriefen. Abbildung 5 zeigt die Verteilung der biologischen Aktivitäten im Primärscreening. Dargestellt ist die durch Fraktionen der Peptidbank (pH-Pool 4) induzierte Fluoreszenz mit CHO-G $\alpha_{16}$ -hBRS-3 Zellen versus CHO-G $\alpha_{16}$ -GPR 34 Zellen.



**Abbildung 5: Verteilung der biologischen Aktivitäten im Primärscreening der Plazentapeptidbank**

Präsentiert ist das Primärscreening der Plazentapeptidbank. Dargestellt ist die durch 500 mg Gewebeäquivalente induzierte Fluoreszenzänderung mit CHO-G $\alpha_{16}$ -hBRS-3 Zellen versus CHO-G $\alpha_{16}$ -GPR 34 Zellen. Als Kontrolle wurde 100 nM [D-Phe<sup>6</sup>, -b-Ala<sup>11</sup>, -Phe<sup>13</sup>, -Nle<sup>14</sup>] Bombesin(6-14) eingesetzt

Abbildung 6 zeigt beispielhaft eine originale Onlineregistrierung der Liganden-induzierten transienten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsveränderung mit dem FLIPR-System im Primärscreening des pH-Pools 4 der PPB.



**Abbildung 6: originale Onlineregistrierung der Liganden-induzierten transienten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsveränderung mit dem FLIPR-Assay**

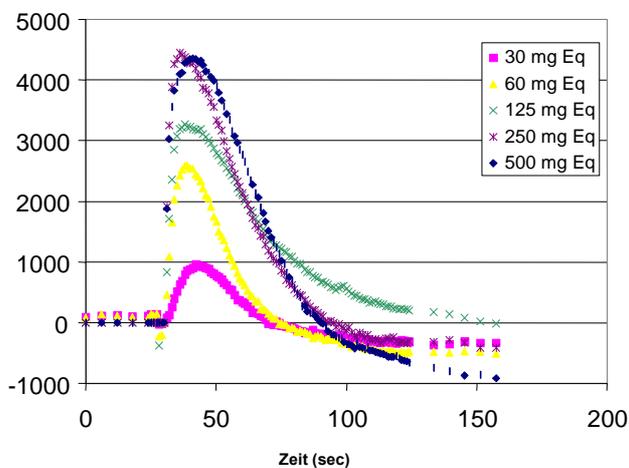
Die Fraktionen 1 – 48 des Pools 4 der Plazentapeptidbank mit einer Gewebe-Äquivalentmenge von 500 mg wurden v.r.n.l. auf die Platte aufgetragen (Reihe 12 – 7). Die Fraktionen 22, 23 und 25, 26 zeigen gegenüber der Kontrolle (GPR34) eine eindeutige Erhöhung der Fluoreszenz und damit eine Änderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Der synthetische Ligand [D-Phe<sup>6</sup>,-b-Ala<sup>11</sup>, -Phe<sup>13</sup>, -Nle<sup>14</sup>] Bombesin(6-14) wurde in einer absteigenden Konzentrationsreihe von  $10^{-6}$  M bis  $10^{-9}$  M eingesetzt (Reihe 3).

### 3.2.1.4 Verifizierung der biologischen Aktivität

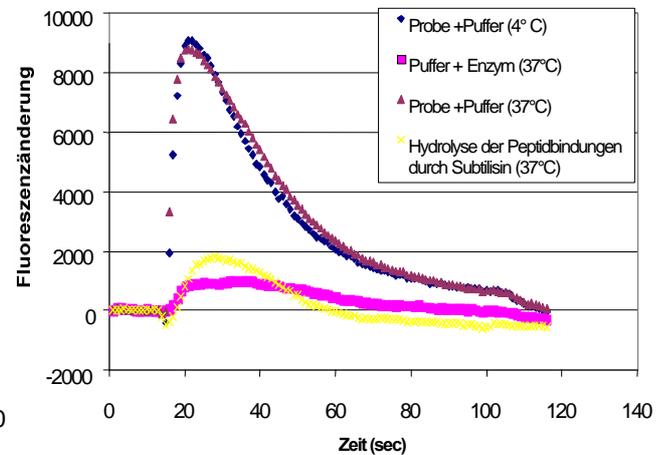
Zur Überprüfung einer spezifischen Aktivität wurden verschiedene Kontrollexperimente festgelegt. Zum einen sollten experimentell bedingte Artefakte ausgeschlossen werden, zum anderen geben diese Experimente erste Hinweise auf die biologisch-chemische Struktur des potentiellen endogenen Liganden.

Die Spezifität einer detektierten Aktivität wurde durch Reproduzierbarkeit, Konzentrationsabhängigkeit sowie die Abwesenheit des induzierten Signals in Kontrollzelllinien (Zelllinien, die einen anderen OR exprimieren oder Wildtypzellen) verifiziert. Zusätzlich kann durch eine enzymatische Hydrolyse der Peptidbindungen mit Hilfe der Protease Subtilisin gezeigt werden, daß es sich bei dem Liganden um ein Peptid / Protein handelt. Sowohl die biologische Aktivität von Fraktion 22/23 als auch die biologische Aktivität von Fraktion 25/26 aus pH-Pool 4 (Plazentapeptidbank) ließen sich dosis-abhängig, reproduzierbar und hydrolysierbar darstellen (Abbildung 7).

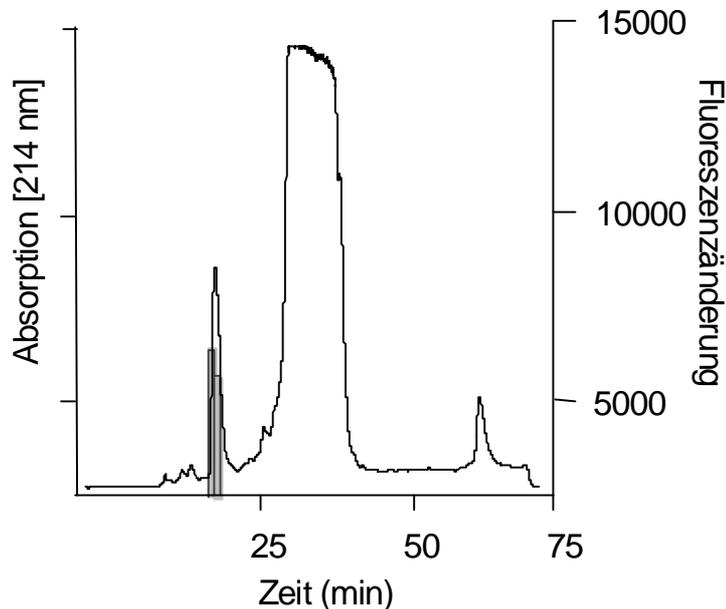
a)



b)



c)



**Abbildung 7: Verifizierung der identifizierten biologischen Aktivitäten**

a) Dosis-Wirkungskurven der Aktivitäten (Original Registrierung) b) Hydrolyse des Peptids durch Subtilisin c) Biologische Aktivitätsverteilung nach dem ersten Chromatographieschritt

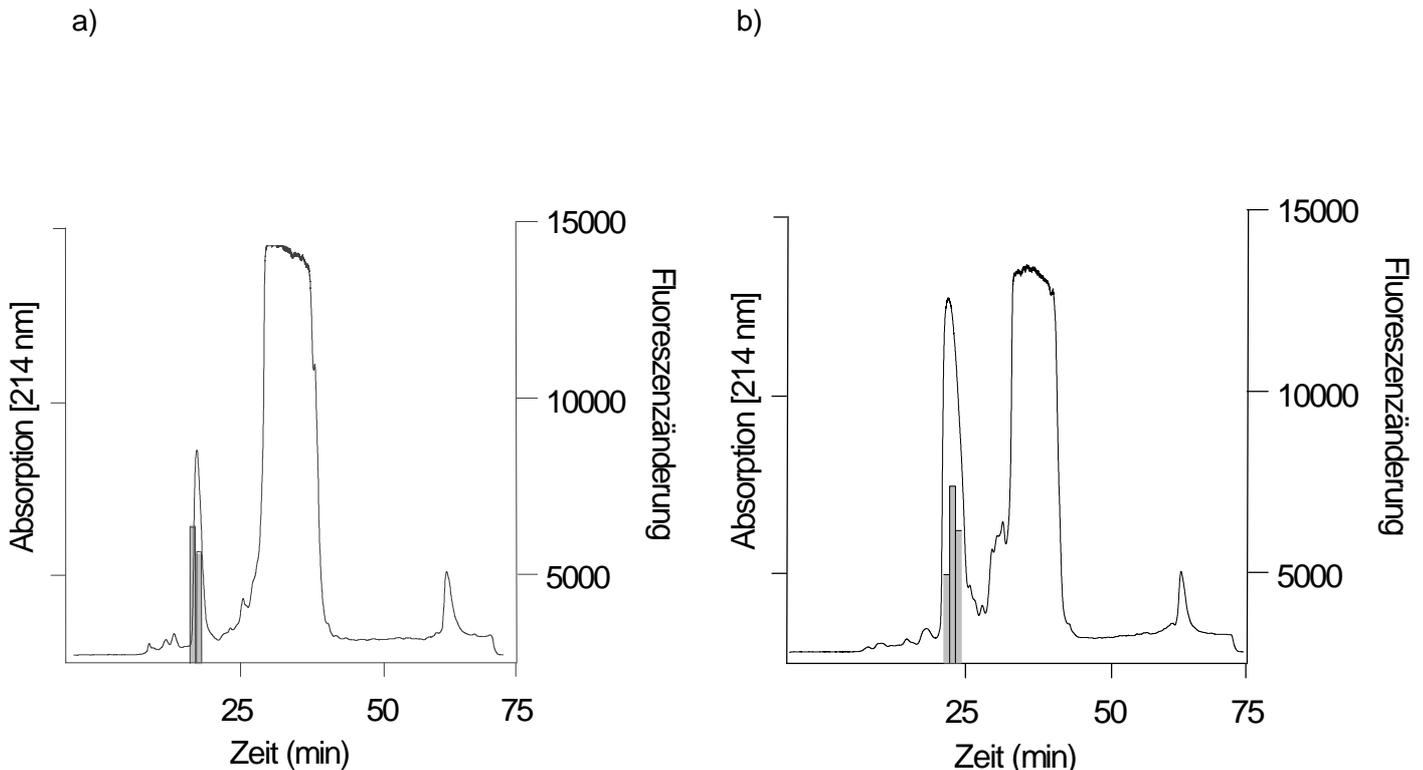
Für die im Screening der Plazentapeptidbank (PPB) identifizierte biologische Aktivität konnte zum einen eine Dosisabhängigkeit gezeigt werden (Abbildung 7a), zum anderen zeigte die enzymatische Hydrolyse durch Subtilisin einen eindeutigen Verlust der biologischen Aktivität (Abbildung 7b). Zusätzlich konnte durch den nachfolgenden Isolierungsschritt gezeigt werden, dass sich die spezifische biologische Aktivität fraktionieren und erneut detektieren ließ (Abbildung 7c). Diese Resultate ließen darauf schließen, dass es sich bei dieser Aktivität um eine peptiderge Substanz handeln muss.

### 3.3 Isolierung der Liganden des hBRS-3

#### 3.3.1 Isolierungsschritt 1

Die so charakterisierten Aktivitäten der Fraktionen 22, 23 und 25, 26 aus pH-Pool 4 wurden unter optimierten Bedingungen über RP-C18-Chromatographie weiter gereinigt. Durch den Pufferaustausch von Acetonitril/HCl gegen Methanol/HCl und durch Stauchung des Elutionsgradienten auf 1% Laufmittel B/min konnten ca. 90% der biologisch inaktiven Peptide abgetrennt werden. In Abbildung 8 ist beispielhaft das Chromatogram von Fraktion 22, 23 (a)

und Fraktionen 25, 26 (b) dargestellt. 500 mg Gewebeäquivalent der erhaltenen Unterfraktionen wurden im FLIPR-Assay eingesetzt. In den Unterfraktionen 10 und 11 der Fraktionen 22/23 bzw. 13-15 der Fraktionen 25/26 konnte eine biologische Aktivität nachgewiesen werden. Aufgrund des hohen Peptidgehalts der pH-Pool Fraktionen mussten insgesamt 10 bzw. 5 identische Chromatographien durchgeführt werden.



**Abbildung 8: Chromatographische Subfraktionierung der Fraktion 22, 23 (a) und Fraktionen 25, 26 aus pH-pool 4 (b)**

*a) Dargestellt ist exemplarisch das Chromatogramm der aufbereiteten Fraktion 22, 23 und der Fraktionen 25, 26 b) über eine präparative RP-C18 Säule. Die eingezeichneten Balken zeigen jeweils die beiden biologisch aktiven Fraktionen 10 und 11 (a) bzw. die Fraktionen 13-15 (b), die im Bereich von 38 % bzw. 40 % Puffer B eluieren.*

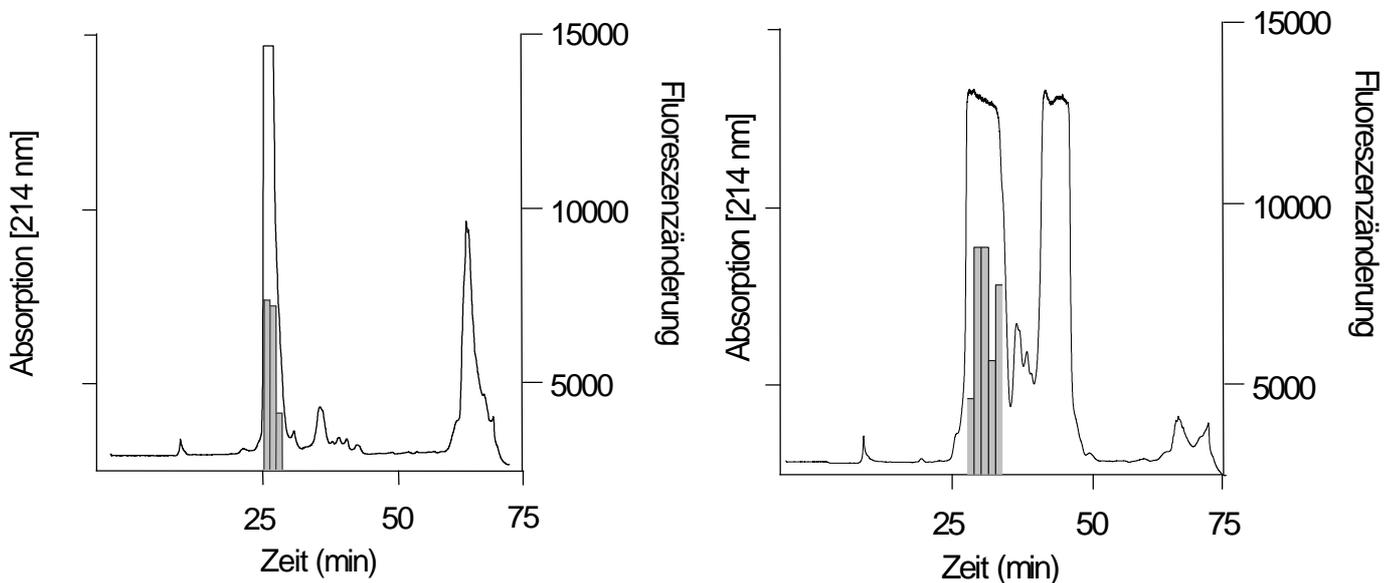
### 3.3.2 Isolierungsschritt 2

Aus den jeweils identischen Chromatographien wurden die biologisch aktiven Fraktionen vor dem folgenden Aufreinigungsschritt vereinigt und mit 0,1 % TFA verdünnt. Die weitere Aufarbeitung des biologisch aktiven Materials erfolgte in zwei bzw. einem Lauf, über die im vorherigen Schritt verwendete RP C-18 Säule. Durch den Austausch des Elutionsmittels von Methanol zu Acetonitril und der Stauchung des Gradienten auf 0,6 % Laufmittel B/min konnte eine weitere Abtrennung von nicht aktivem Material erreicht werden. (Abbildung 9). In dem

die Aufreinigung begleitenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Assay konnten drei bzw. fünf biologisch aktive Fraktionen detektiert werden (Fraktionen 12-14, bzw. 13-17).

a)

b)

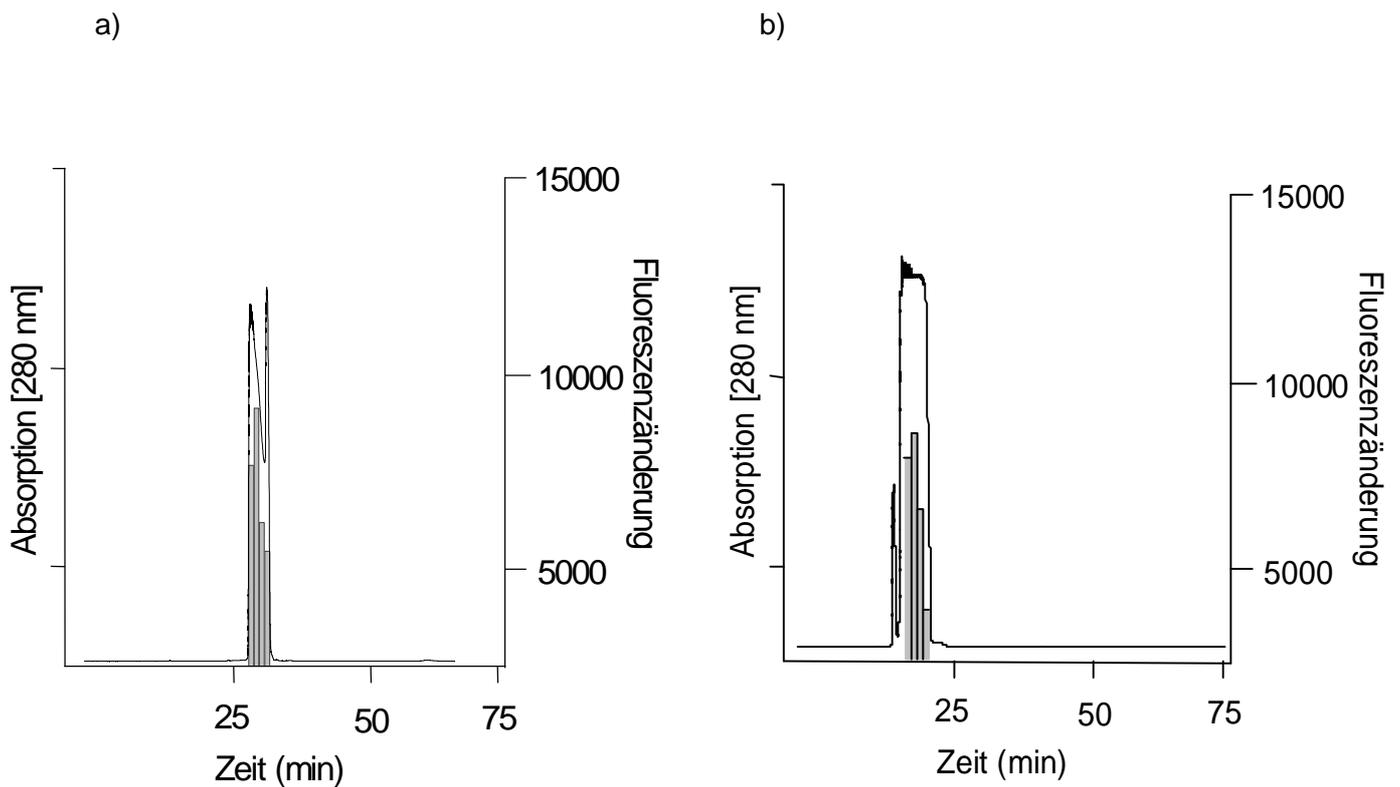


**Abbildung 9: Chromatographische Subfraktionierung der gepoolten Fraktionen 10/11 (a) und 13-15 (b)**

Dargestellt ist exemplarisch eines der Chromatogramme der zwei Läufe der vereinigten Fraktionen 10 und 11 a) bzw. 13-15 b) über eine -präparative RP-C18 Säule. Die eingezeichneten Balken stellen die biologisch aktiven Fraktionen 12-14 a) bzw. 13-17 b) dar, die eine transiente  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsänderung hervorriefen.

### 3.3.3 Isolierungsschritt 3

Die aktiven Fraktionen 12-14 bzw. 13-17 wurden vor dem dritten Aufreinigungsschritt vereinigt und über eine semi-präparative RP-C4 Säule getrennt. Ein Gradient mit einer Steigung von 0,8% Laufmittel B/min erwies sich als optimal. Für den begleitenden FLIPR-Assay wurden Fraktionen entsprechend 1,1 g Gewebeäquivalent getestet. Die Fraktionen 32-35 bzw. 17-21 konnten als biologisch aktiv identifiziert werden (Abbildung 10).

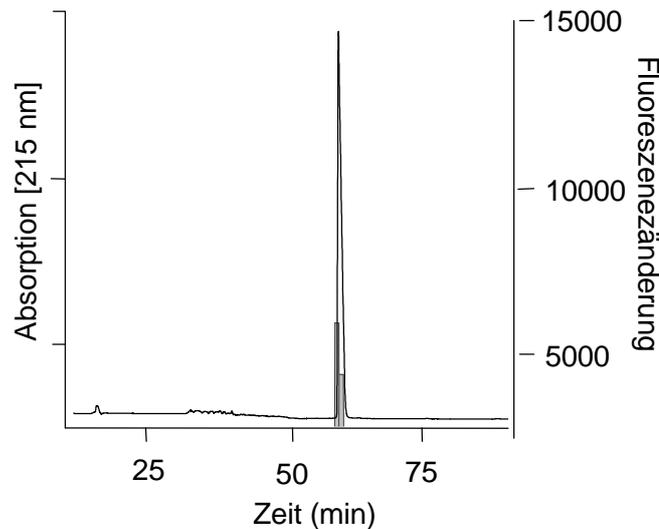


**Abbildung 10: Chromatographische Subfraktionierung der gepoolten Fraktionen 12-14 (a) und 13-17**

*Dargestellt sind die Chromatogramme der gepoolten Fraktionen 12-14 (a) bzw. 13-17 (b) auf einer semi-präparativen RP-C4-Säule. Die Balken stellen die biologisch aktiven Fraktionen 32-35 bzw. 17-21 dar, die im Bioassay eine Fluoreszenzänderung hervorriefen.*

#### 3.3.4 Isolierungsschritt 4

Der vierte Isolierungsschritt über eine analytische RP C18 brauchte nur für die Aufreinigung aus den Fraktionen 22/23 durchgeführt werden. Es wurde die Fraktion 33 des Isolierungsschritts 3 mit der höchsten biologischen Aktivität subfraktioniert. Dabei stellte sich heraus, dass eine substantielle Abtrennung von nicht aktivem Material nicht erreicht werden konnte. Für den begleitenden FLIPR-Assay wurden Fraktionen entsprechend 1,1 g Gewebeäquivalent getestet. Die Fraktionen 1 und 2 konnten als biologisch aktiv identifiziert werden (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Chromatographische Subfraktionierung der Fraktion 33**

Dargestellt ist das Chromatogramm der Fraktionen 33 mit einer analytischen RP-C18-Säule. Die Balken stellen die biologisch aktiven Fraktionen 1 und 2 dar, die im Bioassay eine Fluoreszenzänderung hervorriefen.

### 3.4 Identifizierung des biologisch aktiven, peptidergen Liganden

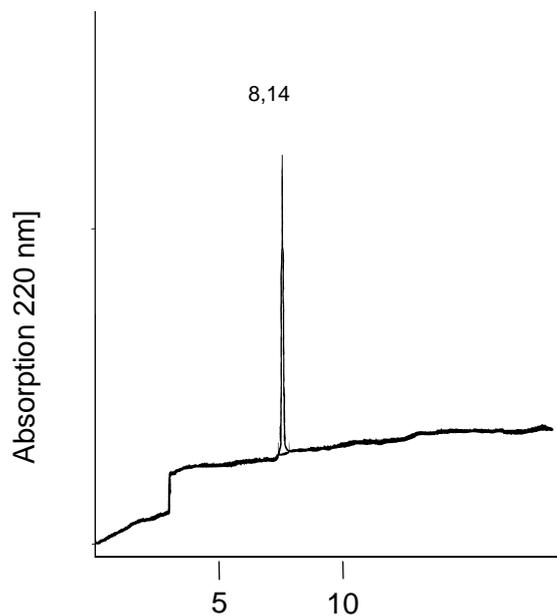
Die Reinheit der biologisch aktiven Fraktion 1 wurde mit Hilfe der Kapillarzonen-elektrophorese bestimmt. Das aufgenommene Elektropherogramm zeigt einen einzelnen Peak bei einer Retentionszeit von 8,14 min (Abbildung 12a).

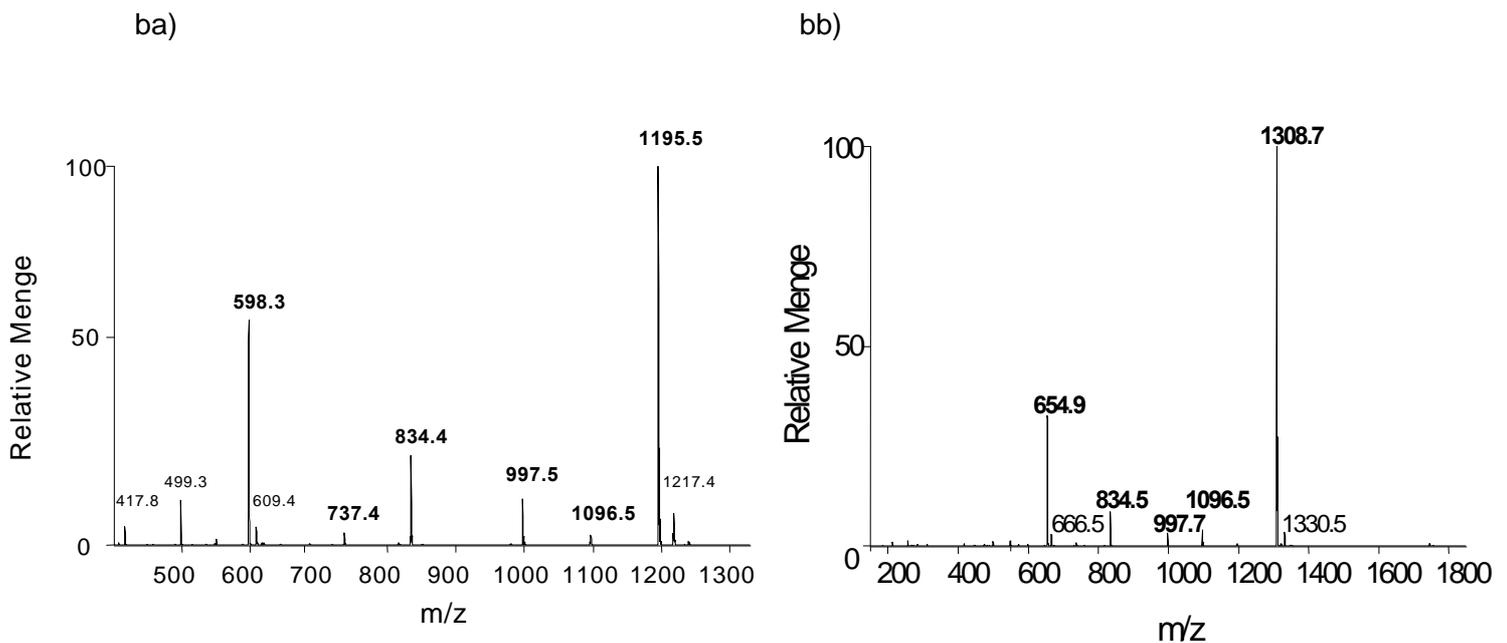
Zur weiteren Charakterisierung wurden die Proben massenspektrometrisch analysiert und anschließend chemisch sequenziert. In Abbildung 12ba) ist das ESI-Massenspektrum der biologisch aktiven Fraktion 1 gezeigt. Das Peptid mit der Masse 1195,5 Da ist über zwei Ionenspezies (Ladungszustände  $(M+H)^{2+}$  und  $(M+H)^{+}$ ) dargestellt. Zusätzlich sind die Massen der Fragmente des Peptids mit 1096,5 Da, 997,5 Da, 834,4 und 737,4 Da hervorgehoben. Dieses Fragmentmuster entspricht der Sequenz VVYP. Zusammengefasst mit der spezifischen Masse 1195,5 Da ergibt sich die Sequenz VVYPWTQRF. Diese Sequenz entspricht VV-Hämorphin-7, einem Fragment (33-41) der  $\beta$ -Kette humanem Hämoglobins. Durch die N-terminale-Sequenzierung konnte die Aminosäuresequenz bestätigt werden. Die Auswertung mit der Sherpa Software ergab eine molekulare Masse von 1196,38 Da, die gut mit den Ergebnissen der ESI-Massenbestimmung übereinstimmt.

In Abbildung 12bb) ist das ESI-Massenspektrum der biologisch aktiven Fraktion 18 (s. Isolierungsschritt 3) dargestellt. Das Peptid mit der Masse 1308,5 Da ist ebenfalls über zwei Ionenspezies (Ladungszustände  $(M+H)^{2+}$  und  $(M+H)^{1+}$ ) dargestellt. Zusätzlich sind die

Massen der Fragmente des Peptids mit 1096,5 Da, 997,7 Da und 834,4 Da hervorgehoben. Dieses Fragmentmuster entspricht der Sequenz LVVY. Zusammengefasst mit der spezifischen Masse 1308,7 Da ergibt sich die Sequenz LVVYPWTQRF. Diese Sequenz entspricht LVV-Hämorphin-7, damit um ein Leucin verlängert und ebenfalls ein Fragment (32-41) der  $\beta$ -Kette des humanen Hämoglobins. Durch die N-terminale-Sequenzierung konnte die Aminosäuresequenz bestätigt werden. Die Auswertung mit der Sherpa Software ergab eine molekulare Masse von 1308,54 Da, die mit den Ergebnissen der ESI-Massenbestimmung korreliert.

a)





ca)  
 Sequenz: VVYPWTQRF  
 Molekulargewicht: 1195,3 Da (avg.)  
 N- und C-Terminus: unmodifiziert  
 Berechneter pI: 9,8  
 Substanz: VV-Hämorphin-7  
 Herkunft: Fragment (33 - 41 bzw. 32 - 41) der  $\beta$ -Kette des humanen Hämoglobins

cb)  
 Sequenz: LVVYPWTQRF  
 Molekulargewicht: 1308,5 Da (avg.)  
 N- und C-Terminus: unmodifiziert  
 Berechneter pI: 9,8  
 Substanz: LVV-Hämorphin-7

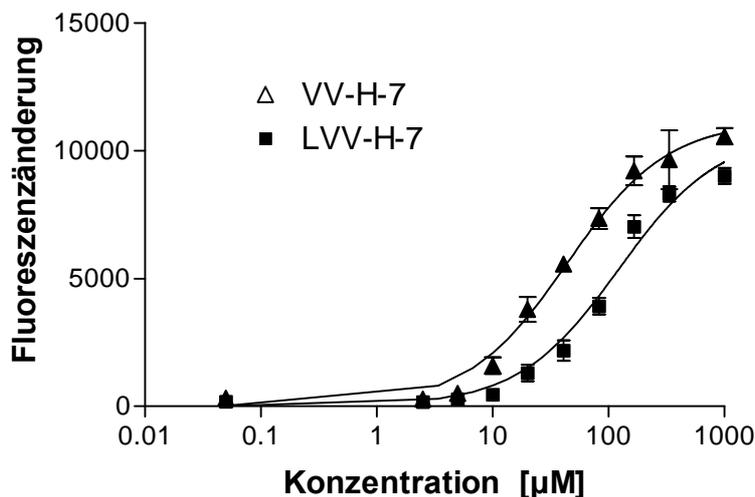
### Abbildung 12: Detektion von VV-H-7 und LVV-H-7 als endogene Liganden für hBRS-3

a) Dargestellt ist das Elektropherogramm der Fraktion 1 (s. Isolierungsschritt 4). Ein Peak mit einer Retentionszeit von 8,14 min ist detektierbar. b) Die Elektrospray-Massenspektren der Fraktion 1 (ba) bzw. Fraktion 18 (s. Isolierungsschritt 3) (bb) zeigen die Masse von 1196 bzw. 1308 Da. In den Abbildungen sind die Massen der Fragmente der jeweiligen Hauptmasse hervorgehoben. Durch Datenbankvergleich der Fragmentierungsmusters konnte die Sequenz von VV-H-7 bzw. LVV-H-7 ermittelt werden. ca) bzw. cb) Zusätzlich konnte durch N-terminale Sequenzierung VV-H-7 bzw. LVV-H-7 mit der Sequenz VVYPWTQRF bzw. LVVYPWTQRF als biologisch aktive Peptide bestätigt werden.

#### 3.4.1.1 Bestätigung der biologischen Aktivität durch resynthetisierte Peptide

VV-H-7, LVV-H-7 und deren Derivate wurden mittels Fmoc-Festphasen-Peptidsynthese hergestellt. Zur Bestätigung der biologischen Aktivität wurden vergleichende Konzentrations-Wirkungskurven aufgenommen. Die resultierenden Ergebnisse (Abbildung 13) aus den durchgeführten FLIPR-Experimenten zeigten, dass sowohl das resynthetisierte VV-H-7 als auch das LVV-H-7 dosisabhängig eine intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  - Erhöhung in CHO-G $\alpha_{16}$ -hBRS-3

Zellen induzieren. Die halbe effektive Konzentration ( $EC_{50}$ ) für VV-H-7 beträgt  $45 \pm 15 \mu\text{M}$ , die für LVV-H-7  $183 \pm 60 \mu\text{M}$ . Kontrollexperimente mit anderen transfizierten CHO-Zellen, die andere Orphanrezeptoren überexprimieren, zeigten keine Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Applikation der Liganden.



**Abbildung 13: Dosis-Wirkungs-Kurven der resynthetisierten Peptide VV-H-7 und LVV-H-7 auf CHO- $G_{\alpha_{16}}$ -hBRS-3-Zellen**

Jeder Punkt präsentiert den Mittelwert  $\pm$  S.E.M.,  $n = 16$ . Die durchgezogene Linie präsentiert die fit-Funktion  $y=100 * (p/p+k)$  ( $k =$  Dissoziationskonstante).

### 3.5 Pharmakologische Charakterisierung des Rezeptors im FLIPR-Assay

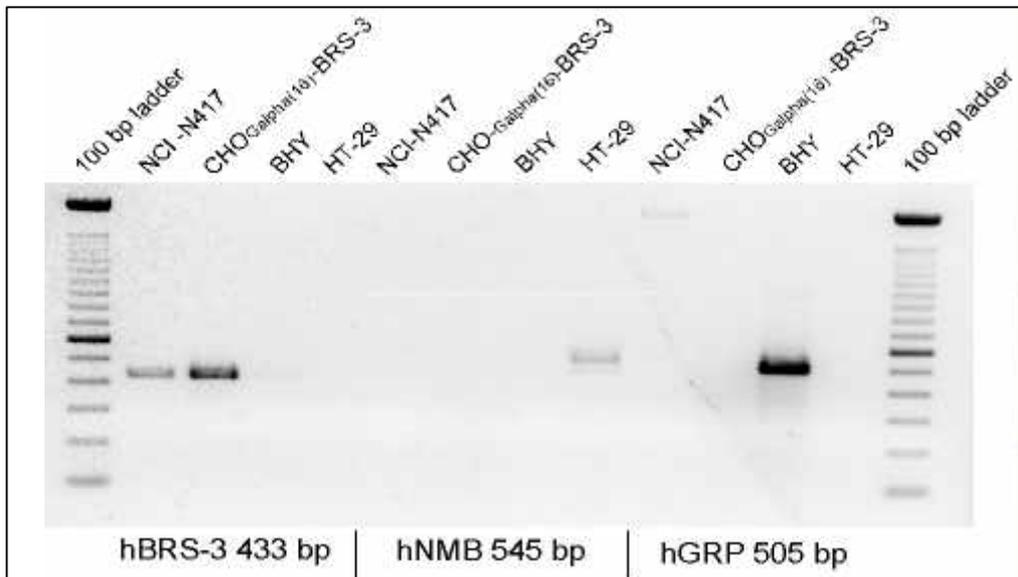
#### 3.5.1 Pharmakologische und physiologische Untersuchungen der Rezeptor-Liganden Beziehung

##### 3.5.1.1 Charakterisierung des hBRS-3 Rezeptors auf NCI- N417 Zellen

Um eine mögliche Interaktion mit Co-Rezeptoren bzw. eine Aktivitätsmodulation durch assoziierte Proteine (RAMP's) (Mc Lathie *et al.*, 1998) durch die Verwendung der transfizierten CHO- $G_{\alpha_{16}}$ -Zellen von vorneherein nicht auszuschließen, musste eine geeignete Zelllinie gesucht werden, die endogen den hBRS-3 exprimiert. Neben anderen kleinzelligen Lungentumorzelllinien (SCLC) ist eine genügend hohe Expression des hBRS-3 auf NCI-N417 Zellen beschrieben worden (Ryan *et al.*, 1998), so dass diese Zelllinie für weitere physiologische und pharmakologische Untersuchungen geeignet erschien.

Mittels Northern Blot Analyse (Abbildung 14) konnte eindeutig gezeigt werden, dass NCI-N417 Zellen ausschließlich den hBRS-3 Rezeptor exprimieren. Somit ist eine Kreuz-

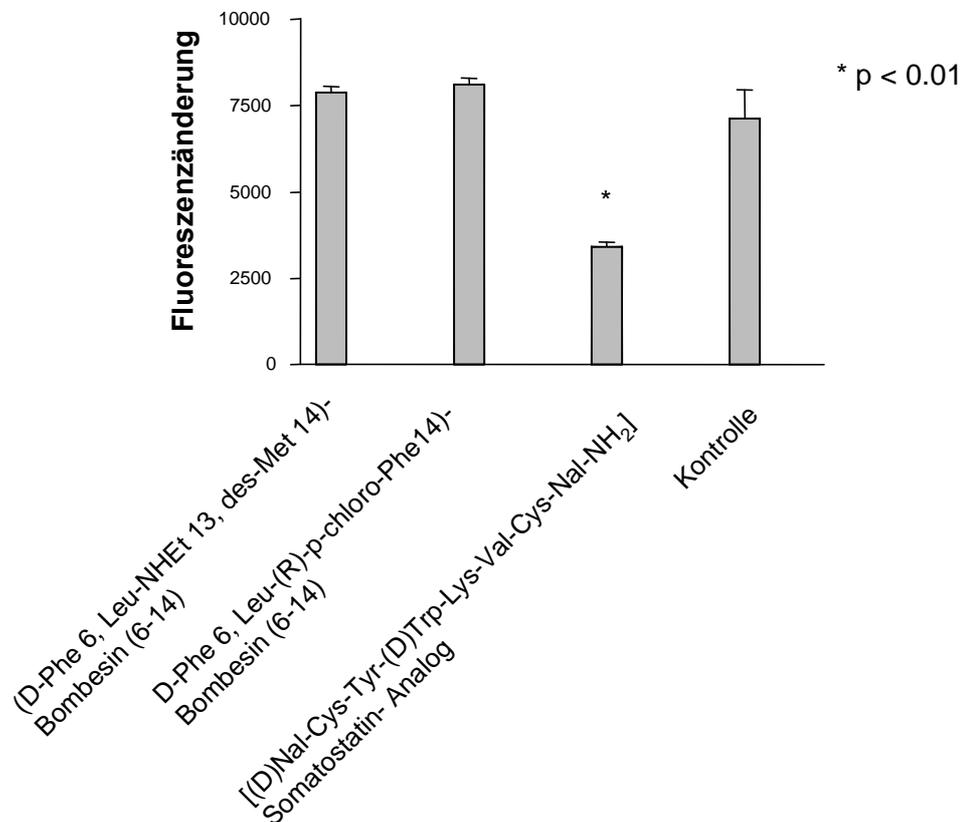
reaktivität des spezifischen Liganden VV-H-7 bzw. LVV-H-7 mit anderen Bombesin-ähnlichen Rezeptoren (hGRP-R und hNMB-R) ausgeschlossen. Die humanen Zelllinien HT-29 bzw. BHY, die den hGRP-R bzw. den hNMB-R exprimieren, zeigten im FLIPR-Assay keine Aktivierung durch VV-H-7 bzw. LVV-H-7.



**Abbildung 14: Expressionsanalyse der Bombesin Rezeptor Familie mittels RT-PCR mit NCI-N417, CHO-G $\alpha_{16}$ -hBRS-3, BHY und HT 29 Zellen.**

*NCI-N417 und CHO-G $\alpha_{16}$ -hBRS-3 Zellen zeigen eine eindeutige Expression des hBRS-3 Rezeptors, während der hNMB-Rezeptor und der hGRP-Rezeptor durch RT-PCR nicht nachweisbar sind. Die Kontrollzelllinie BHY zeigt eine eindeutige Bande in der Größenordnung des Amplifikationsprodukts für den hNMB-R bzw. die HT-29 Zellen zeigen die Expression des hGRP-R's.*

Eine weitere Bestätigung der Spezifität konnte durch Experimente mit Rezeptorantagonisten gezeigt werden. In Abbildung 15 sind verschiedene Bombesinrezeptorantagonisten (GRP-R- und NMB-R-Antagonisten) dahingehend getestet worden, inwieweit sie die intrazelluläre Kalziumausschüttung nach Applikation von VV-H-7 inhibieren.



**Abbildung 15: Inhibition der intrazellulären Kalziumausschüttung nach Applikation von Bombesinrezeptorantagonisten**

In der Abbildung ist die Fluoreszenzänderung im FLIPR-Assay nach Applikation von VV-H-7 und den jeweiligen Rezeptorantagonisten dargestellt. Die Antagonisten wurden in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Als Kontrolle diente die Fluoreszenzänderung nach Applikation von 20  $\mu\text{M}$  VV-H-7.

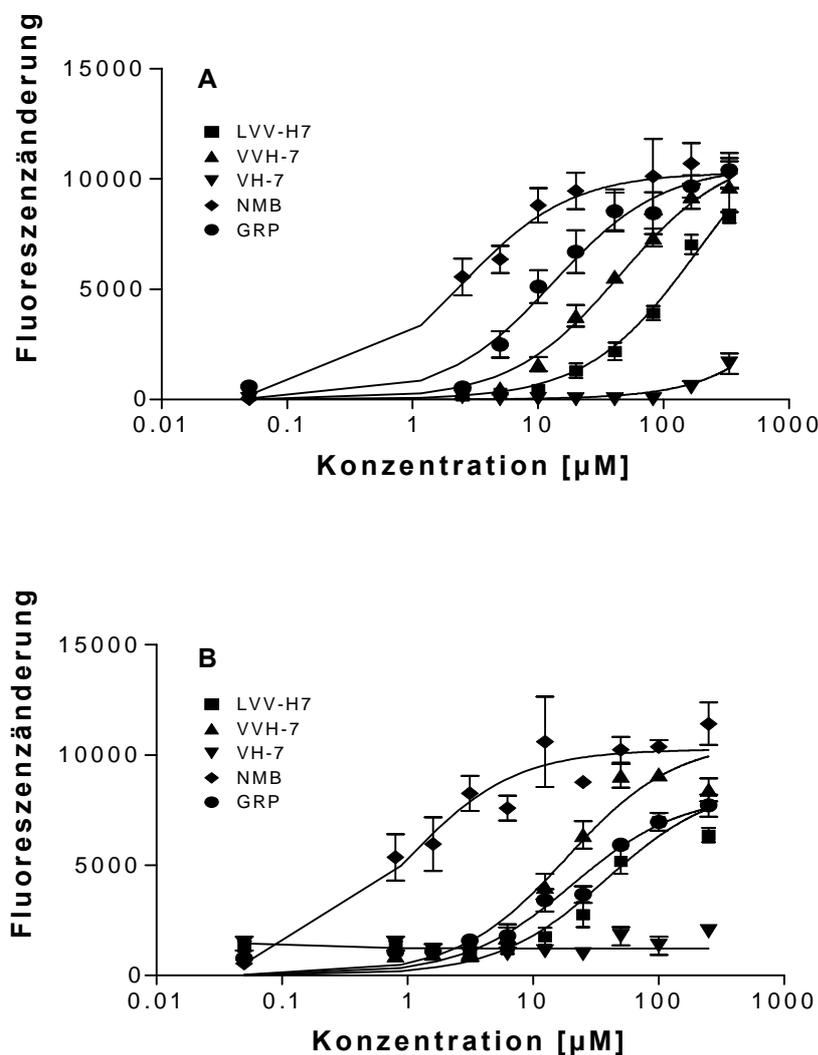
Eine Inhibition der intrazellulären Kalziumausschüttung nach Zugabe von zwei GRP-R-Antagonisten, [(D-Phe<sup>6</sup>, Leu (R)-p-chloro-Phe<sup>14</sup>]-Bombesin (6-14) und [D-Phe,Leu-NHEt<sup>13</sup>, des-Met<sup>14</sup>]-Bombesin (6-14) konnte nicht beobachtet werden. Allerdings konnte eine Inhibition durch das Somatostatin-Oktapeptid [(D)Nal-Cys-Tyr-(D)Trp-Lys-Val-Cys-Nal-NH<sub>2</sub>] gezeigt werden, das als NMB-R-spezifischer Antagonist beschrieben worden ist (Orbuch *et al.*, 1993) und dessen antagonistische Wirkung auf den hBRS-3 von Ryan *et al.* (1998) gezeigt werden konnte.

Die ersten isolierten Hämorphine H-4 und H-5 wurden ursprünglich als niedrigaffine Liganden für opioide Rezeptoren charakterisiert, deren Bindung durch Naloxon, einem unspezifischen Opioidrezeptor-Antagonist, inhibiert wurde (Brantl *et al.*, 1986). Aufgrund

dessen wurde Naloxon gleichzeitig mit VV-H-7, LVV-H-7 oder [DPhe<sup>6</sup>,β-Ala<sup>11</sup>,Phe<sup>13</sup>,Nle<sup>14</sup>] Bombesin(6-14) appliziert. Es konnte jedoch keine Inhibition beobachtet werden.

### 3.5.1.2 Vergleich der biologischen Wirkung zwischen den isolierten Hämorphinen und bekannten endogenen Liganden

Neben den synthetisch hergestellten Liganden [DPhe<sup>6</sup>,β-Ala<sup>11</sup>,Phe<sup>13</sup>,Nle<sup>14</sup>]Bombesin(6-14) sind auch endogene Agonisten für den hBRS-3 Rezeptor beschrieben. Zu diesen niedrig affinen Liganden gehören Gastrin-releasing-peptide (GRP) und Neuromedin B (NMB). Die Charakterisierung der neu identifizierten Liganden VV-H-7 und LVV-H-7 wurde im Vergleich zu diesen beschriebenen Liganden durchgeführt (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von VV-H-7, LVV-H-7, V-H-7, Neuromedin B (NMB) und Gastrin releasing peptide (GRP) auf CHO-Gα<sub>16</sub>-BRS-3- (A) und NCI-N417-Zellen (B)**

Jeder Punkt präsentiert den Mittelwert ± S.E.M., n = 16. Die durchgezogene Linie präsentiert die fit-Funktion  $y=100 * (p/p+k)$  ( $k$  = Dissoziationskonstante).

Für CHO-G $\alpha_{16}$ -hBRS-3 Zellen wurden EC<sub>50</sub>-Werte von 45 ± 15 µM für VV-H-7, 183 ± 60 µM für LVV-H-7, 13 ± 4.5 µM für GRP und 2 ± 1 µM für NMB (Abb. 15 A) kalkuliert, während V-H-7 keine Aktivität bis zu einer Konzentration von 100 µM zeigte (Abbildung 15 A). Für NCI-N417 Zellen wurden EC<sub>50</sub>-Werte von 19 ± 6 µM für VV-H-7, 38 ± 18 µM für LVV-H-7, 20 ± 6 µM für GRP und 0,9 ± 0,5 µM für NMB (Abbildung 15 B) kalkuliert. V-H-7 zeigte ebenfalls keine detektierbare Induktion der transienten Ca<sup>2+</sup>- Konzentrationsänderung (> 100 µM) (Abbildung 15 B). Der Vergleich der EC<sub>50</sub>-Werte zwischen nativ exprimierenden Zellen versus hBRS-3 transfizierten Zelllinien zeigte eine zweifache Erhöhung des EC<sub>50</sub>-Wertes für VV-H-7 und einen 6-fach höheren Wert für LVV-H-7 in CHO-G $\alpha_{16}$ -hBRS-3 Zellen. Präsentiert sind diese EC<sub>50</sub>-Werte der getesteten Substanzen in Tabelle 9 aufgeführt.

**Tabelle 9: EC<sub>50</sub>-Werte der getesteten Substanzen im FLIPR-Assay**

	CHO-G $\alpha_{16}$ -hBRS-3-Zellen	NCI-N417-Zellen
VV-H-7	45 ± 15 µM	19 ± 6 µM
LVV-H-7	183 ± 60 µM	38 ± 18 µM
V-H-7	> 100 µM	> 100 µM
GRP	13 ± 4,5 µM	20 ± 6 µM
NMB	2 ± 1 µM	0,9 ± 0,5 µM

### 3.5.2 Aufklärung der Struktur-Funktions-Beziehung

VV-H-7 und LVV-H-7 sind als endogene Liganden für den hBRS-3 Rezeptor identifiziert worden. Zur Klärung der C- terminalen bzw. N- terminalen Aminosäuren, die verantwortlich für die biologische Aktivität sind, wurden N-terminal bzw. C-terminal verkürzte Peptide eingesetzt. Darüber hinaus wurden Angiotensin I–IV und strukturverwandte RF-Peptide getestet (Tabelle 10).

**Tabelle 10 Induktion eines spezifischen Ca<sup>2+</sup>-Signals durch Hämorphine, Angiotensin-Peptide (Ang I-IV) und andere, C-terminal verwandte Peptide**

Peptide		Schwellen-Konzentration [μM], NCI-N417	Schwellen-Konzentration [μM], CHO Gα <sub>16</sub> -BRS-3
VVYPWTQRF	(VV-H-7)	1	3
LVVYPWTQRF	(LVV-H-7)	1	10
VYPWTQRF	(V-H-7)	10	300
VVYPWTQR	(VV-H-6)	>300 *	>300 *
VVYPWTQ	(VV-H-5)	>300 *	>300 *
VVYPWTQRF-NH <sub>2</sub>	(VV-H-7 amid)	>300 *	>300 *
DRVYIHPF	(Ang II)	>300 *	>300 *
RVYIHPF	(ANG III)	>300 *	>300 *
VYIHPF	(ANG IV)	>300 *	>300 *
FLFQPQRF-NH <sub>2</sub>	(Neuropeptid FF)	>300 *	>300 *
YGGFMRF	(Met-Enkephalin-RF)	>300 *	>300 *

Präsentiert sind die Daten aus acht unabhängigen Experimenten. \* Maximal eingesetzte Konzentration, ohne Effekt.

Die durchgeführten Experimente zeigten, dass nur VV-H-7 und LVV-H-7 (1-10 μM) eine transiente Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsänderung auf NCI-N417 Zellen und CHO-Gα<sub>16</sub>-hBRS-3 hervorriefen. Die N-terminale Verkürzung um ein Valin zu V-H-7 (VYPWTQRF) reduzierte die induzierte Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsänderung signifikant. Die C-terminale Verkürzung um ein Phenylalanin (VV-H-6 VVYPWTQR) führte zu einem vollständigen Verlust der biologischen Aktivität. Da die bisher bekannten Bombesin-ähnliche Peptide am C-Terminus eine Amidierung aufweisen, wurde ein amidiertes VV-H-7 Derivat synthetisiert. Doch auch dieses Peptid zeigte im FLIPR-Assay keinerlei Aktivität.

VV-H-7 und LVV-H-7 gelten als hochaffine Liganden des putativen Angiotensin IV-Rezeptors (Moeller *et al.*, 1998). Aufgrund dessen wurden die bekannten Angiotensin-Peptide (Ang I-IV) getestet, zeigten aber weder auf den transfizierten CHO-Zellen noch auf den NCI-N417 Zellen eine biologische Aktivität.

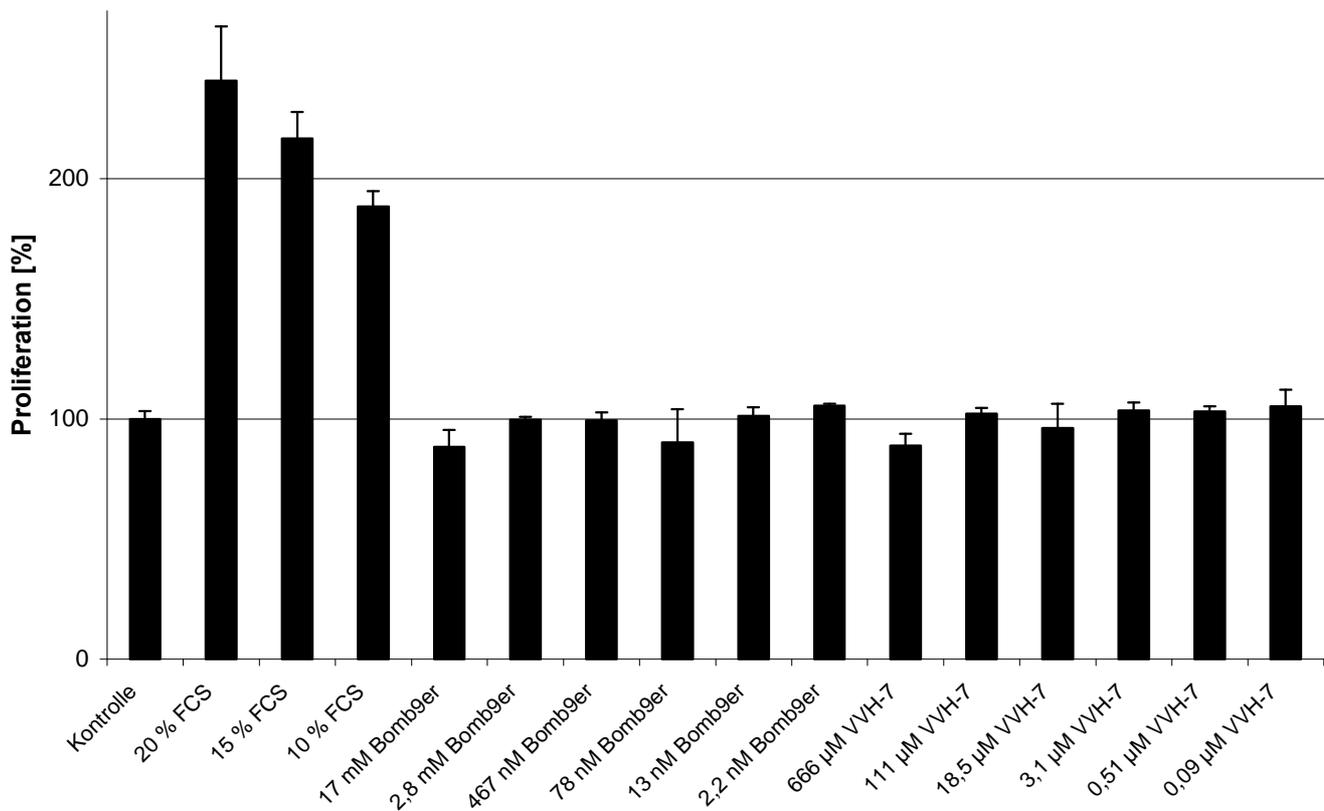
Kürzlich testeten Szikra *et al.* (2001) die Bindungseigenschaften von LVV-H-7 auf Opioidrezeptoren in Membranen von Rattengehirnen und bestimmten eine Affinität von 82,1 nM und in Kompetitionsstudien wurde eine Ähnlichkeit des Bindungsprofils zu Met-Entkephalin-Arg-Phe (MERF) festgestellt. Die C-terminalen Aminosäuren -Arg-Phe, die auch

bei anderen Peptiden (z.B. Neuropeptid FF) zu finden ist, teilen diese Substanzen mit den isolierten Liganden VV-H-7 und LVV-H-7. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten FLIPR-Assay und den Zellen konnte mit diesen Substanzen jedoch keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsänderung gemessen werden.

### **3.6 Funktionelle Analyse der isolierten Liganden**

#### **3.6.1 Proliferationsassay (WST-1)**

GRP gilt als autokriner Wachstumsfaktor von kleinzelligen Lungentumor-Zelllinien (SCLC) (Cuttitta *et al.*, 1985). Darüber hinaus exprimieren SCLC-Zelllinien NMB und den NMB-Rezeptor, so dass ebenfalls ein autokriner Mechanismus auf diese Art von Lungentumoren angenommen wird (Corjay *et al.*, 1991). Da der hBRS-3 wie gezeigt ebenso auf kleinzelligen Lungentumorzelllinien (NCI-N417) exprimiert wird, wurde die proliferierende Wirkung von VV-H-7 und dem synthetischen Liganden  $[\text{DPhe}^6, \beta\text{-Ala}^{11}, \text{Phe}^{13}, \text{Nle}^{14}]$ Bombesin(6-14) auf NCI-N417-Zellen überprüft. In Abbildung 17 sind die Ergebnisse des Proliferationsassay dargestellt.



**Abbildung 17: Bestimmung der proliferierenden Wirkung von VV-H-7 und [DPhe<sup>6</sup>,β-Ala<sup>11</sup>,Phe<sup>13</sup>,Nle<sup>14</sup>]Bombesin(6-14) (Bomb9er) auf NCI-N417 Zellen**

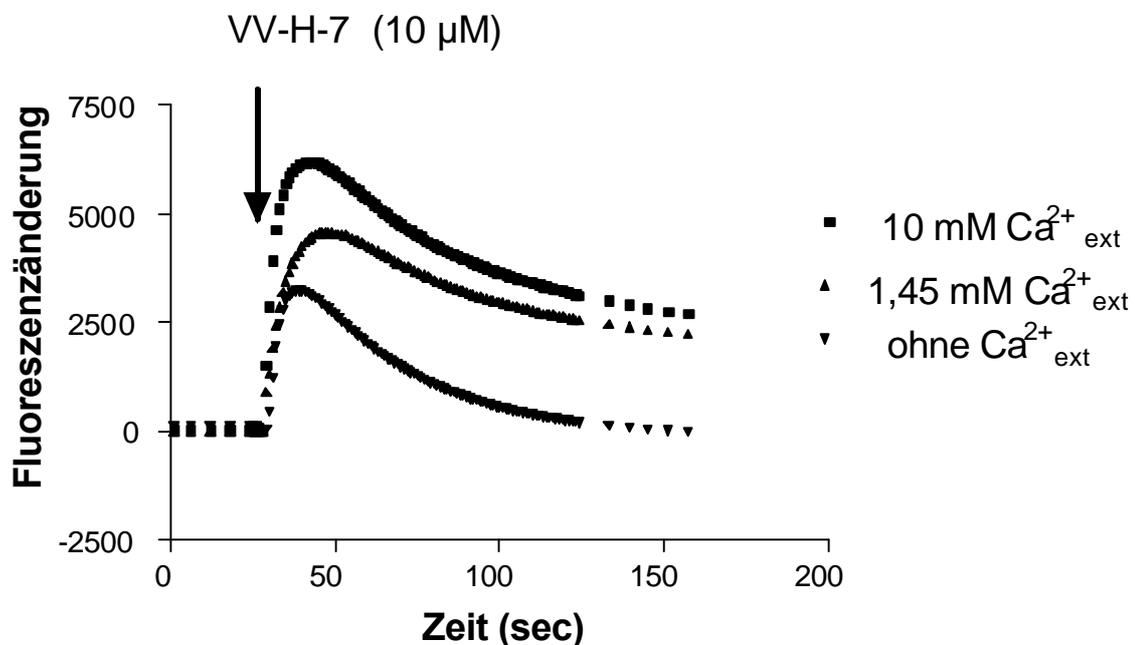
*Dargestellt ist das Ergebnis des Proliferationsassays. Als Kontrolle wurden die Zellen während der Inkubationsdauer serumfrei gehalten. Die Absorption des Farbstoffs, der durch diese Zellen umgesetzt wurde, wurde gleich 100 % gesetzt. Das Experiment wurde zweimal wiederholt, wobei jeder Messwert auf Dreifachwerten beruht. Abkürzungen: FCS: fötales Kälberserum, Bomb 9-er: [DPhe<sup>6</sup>,β-Ala<sup>11</sup>,Phe<sup>13</sup>,Nle<sup>14</sup>]Bombesin(6-14)*

Die getesteten Liganden zeigten in den eingesetzten Konzentrationen keinen Effekt auf die Proliferation, obwohl die gewählten Konzentrationen im FLIPR-Assay eine intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsänderung hervorriefen. Schon 10 % FCS hingegen bewirkte fast eine Verdopplung der Proliferation.

### 3.6.2 Pharmakologische Untersuchungen mit Modulatoren der Signaltransduktion

#### 3.6.2.1 Charakterisierung des induzierten $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in Abhängigkeit von der extrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

Die Abhängigkeit des induzierten Kalzium-Signals durch VV-H-7 von der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ließ sich mit folgenden am FLIPR durchgeführten Experimenten überprüfen: Die Messungen wurden in einem  $\text{Ca}^{2+}$ -freien HBSS-Puffer (+ 10 mM Hepes) inkl. 5 mM EDTA durchgeführt, um eine weitestgehende Kalziumfreiheit zu garantieren. Um eine physiologische Kalziumkonzentration zu erreichen, wurde der Standard-HBSS-Puffer verwendet. Diesem wurde zusätzlich Kalzium zugesetzt, um eine erhöhte Konzentration (10 mM) zu erreichen. In Abbildung 18 ist das Ergebnis dargestellt.



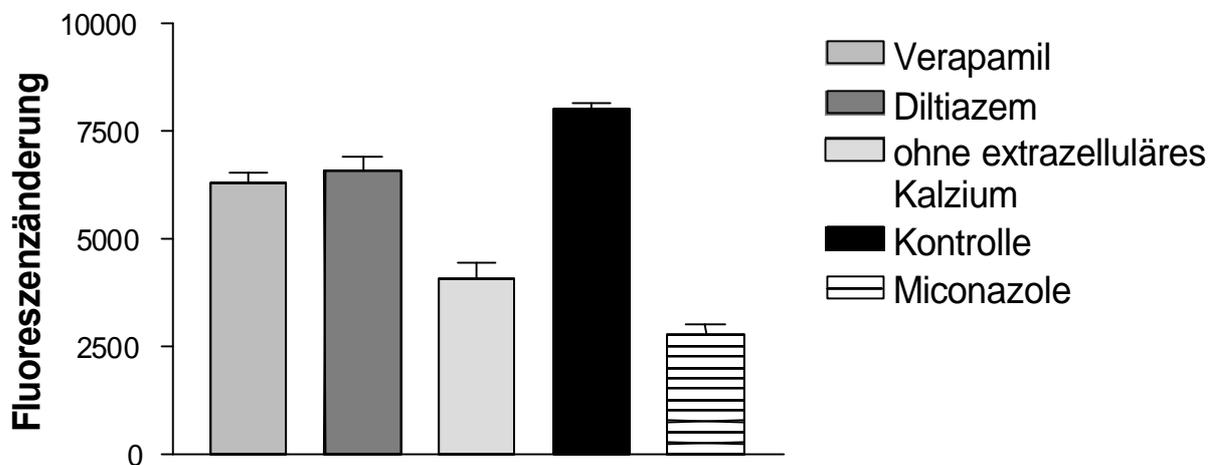
**Abbildung 18: Abhängigkeit des durch VV-H-7 induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals von der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration**

*In der Abbildung ist der Verlauf der Fluoreszenzänderung nach Zugabe von VV-H-7 in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalziumionenkonzentration dargestellt.*

Die Ergebnisse zeigten eine Verringerung der maximalen Fluoreszenzänderung ( $f_{\text{max}}$ ) um ca. 25%, wenn im extrazellulären Medium das Kalzium fehlt. Durch die zusätzliche Applikation von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  (10 mM) konnte  $f_{\text{max}}$  um ca. 25 % erhöht werden. Außerdem konnte eine Veränderung der Kinetik des Kalziumsignals in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalziumkonzentration beobachtet werden. Ist im extrazellulären Medium kein Kalzium

vorhanden, dann wird ca. 80 sec nach Applikation von VV-H-7 die basale Fluoreszenz erreicht, während bei physiologischer extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (1,45 mM) auch am Ende der Messzeit von 150 sec noch nicht die intrazellulären Ausgangswerte erreicht werden. Durch eine erhöhte extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird der Abfall auf den Basalwert noch weiter verzögert.

Zusätzlich wurde die Abhängigkeit der biologischen Antwort von extrazellulären Kalziumionen durch die Inhibition der zellmembranären  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle untersucht. Eingesetzt wurden zum einen die spezifischen L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blocker Verapamil und Diltiazem, zum anderen Miconazol als Inhibitor der „ $\text{Ca}^{2+}$  release-activated  $\text{Ca}^{2+}$ -channels“ (CRAC) (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Abhängigkeit des durch VV-H-7 induzierten Kalziumsignals von extrazellulären Kalziumionen**

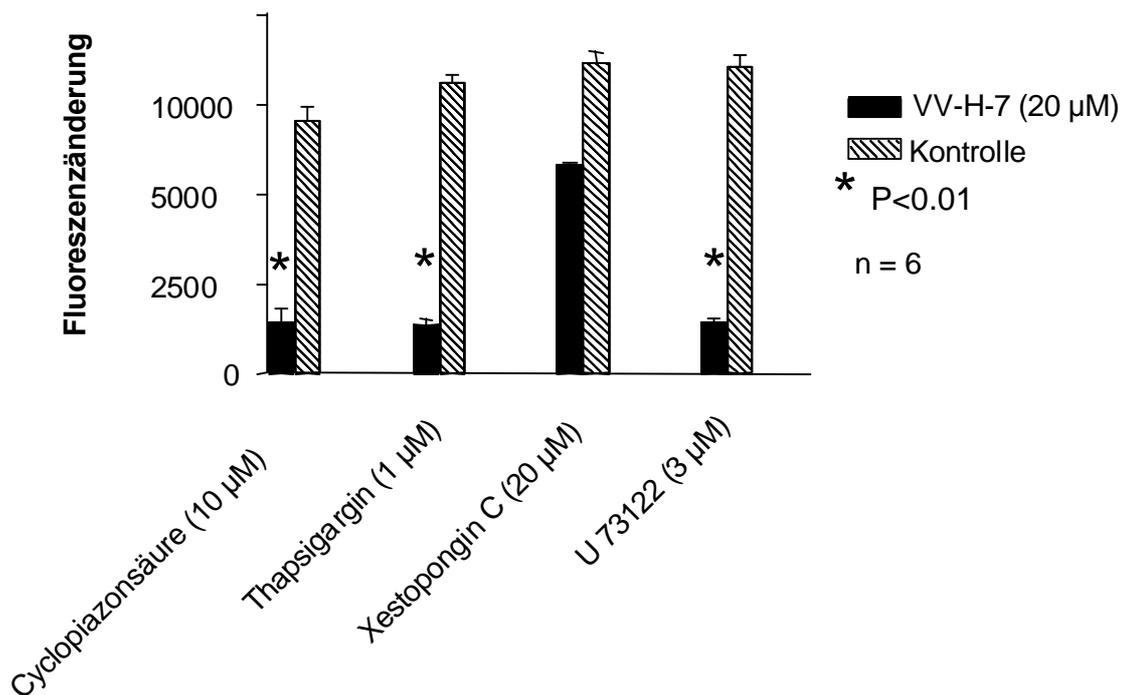
*In der Abbildung ist die Abhängigkeit von der extrazellulären Kalziumkonzentration dargestellt. Verapamil und Diltiazem zeigen keinen signifikanten Effekt auf das induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal. Die Zugabe von Miconazol führt zu einer 50 %igen Inhibition der induzierten Fluoreszenzänderung. Die Inhibitoren wurden in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Als Kontrolle wurden die Fluoreszenzänderung nach Applikation von 20  $\mu\text{M}$  VV-H-7 bei einer physiologischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bestimmt.*

Verapamil und Diltiazem vermindern die maximale Fluoreszenzänderung nach Applikation durch VV-H-7 nicht signifikant. Werden die Zellen in kalziumionenfreiem Medium getestet, ist eine um 50 % verminderte Fluoreszenzänderung messbar. Eine ähnlich starke Verminderung der maximalen Fluoreszenzänderung wird durch Miconazol erreicht, da durch diese Substanz CRAC-Kanäle, über die extrazelluläre Kalziumionen einströmen können, inhibiert werden. Zusammenfassend ist eine Abhängigkeit zwischen dem Maximum des

durch VV-H-7 ausgelösten Kalziumsignals und der extrazellulären Kalziumionenkonzentration gezeigt. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom erfolgt aber nicht über L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle sondern über CRAC-Kanäle.

### 3.6.2.2 Pharmakologische Untersuchungen der Signaltransduktion

In Abbildung 20 sind die Einflüsse verschiedener Inhibitoren der Signaltransduktionskaskade auf die Änderung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration, ausgelöst durch VV-H-7, dargestellt.

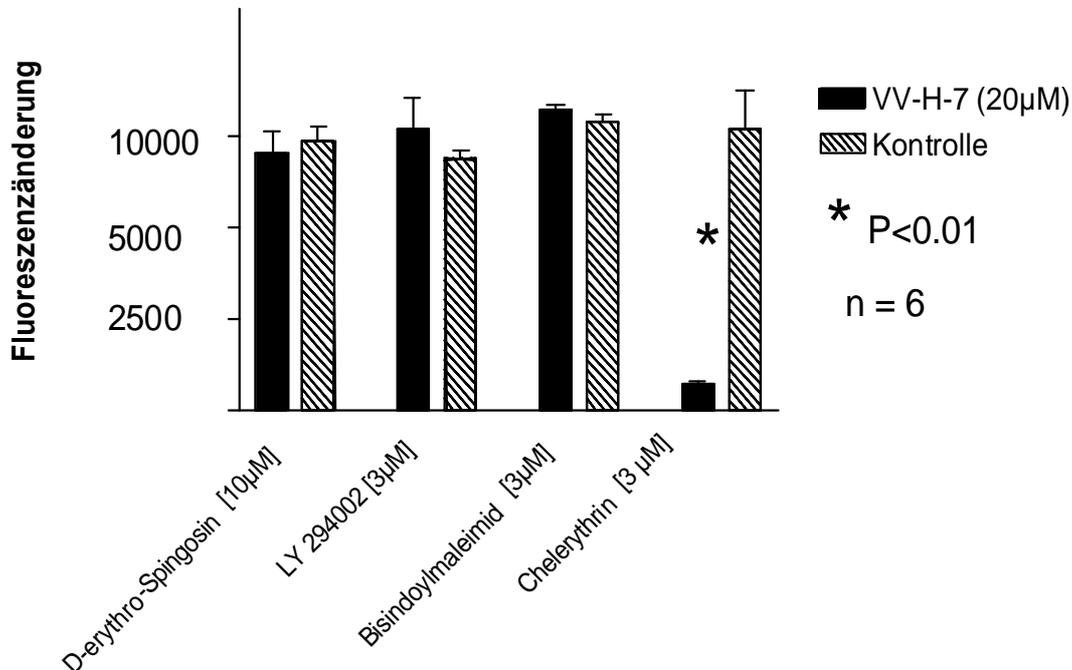


**Abbildung 20: Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Signaltransduktionskaskade.**

Dargestellt ist die Änderung der Fluoreszenz im FLIPR-Assay ausgelöst durch VV-H-7 in Abhängigkeit von dem eingesetzten Inhibitor. Kontrolle: 20 µM VV-H-7 ohne Inhibitor

Die  $\text{Ca}^{2+}$ /ATPase Inhibitoren Thapsigargin und Cyclopiazonsäure inhibierten vollständig die durch VV-H-7 induzierte Kalziumausschüttung. Die Inhibition durch die  $\text{Ca}^{2+}$ /ATPase Inhibitoren läßt eine Signalübertragung über den hBRS-3 vermuten, bei der es zu einer Mobilisierung von Kalziumionen aus intrazellulären Speichern (endoplasmatisches Retikulum) kommt. Durch den Einsatz des  $\text{InsP}_3$ -Rezeptor Antagonisten Xestospongine C kommt es zu einer Verringerung der Kalziumantwort um ca. 30%. Durch Zugabe von U73122, ein Phospholipase C-Inhibitor (Smith *et al.*, 1990), kommt es zu einer vollständigen Inhibition der Kalziumantwort.

Durch den Einsatz von LY 294002 bzw. GÖ 6850 (= Bisindoylmaleimid = GF 109203X), Chelerythrin und D-erythro-Sphingosin wurden eine Beteiligung der Phosphoinositid-3-Kinase bzw. der Phosphokinase C an der Signaltransduktion untersucht (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Einfluss des PI-3-Kinase Inhibitors LY 294002 und der PKC-Inhibitoren GÖ 6850 und Chelerythrin auf die Kalziumantwort nach Applikation von VV-H-7**

*Im Gegensatz zu den anderen Inhibitoren zeigt Chelerythrin eine signifikante Inhibition der Kalziumantwort. Als Kontrolle diente 20 µM VV-H-7 ohne den eingesetzten Inhibitor*

Eine Beteiligung der Proteinkinase C (PKC) bei der Signalübertragung ist durch eine Inhibierung der biologischen Antwort durch Chelerythrin gezeigt. Interessanterweise zeigt D-erythro-Sphingosin und GÖ 6850, die ebenfalls als Inhibitoren der PKC gelten (Hannun *et al.*, 1986; Toullec *et al.* 1991), keine Inhibition des Kalziumsignals.

Auch LY 294002 als Inhibitor der Phosphoinositid-3-Kinase (Vlahos *et al.*, 1994) ruft keine Inhibition der Kalziumantwort hervor.

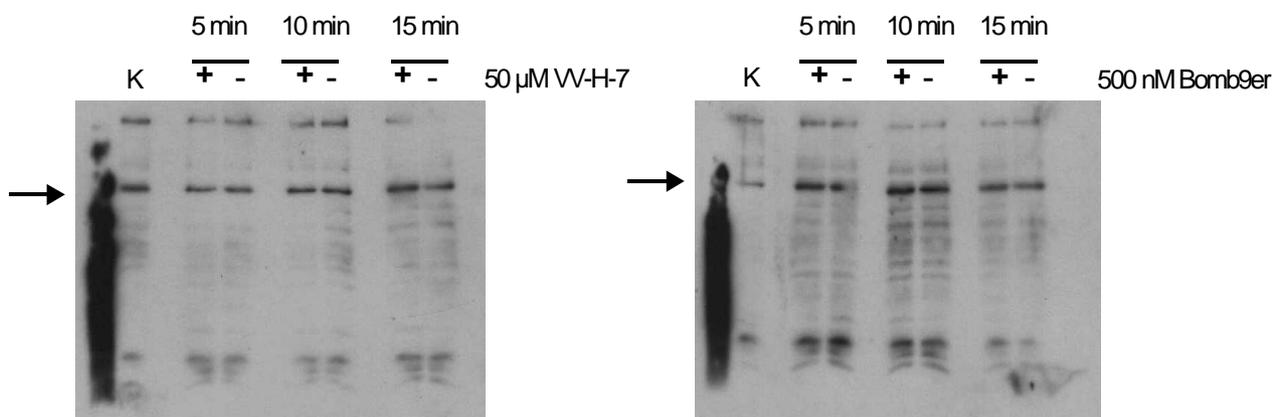
Die Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung des BRS-3 durch VV-H-7 an eine Signaltransduktionskaskade gekoppelt ist, bei der es zu einer Aktivierung der Phospholipase C, einer Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern und zu einer Aktivierung der Proteinkinase C kommt.

### 3.6.3 Aktivierung intrazellulärer Kinasen nach Ligandenbindung

#### 3.6.3.1 Cytosolische fokale Adhäsionskinase (p125<sup>FAK</sup>)

Ryan *et al.* (1998) beobachteten eine dreifache Stimulierung der Tyrosinphosphorylierung der cytosolischen fokalen Adhäsionskinase (p125<sup>FAK</sup>) nach Stimulierung mit [DPhe<sup>6</sup>,β-Ala<sup>11</sup>,Phe<sup>13</sup>,Nle<sup>14</sup>]Bombesin(6-14) von Balb 3T3 und NCI-H1299 Zellen, die mit dem hBRS-3 Rezeptor transfiziert worden sind. Um zu überprüfen, ob VV-H-7 eine ähnliche Wirkung hervorruft, wurden Immunoblot Analysen durchgeführt.

Da es in der Literatur (Zachary *et al.*, 1992; Sinnet-Smith *et al.*, 1993; Salazar und Rozengurt, 2001; Ohtaki *et al.*, 2001) verschiedene Angaben gibt, wie schnell es zu einer Phosphorylierung der p125<sup>FAK</sup> kommt, wurde zuerst die Zeitabhängigkeit getestet (Abbildung 22).

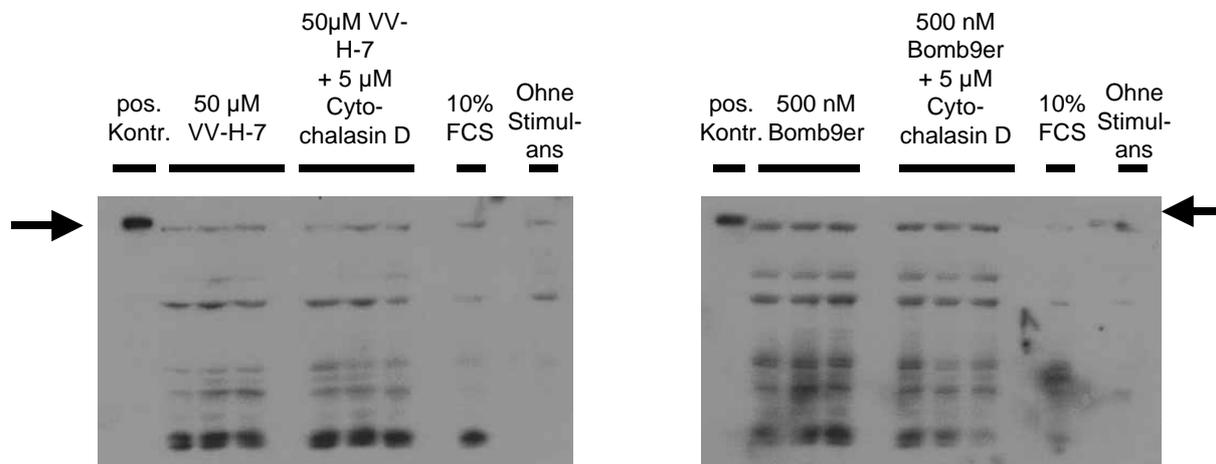


**Abbildung 22: Immunoblot zur Detektion der von p125<sup>FAK</sup>**

NCI-N417 Zellen wurden mit den angegebenen Substanzen zu den angegebenen Zeiten inkubiert. Der Pfeil kennzeichnet die Bande der phosphorylierten p125<sup>FAK</sup>. Abkürzungen: Bomb9er: [DPhe<sup>6</sup>,β-Ala<sup>11</sup>,Phe<sup>13</sup>,Nle<sup>14</sup>]Bombesin(6-14); K: Kontrolle (NCI-N417-Zellen 15 min inkubiert mit 200 μM Pervanadat)

Es ist zu keiner Zeit und unabhängig von der Zugabe der Liganden ein Unterschied in der Phosphorylierung der p125<sup>FAK</sup> zu erkennen.

Um eine Stimulation der Phosphorylierung zu einem späteren Zeitpunkt zu bestimmen, wurden die Zellen 30 min mit den jeweiligen Liganden inkubiert. Da Cytochalasin D eine Phosphorylierung der p125<sup>FAK</sup> inhibiert, wurden die Zellen 30 min mit 5  $\mu$ M Cytochalasin D vorinkubiert (Abbildung 23).



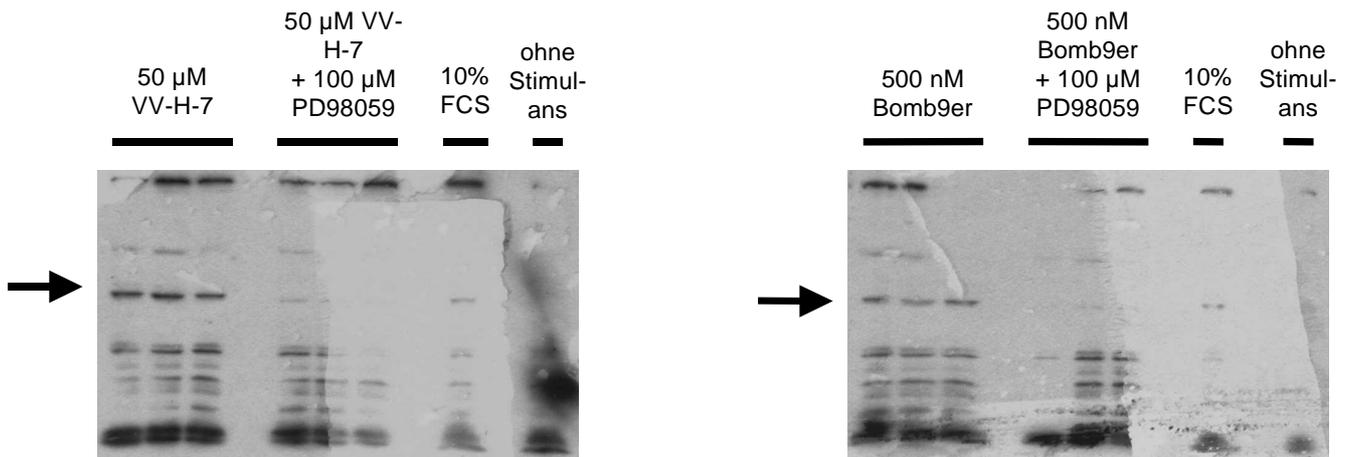
**Abbildung 23: Immunoblot zur Detektion der p125<sup>FAK</sup>**

NCI-N417 Zellen wurden mit den angegebenen Substanzen für 30 min inkubiert. Der Pfeil kennzeichnet die Bande der phosphorylierten p125<sup>FAK</sup>. Abkürzungen: Bomb9er: [DPhe<sup>6</sup>, $\beta$ -Ala<sup>11</sup>,Phe<sup>13</sup>,Nle<sup>14</sup>]Bombesin(6-14); pos. Kontr.: Positivkontrolle (humane Fibroblasten, 20 min inkubiert mit 20 mM Pervanadat)

Auch nach einer verlängerten Inkubationzeit und Zugabe von Cytochalasin D sind keine Unterschiede in der Phosphorylierung der p125<sup>FAK</sup> zu beobachten.

### 3.6.3.2 MAP-Kinase

In der Literatur wird die Aktivierung des MAP-Kinase Signaltransduktionsweges nach Inkubation mit [DPhe<sup>6</sup>,β-Ala<sup>11</sup>,Phe<sup>13</sup>,Nle<sup>14</sup>]Bombesin(6-14) in NCI-N1299 Zellen, die mit dem hBRS-3 transfiziert wurden, beschrieben (Weber *et al.*, 2001). Um die Wirkung von VV-H-7 auf den MAP-Kinase Signaltransduktionsweg in NCI-N417 Zellen zu untersuchen, wurde eine Immunoblot Analyse durchgeführt, deren Ergebnis in Abbildung 24 dargestellt ist.



**Abbildung 24: Immunoblot zur Detektion der phosphorylierten MAP-Kinase**

NCI-N417 Zellen wurden mit den angegebenen Substanzen für 45 min inkubiert, mit dem Inhibitor PD98059 wurde 30 min vorinkubiert. Der Pfeil kennzeichnet die Bande der phosphorylierten MAP-Kinase. Abkürzungen: VV-H-7: VV-Hämorphin-7, Bombesin = [DPhe<sup>6</sup>,β-Ala<sup>11</sup>,Phe<sup>13</sup>,Nle<sup>14</sup>]Bombesin(6-14), PD98059: 2'-Amino-3'-methoxyflavon (MEK-1-Inhibitor = MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor)

Bei den Versuchen zur Stimulation der Phosphorylierung der MAP-Kinase in NCI-N417 Zellen nach Applikation von VV-H-7 und dem synthetischen Bombesinanalogen [DPhe<sup>6</sup>,β-Ala<sup>11</sup>,Phe<sup>13</sup>,Nle<sup>14</sup>]Bombesin(6-14) zeigte sich, dass beide Liganden zu einer Phosphorylierung der MAP-Kinase führen. Der eingesetzte MEK-1-Inhibitor PD 98059, der die MAP-Kinase-Kinase hemmt, verhindert fast vollständig die Phosphorylierung der MAP-Kinase. Zur Kontrolle wurde 10 % FCS und nicht stimulierte Zellen eingesetzt. Bei den mit 10% FCS stimulierten Zellen ist ebenfalls eine Phosphorylierung der MAP-Kinase zu beobachten. Die Stimulierung der MAP-Kinase durch 10% FCS ist allerdings geringer als mit den getesteten Liganden. Bei den nicht stimulierten Zellen ist eine phosphorylierte MAP-Kinase nicht zu detektieren.

## 4 Diskussion

### 4.1 Spezifität des Screeningsystems

Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Ansatz der „Reversen Pharmakologie“ zur Identifizierung von Liganden für oGPCRs konnten erfolgreich die spezifischen endogenen Liganden VV-Hämorphin-7 und LVV-Hämorphin-7 für den Orphanrezeptor hBRS-3 aus der Plazentapeptidbank isoliert werden. Diese neuen Ergebnisse und die in der Literatur beschriebenen (Howard *et al.*, 2001) bestätigen den Erfolg dieser Methode zur Identifizierung von Liganden.

Um den gewählten Ansatz durchführen zu können, wurden CHO-Zellen verwendet, die neben dem hBRS-3 zusätzlich auch mit  $G\alpha_{16}$  transfiziert worden sind. Grundlegend für diese Applikation sind die Ergebnisse von Offermanns und Simon (1996). Sie untersuchten die Interaktion von verschiedenen Rezeptoren mit  $G\alpha_{15}/G\alpha_{16}$  ( $G\alpha_{15}$  ist das homologe Protein der Maus zum humanen  $G\alpha_{16}$ ), in dem sie diese G-Proteinuntereinheit mit Rezeptoren cotransfizierten. Sie stellten fest, dass es durch die Cotransfektion mit  $G\alpha_{15}/G\alpha_{16}$  nach Ligandenbindung zu einer starken Aktivierung der Phospholipase C kommt. Ebenso konnte eine Aktivierung der Phospholipase C erreicht werden, wenn  $G\alpha_{15}/G\alpha_{16}$  mit Rezeptoren cotransfiziert wurden, die normalerweise an  $G\alpha_i$ - und  $G\alpha_s$ -Untereinheiten koppeln. Da  $G\alpha_{16}$  von vielen Rezeptoren aktiviert wird, kann bei einer Cotransfektion die Selektivität von Rezeptor/G-Protein Interaktionen umgangen werden. Diese Eigenschaft ist bei der Suche nach Liganden für oGPCRs sehr nützlich, da bei diesen Rezeptoren die Signalübertragung unbekannt ist.

Bei den Northern Blot Analysen zur Überprüfung der Transkription des hBRS-3 Gens in den CHO- $G\alpha_{16}$ -Zellen stellte sich heraus, dass nicht alle selektierten Einzelzellklone das hBRS-3 Gen transkribieren und zusätzlich bei diesen Zellen im FLIPR-Assay kein Fluoreszenzsignal zu messen war. Das resistenzvermittelnde Gen muss korrekt insertiert worden sein und transkribiert werden, sonst wäre eine Selektion und Isolierung dieser Einzelzellklone nicht möglich gewesen. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass durch Rekombinationsereignisse das BRS-3 Gen seine Integrität verloren hat und nicht mehr abgelesen wird. Da bei stabilen Transfektionen die Fremd-DNA beliebig oft und an theoretisch jedem Ort insertiert werden kann, kann dies zu unterschiedlich starker Expression führen. Deswegen sind einige Einzelzellklone sehr responsiv im FLIPR-Assay, wohingegen andere nur wenig reagieren.

Der in dieser Arbeit verwendete biologische Assay beruht auf der Änderung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration nach Ligandenbindung. Diese Änderung wird durch die Fluoreszenzeigenschaften des  $Ca^{2+}$ -bindenden Farbstoffs Fluo-4 gemessen. Durch

Bindung von freiem, intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  erhöht sich die Fluoreszenz-Intensität des Fluo-4 um mehr als das 100-fache. Durch Applikation potentieller Liganden (Peptidbanken und synthetische Substanzbanken), die eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration induzieren, können neue Liganden für oGPCRs isoliert werden. Bestätigt wird dieses durch die Identifizierung von u.a. Neuromedin U als Ligand für den oGPCR FM-3 (u.a. Raddatz *et al.*, 2000), und Melanin-concentrating hormone (MCH) als Ligand für den SLC-1 (Chambers *et al.*, 1999, Saito *et al.*, 2000).

Ein Problem bei der Suche nach Liganden für oGPCRs stellt die endogene Expression von Rezeptoren der verwendeten CHO-Zellen dar. Eine Aktivierung dieser Rezeptoren führt zu falsch positiven Ergebnissen. Die Ergebnisse können jedoch dadurch validiert werden, dass man den Vergleich zwischen nicht-transfizierten und CHO-Zellen, die mit anderen oGPCRs transfiziert wurden, zieht. Kommt es ebenfalls zu einer Fluoreszenzänderung in den Kontrollzellen, dann handelt es sich höchstwahrscheinlich um ein Signal, das durch einen endogen exprimierten Rezeptor ausgelöst wird. Problematisch stellt sich hierbei vor allem die Detektion von spezifischen Signalen dar, die von Liganden ausgelöst werden, die nur in einer sehr geringen Konzentration in der zu untersuchenden Peptidbank vorliegen. Die Signale von Liganden, die endogene Rezeptoren der transfizierten Zellen aktivieren, können die spezifischen Signale überdecken, so dass eine Detektion erschwert wird.

Ein wichtiger Punkt stellt die Auswahl der zu untersuchenden Peptidbanken dar. Durch die Kenntnis der gewebespezifischen Expression des Orphanrezeptors kann eine Auswahl der Peptidbank getroffen werden. Der BRS-3 zeigt eine spezifische mRNA-Expression in Hoden (sekundären Spermatozyten) (Fathi *et al.*, 1993), im Uterus von trächtigen Meerschweinchen (Gorbulev *et al.* 1992) und im Gehirn der Maus (Hypothalamus) (Ohki-Hamazaki *et al.*, 1997a). Aufgrund dieses Expressionsmusters lag es nahe, die etablierten Peptidbanken aus Plazenta und Schweinegehirn zu verwenden. Außerdem ist es möglich, dass es sich bei der Aktivierung des BRS-3 um einen endokrinen Mechanismus handelt. Deshalb wurde auch die Hämofiltratpeptidbank zum „Screening“ verwendet.

Allerdings kann es auch nicht ausgeschlossen werden, dass es zu einer Aktivierung des Rezeptors durch autokrine oder parakrine Mechanismen kommt, so dass nur ganz spezielle Zellen in einem begrenzten Bereich in einem Gewebe den Liganden sekretieren. Dadurch kann die Konzentration des Liganden im Gesamtgewebeextrakt zu niedrig sein. Außerdem könnte die Expression und Sekretion des Liganden nur zu bestimmten Zeitpunkten oder auf bestimmte Signale hin erfolgen. Wird dieser Zeitpunkt bei der Gewebepräparation nicht getroffen, ist ein Ligand nicht zu isolieren. Auf der anderen Seite zeigen Publikationen, wie auch die vorliegende Arbeit, dass eine Isolierung von Liganden für oGPCRs aus Gewebehomogenaten durchaus möglich ist (Reinscheid *et al.*, 1995; Sakurai *et al.*, 1998;

Hinuma *et al.*, 1998; Tatemoto *et al.*; 1998; Saito *et al.*, 1999; Kojima *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2001).

#### **4.2 Identifizierung von VV-Hämorphin-7 und LVV-Hämorphin-7 als endogene Liganden des hBRS-3**

Im Rahmen dieser Arbeit konnten VV-H-7 und LVV-H-7 als endogene Liganden für den hBRS-3 isoliert und charakterisiert werden. Die Identifizierung gelang durch eine fünf Schritte umfassende Reinigung aus 11 kg humaner Plazenta. Der nach dem zweiten Reinigungsschritt durchgeführte Bioassay mit Fraktionen der Plazentapeptidbank, zeigte zwei Aktivitäten mit den Fraktionen 22/23 und 25/26 aus dem pH-Pool 4 der Plazentapeptidbank. VV-H-7 konnte aus den Fraktionen 22/23 isoliert und nach dem fünften Aufreinigungsschritt rein dargestellt werden (s. Ergebnisse 3.4). Aufgrund des ähnlichen Elutionsverhalten konnte LVV-H-7 schon einen Aufreinigungsschritt vorher mit Hilfe der ESI-Massenspektrometrie als Ligand identifiziert werden (s. Ergebnisse 3.4).

Vergleicht man die durch die Fraktion 1 des letzten Reinigungsschrittes (reines VV-H-7 = entsprechend 11 g PPBÄ) induzierte transiente  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsänderung mit der aufgenommenen Dosiswirkungskurve des resynthetisiertem VV-H-7, kann eine Abschätzung der in dem Plazentagewebeextrakt vorkommenden Konzentration von VV-H-7 erfolgen. 1  $\mu\text{M}$  VV-H-7 ruft eine Änderung der Fluoreszenz von ca. 6000 Einheiten hervor. Die im Bioassay eingesetzten 11 g PPBÄ rufen eine ähnlich hohe Fluoreszenzänderung hervor, d.h. das 11 g PPBÄ ca. 1  $\mu\text{M}$  entsprechen. Das Gewicht einer Plazenta zum Zeitpunkt der Geburt beträgt etwa 500 Gramm. Somit entspräche die Konzentration von VV-H-7 in einer Plazenta ca. 50  $\mu\text{M}$ .

Diese Konzentration erscheint hoch im Vergleich zu bisher bekannten Konzentrationen von Hämorphinen in verschiedenen Geweben. In Cerebrospinalflüssigkeit von Patienten, die eine cerebrovaskuläre Blutung erlitten hatten, konnte eine Konzentration von LVV-H-7 bis zu 0,3  $\mu\text{M}$  nachgewiesen werden (Glämsta *et al.*, 1992). Die Konzentrationen der Hämorphine in verschiedenen Rattengeweben wurde von Yatskin *et al.* (1998) bestimmt. Die Konzentration von LVV-H-7 im Herz und Lunge betrug 11 bzw. 17 nmol/g Gewebe, im Gehirn dagegen 0,6 nmol/g Gewebe. VV-H-7 kommt mit 4 nmol/g Gewebe dagegen etwas geringer konzentriert im Herzen und Lunge vor, im Gehirn liegt die Konzentration bei 0,9 nmol/g Gewebe. Kürzlich konnte LVV-H-7 aus einer bronchoalveolaren Lavage eines Patienten mit einem Adenokarzinom der Lunge in hohen Konzentrationen (1,5  $\mu\text{M}$ ) isoliert werden (Duethman *et al.*, 2000). Der Grund für die hohe Konzentration von LVV-H-7 könnte eine erhöhte Fragmentierung von Erythrozyten sein, wie sie bei der von Lohrmann *et al.* (1973) beschriebenen mikroangiopathischen hämolytischen Anämie bei metastasierenden Karzinomen auftritt. Dabei kommt es aufgrund des veränderten vaskulären Endothels zur erhöhten Scherkräften und somit zur Fragmentierung von Erythrozyten (Nevaril *et al.*, 1968).

Auch Lijnen *et al.* (1988) stellten fest, dass es während eines Langstreckenlaufes zur Hämolyse kommt, was zu einem erhöhten Wert von freiem Hämoglobin im Plasma führt. Das lässt vermuten, dass Hämorphine während der Proteolyse des Hämoglobins entstehen. Aufgrund dessen konnten Glämsta *et al.* (1993) eine erhöhte Konzentration von Hämorphin-7 (H-7) im Blut von Langstreckenläufern nach einem Rennen feststellen. Die Konzentration von H-7 betrug 3 nM und war doppelt so hoch wie vor dem Rennen. Da die Plazenta ein sehr gut durchblutetes und stark kapillarisiertes Organ ist und vor der Extraktion der Plazenta nicht gewährleistet werden konnte, dass geronnenes Blut aus den Gefäßen vollständig entfernt wurde, ließe sich die hohe Konzentration von VV-H-7 und LVV-H-7 in der Plazentapeptidbank erklären.

Die beiden Hämorphine konnten auch von Filtermembranen isoliert werden, die bei der Hämodialyse von urämischen Patienten verwendet wurden (Nyberg *et al.*, 1996). Das könnte ein Grund dafür sein, dass eine biologische Aktivität in der Hämofiltratpeptidbank nicht zu detektieren war, da die eingesetzten Filtermaterialien möglicherweise die Hämorphine absorbieren.

Die von Glämsta *et al.* (1992) bestimmten Konzentration von LVV-H-7 in Cerebrospinalflüssigkeit von Patienten nach einer Gehirnblutung von 0,3  $\mu$ M werden im gesunden Gehirn normalerweise nicht erreicht. Da während der Gewebepräparation ebenfalls Blutgefäße verletzt werden und somit VV-H-7 und LVV-H-7 entstehen könnten wäre die Aktivität in der Schweinehirnpeptidbank zu erklären. Allerdings könnte die Konzentration zu niedrig gewesen sein, so dass im Laufe der Reinigung die Aktivität verloren gegangen ist, weil durch Verluste, die während einer Reinigung auftreten, eine Schwellenkonzentration unterschritten wurde.

### **4.3 Liganden-Rezeptor-Studien**

Zusätzlich zu dem in dieser Arbeit etablierten artifiziellen Ligand-Rezeptor-System: VV-H-7 (LVV-H-7) / CHO-G $\alpha_{16}$ -hBRS-3 Zellen) konnte ein natürlich vorkommendes System mit VV-H-7 (LVV-H-7) und NCI-N417 Zellen identifiziert und etabliert werden. Um dieses natürlich vorkommende Liganden-Rezeptor-System zu etablieren, musste eine Zelllinie gefunden werden, die endogen eine genügend hohe mRNA-Expressionsrate von hBRS-3 aufweist. Desweiteren sollte es eine Zelllinie sein, die die verwandten Rezeptoren NMB-R und GRP-R nicht exprimiert. Mittels Expressionsanalyse wurde eindeutig gezeigt, dass die NCI-N417 Zellen ausschließlich den hBRS-3 Rezeptor exprimieren. Somit ist eine Kreuzreaktivität der isolierten Liganden VV-H-7 bzw. LVV-H-7 mit den anderen Bombesin-ähnlichen Rezeptoren ausgeschlossen. Die humanen Zelllinien HT-29 bzw. BHY, die den hGRP-R bzw. den hNMB-R exprimieren, zeigen im FLIPR-Assay keine Aktivierung durch VV-H-7 bzw. LVV-H-7. Damit ist ebenfalls eindeutig gezeigt, dass es zu einer selektiven Aktivierung des hBRS-3 durch

VV-H-7 und LVV-H-7 kommt und diese Liganden keine Kreuzreaktivität mit den anderen Bombesinrezeptorsubtypen aufweisen.

Außerdem zeigen die Ergebnisse, dass es zu keiner Inhibition der durch das synthetische Bombesin analog induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung durch die spezifischen GRP-R-Antagonisten [(D-Phe<sup>6</sup>, Leu (R)-p-chloro-Phe<sup>14</sup>]-Bombesin (6-14); [D-Phe, Leu-NHEt<sup>13</sup>, des-Met<sup>14</sup>]-Bombesin (6-14) (Coy *et al.*, 1990; Thomas *et al.*, 1992), kommt. Damit ist zusätzlich gezeigt, dass die NCI-N417 Zellen keine GRP-Rezeptoren exprimieren.

Taylor (1995) konnte jedoch zeigen, dass es auf kleinzelligen Lungenkarzinomzelllinien wie auch den in dieser Arbeit verwendeten NCI-N417 Zellen, Naloxon-insensitive Endorphinbindungsstellen gibt. An diese Bindungsstellen könnten auch, wie von Szikra *et al.* (2001) beschrieben, die isolierten Liganden VV-H-7 und LVV-H-7 binden. Der in der Arbeit verwendete Rezeptorantagonist, ein synthetisches Somatostatin analog [(D)Nal-Cys-Tyr-(D)Trp-Lys-Val-Cys-Nal-NH<sub>2</sub>], der zuerst als NMB-R Antagonist beschrieben wurde (Orbuch *et al.*, 1993), wirkt auch als Antagonist des hBRS-3 (Ryan *et al.* 1998). Die durch VV-H-7 bzw. LVV-H-7 hervorgerufene intrazelluläre Kalziumausschüttung in den NCI-N417 Zellen wird durch die Applikation des Somatostatin analogs inhibiert. Damit ist gezeigt, dass die isolierten Liganden spezifisch an den hBRS-3 binden und nicht an Endorphinbindungsstellen.

Diese Liganden sind somit die einzigen endogenen Agonisten, die keinen anderen Bombesinrezeptorsubtypen aktivieren. Der von Mantey *et al.* (2001) synthetisierte Ligand (D-Tyr<sup>6</sup>, (R)-Apa<sup>11</sup>, Phe<sup>13</sup>, Nle<sup>14</sup>)Bn-(6-14) zeigt mit 4,1 nM eine hohe Affinität zu hBRS-3. Da aber die Affinität zu hGRP-R bzw. hNMB-R 60- bzw. 100-fach geringer ist, ist dieser Ligand nicht so selektiv wie die in dieser Arbeit isolierten Liganden. Diese sind zwar nicht hochaffin, es könnte jedoch durch chemische Modifikationen gelingen, einen hochaffinen und selektiven Liganden zu synthetisieren, mit dem die Funktion des BRS-3 *in vivo* aufgeklärt werden kann.

Bei dem Vergleich der EC<sub>50</sub>-Werte der isolierten Liganden mit hBRS-3 transfizierten CHO-G $\alpha_{16}$  Zellen und den hBRS-3 natürlicherweise exprimierenden NCI-N417 Zellen, stellte sich heraus, dass es zu einer zweifachen Erhöhung des EC<sub>50</sub>-Wertes für VV-H-7 und einen 6-fach höheren Wert für LVV-H-7 in CHO-G $\alpha_{16}$ -hBRS-3 Zellen kommt. Möglicherweise ist die Kopplung zwischen dem Rezeptor, den G-Proteinen und anderen Komponenten der Signaltransduktionskaskade in den BRS-3 transfizierten CHO-G $\alpha_{16}$ -Zellen schlechter als bei den NCI-N417 Zellen. Es ist denkbar, dass der Rezeptor in den CHO-Zellen nicht mit dem richtigen G-Protein koppelt. Durch das ebenfalls überexprimierte G $\alpha_{16}$  könnte die natürliche G $\alpha$ -Untereinheit zu wenig koppeln, so dass nicht die natürliche Signalkaskade stimuliert wird. Der Vergleich der EC<sub>50</sub>-Werte der isolierten Liganden VV-H-7 und LVV-H-7 und der schon bekannten Liganden des hBRS-3, GRP und NMB, auf NCI-N417 Zellen stellte sich heraus,

dass die  $EC_{50}$ -Werte mit 19  $\mu\text{M}$  bzw. 38  $\mu\text{M}$  in einem ähnlichen Bereich liegen wie die  $EC_{50}$ -Werte der schon bekannten Liganden (GRP: 20  $\mu\text{M}$ ; NMB: 0,9  $\mu\text{M}$ ).

Dies steht im Widerspruch zu den von Ryan *et al.* (1998) beschriebenen Ergebnissen, da bei den Bindungsstudien mit GRP und NMB keine Bindung auf diesen Zellen auch mit bis zu 10  $\mu\text{M}$  gemessen werden konnte.

Fruitier *et al.* (1998) konnten zeigen, dass Cathepsin D an der Prozessierung von Hämoglobin beteiligt ist und das VV-H-7 aus LVV-H-7 entsteht. VV-H-7 ist gegenüber einem Abbau durch Cathepsin D resistent (keine Konzentrationsänderung nach 20 h Inkubation mit Cathepsin D), so dass nach LVV-H-7-Abbau eine hohe Konzentrationen an VV-H-7 zu erwarten ist. Da auch eine Expression des hBRS-3 bei Lungenkarzinomen nachzuweisen ist (Toi-Scott *et al.*, 1996), könnte ein Zusammenhang zwischen den isolierten Liganden und Lungenkarzinomen bestehen. Die Schwellenkonzentration, bei der im verwendeten FLIPR-Assay ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal, ausgelöst durch VV-H-7, zu messen ist, beträgt 1  $\mu\text{M}$ . Damit könnte die Konzentration von 1,5  $\mu\text{M}$ , die in der Lungenlavage eines Patienten mit einem Adenokarzinom der Lunge gefunden worden ist (Duethman *et al.*, 2000), ausreichen, um den hBRS-3 zu aktivieren. Obwohl die isolierten Liganden keine proliferative Wirkung auf NCI-N417 Zellen zeigen, könnte eine Ligandenbindung eine Sekretion von z.B. (Neuro)-Peptiden bewirken. GRP und NMB gelten u.a. als autokriner Wachstumsfaktor von kleinzelligen Lungentumor-Zelllinien (SCLC) (Cuttitta *et al.*, 1985; Corjay *et al.*, 1991). Möglicherweise kommt es nach Bindung von VV-H-7 an den BRS-3 zu einer Sekretion eines mitogenen Faktors, wodurch das Tumorwachstum voranschreiten könnte. Es könnte aber auch zu einer Sekretion von z.B. Proteasen kommen, wodurch es zu einer Metastasierung oder zu einer Ausschüttung von angiogenen Faktoren kommen könnte, damit die Versorgung des Tumors gewährleistet wird.

#### **4.4 Struktur-Funktionsbeziehung der Hämorphine und anderer, strukturverwandter Peptide als Ligand für den hBRS-3**

Bei den Untersuchungen zur Struktur-Funktionsbeziehung konnte aufgrund der  $EC_{50}$ -Werte folgende Reihe für die unterschiedlichen Hämorphine bestimmt werden: VV-H-7 < LVV-H-7 << V-H-7, wobei VV-H-7 mit 19  $\mu\text{M}$  den niedrigsten  $EC_{50}$ -Wert auf NCI-N417 Zellen aufwies. Die N-terminale Verkürzung um ein Valin zu V-H-7 (VYPWTQRF) reduziert die induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsänderung signifikant (300  $\mu\text{M}$ ). Die C-terminale Verkürzung um ein Phenylalanin (VV-H-6 VVYPWTQR) hingegen führt zu einem vollständigen Verlust der biologischen Aktivität. Aus diesen präsentierten Daten lässt sich schliessen, dass das N-terminale Valin und das C-terminale Phenylalanin kritisch für die Ligand-Rezeptor-Interaktion der Hämorphine sind. Die Erhöhung des  $EC_{50}$ -Wertes von 19  $\mu\text{M}$  auf 38  $\mu\text{M}$  durch ein zusätzliches Leucin (LVV-H-7) könnte damit erklärt werden, dass dieser Ligand durch sterische Behinderung nicht mehr optimal in die Bindungsstelle des hBRS-3 passt.

Da die Bombesin-ähnlichen Peptide GRP und NMB am C-Terminus eine Amidierung aufweisen, wurde ein C-terminal amidiertes VV-H-7 synthetisiert. Im FLIPR-Assay konnte jedoch keinerlei Aktivität gemessen werden. Offensichtlich ist die C-terminale Amidierung für die Aktivität der Hämorphine wichtig, da keine Aktivität mehr vorhanden ist. Es ist durchaus vorstellbar, dass die Hämorphine an eine gänzlich andere oder zumindest teilweise andere Bindungsstelle des BRS-3 binden und deshalb die Amidierung für die Bindung nicht notwendig ist.

Das als erstes beschriebene Hämorphin, LVV-Hämorphin-7 (LVV-H-7) wurde aus dem Hypothalamus von Schweinen isoliert (Chang *et al.*, 1980). Die später isolierten Hämorphine H-4 und H-5 wurden ursprünglich als niedrigaffine Liganden für opioide Rezeptoren charakterisiert, deren Bindung durch Naloxon, einen unspezifischen Opioidrezeptor-Antagonist, inhibiert wurde (Brantl *et al.*, 1986). Ebenso konnte Szikra *et al.* (2001)  $K_i$ -Werte ( $1 \times 10^{-5}$  M für  $\mu$ -Rezeptoren und  $7 \times 10^{-5}$  M für  $\kappa$ -Rezeptoren) von VV-H7 und synthetischen Opioidantagonisten bestimmen. Aufgrund dessen wurde Naloxon gleichzeitig mit VV-H-7, LVV-H-7 oder [D-Phe<sup>6</sup>, $\beta$ -Ala<sup>11</sup>,Phe<sup>13</sup>,Nle<sup>14</sup>] Bombesin(6-14) appliziert. Es konnte jedoch keine Inhibition des  $Ca^{2+}$ -Signals beobachtet werden. Auch nach Applikation von C-terminal strukturverwandten Endorphinen, Neuropeptid FF (FLFQPQRF-NH<sub>2</sub>) und Met-Enkephalin-RF (YGGFMRF), wurde keine  $Ca^{2+}$ -Konzentrationsänderung gemessen. Offensichtlich reicht der C-Terminus der getesteten Peptide nicht aus, um eine biologische Antwort auszulösen.

#### 4.5 Biologische Effekte von VV-H-7 und LVV-H-7

##### 4.5.1 Signaltransduktion

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zur Signaltransduktionskaskade in NCI-N417 Zellen, ausgelöst durch VV-H-7, bestätigen teilweise die Untersuchungen, die mit hBRS-3 transfizierten Zellen, mit NCI-N417 Zellen und dem synthetische Bombesinanalogue [D-Phe<sup>6</sup>, $\beta$ -Ala<sup>11</sup>,Phe<sup>13</sup>,Nle<sup>14</sup>] Bombesin(6-14) durchgeführt worden sind (Ryan *et al.*, 1997 und 1998).

Die Signaltransduktion ist nicht unabhängig von extrazellulären Kalziumionen. Die Ergebnisse zeigen, dass es zu einer Verringerung der maximalen Fluoreszenzänderung ( $f_{max}$ ) nach Applikation von VV-H-7 in  $Ca^{2+}$ -freiem Medium kommt. Ist im umgebenden Medium eine höhere  $Ca^{2+}$ -Konzentration als unter physiologischen Bedingungen, dann kommt es zu einer Erhöhung der  $f_{max}$ . Man muss davon ausgehen, dass es zusätzlich zur  $Ca^{2+}$ -Konzentrationserhöhung aus intrazellulären Speichern auch zu einem Einstrom von extrazellulären  $Ca^{2+}$  kommt. Der Einstrom kann u.a. über L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle und über CRAC-Kanäle erfolgen. Die L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanal-Blocker Verapamil und Diltiazem zeigten keinen signifikanten Einfluss auf  $f_{max}$ , so dass man davon ausgehen kann, dass extrazelluläre  $Ca^{2+}$  Ionen nicht über diese Kanäle in die Zelle strömen.

In den meisten nicht-erregbaren Zellen führt die Entleerung von Kalziumionenspeichern zu einer Aktivierung eines selektiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms, der  $I_{\text{CRAC}}$  ( $\text{Ca}^{2+}$  release-activated  $\text{Ca}^{2+}$  current) genannt wird (Hoth und Penner, 1992). Der Kalziumeinstrom über CRAC-Kanäle ist notwendig, um die transiente Kalziumionenkonzentrationserhöhung zu verlängern, intrazelluläre Kalziumspeicher wieder aufzufüllen und zelluläre Vorgänge zu steuern (Parekh und Penner, 1997). Durch Verwendung von Miconazol, einem Inhibitor der CRAC-Kanäle, tritt der gleiche Effekt auf, wie bei dem Versuch ohne extrazelluläres Kalzium. Damit wäre auch die Abnahme von  $f_{\text{max}}$  begründet, die auftritt, wenn im umgebenden Medium der Zellen kein  $\text{Ca}^{2+}$  enthalten ist. Der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  über diese Kanäle würde auch erklären, dass es zu einer veränderten Kinetik der Kalziumantwort kommt.

Durch die Verwendung der  $\text{Ca}^{2+}$ /ATPase Inhibitoren Thapsigargin und Cyclopiazonsäure konnte eine vollständige Inhibierung der durch VV-H-7 induzierten Kalziumausschüttung gezeigt werden. Die Inhibition durch die  $\text{Ca}^{2+}$ /ATPase Inhibitoren läßt eine Signalübertragung über den hBRS-3 vermuten, bei der es zu einer Mobilisierung von Kalziumionen aus intrazellulären Speichern (endoplasmatisches Retikulum) kommt. Durch die Verringerung der Kalziumantwort durch den  $\text{InsP}_3$ -Rezeptor Antagonisten Xestospongin C um ca. 30 % läßt sich zeigen, dass die Kalziumionen aus Inositoltrisphosphat ( $\text{InsP}_3$ )-sensitiven intrazellulären Speichern freigesetzt werden. Durch Zugabe des Phospholipase C-Inhibitors U 73122 kommt es zu einer vollständigen Inhibition der Kalziumantwort, so dass von einer Beteiligung dieses Enzyms an der Signalkaskade ausgegangen werden muss.

Eine Beteiligung der Proteinkinase C (PKC) bei der Signalübertragung ist durch eine Inhibierung der biologischen Antwort durch Chelerythrin gezeigt (erstmalig beschrieben durch Herbert *et al.*, 1990). Interessanterweise zeigten D-erythro-Sphingosin und GÖ 6850, die ebenfalls als Inhibitoren der PKC gelten, keine Hemmung des Kalziumsignals. Eventuell spielen die unterschiedlichen Mechanismen der Inhibition eine Rolle. Chelerythrin ist ein nicht-kompetitiver Inhibitor, D-erythro-Sphingosin bzw. GÖ 6850 sind dagegen kompetitive Inhibitoren. Bei der kompetitiven Inhibition kann durch Erhöhung der Substratkonzentration (hier Diacylglycerol bzw.  $\text{Ca}^{2+}$ ) die Inhibition ausgeschaltet werden. Möglicherweise reicht die eingesetzte Konzentration der letztgenannten Inhibitoren für eine kompetitive Hemmung nicht aus. GÖ 6850 bindet an die ATP-Bindungsstelle aller PKC-Isoenzyme. Die intrazelluläre ATP-Konzentration liegt jedoch bei ca. 1 – 10 mM, so dass die eingesetzte Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  möglicherweise nicht ausreicht, um die PKC kompetitiv zu hemmen.

LY 294002 als Inhibitor der Phosphoinositid-3-Kinase ruft keine Inhibition der Kalziumantwort hervor. Somit kann man davon ausgehen, dass dieses Enzym nicht an der Signaltransduktionskaskade beteiligt ist.

Die von Ryan *et al.* (1998) durchgeführten Untersuchungen an BALB 3T3 Zellen, die mit dem hBRS-3 transfiziert worden waren, zeigten, dass es nach Applikation von [DPhe<sup>6</sup>,β-Ala<sup>11</sup>,Phe<sup>13</sup>,Nle<sup>14</sup>] Bombesin(6-14) zu einer Phosphorylierung der fokalen Adhäsionskinase p125<sup>FAK</sup> kommt. Bei den Untersuchungen in dieser Arbeit an den NCI-N417 Zellen konnte keinerlei Phosphorylierung der p125<sup>FAK</sup> nach Applikation von VV-H-7 oder dem synthetischen Bombesinanalogs nachgewiesen werden. Da NCI-N417 Zellen Suspensionszellen sind, ist es möglich, dass es nach Ligandenaktivierung nicht zu einer Aktivierung der p125<sup>FAK</sup> kommt. Bei Swiss 3T3 Zellen, die in Suspension gehalten werden, kommt es ebenfalls nicht zu einer Phosphorylierung der p125<sup>FAK</sup>. In diesen Zellen ist eine p125<sup>FAK</sup>-Phosphorylierung jedoch nachweisbar, wenn sie adhären kultiviert werden (Rodriguez-Fernandez und Rozengurt, 1996; Seufferlein *et al.*, 1996).

Obwohl mehrere Arbeiten eine Phosphorylierung der p125<sup>FAK</sup> nach Ligandenbindung an den GRP-R oder NMB-R zeigen (Zachary *et al.*, 1991; Lach *et al.*, 1995), muss die Signaltransduktion des BRS-3 nicht unbedingt eine Phosphorylierung der p125<sup>FAK</sup> einschließen. Es kann gezeigt werden, dass GRP in Abhängigkeit von dem jeweiligen Zelltyp eine Aktivierung der Adenylatzyklase hervorruft oder zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration führt (Garcia *et al.*, 1997). Daher ist es nicht ausgeschlossen, dass es zu einer Phosphorylierung der p125<sup>FAK</sup> nach Ligandenbindung an den BRS-3 in einem anderen Zellkontext kommen kann.

#### 4.5.2 Aktivierung der MAP-Kinase

Die Proliferationsstudien zeigten, dass die getesteten biologischen Wirkungen der isolierten Liganden im Vergleich zum bekannten synthetischen Bombesinanalogs die gleichen Effekte hervorrufen. Weder der isolierte Ligand VV-H-7 noch das synthetische Bombesinanalogs [D-Phe<sup>6</sup>,β-Ala<sup>11</sup>,Phe<sup>13</sup>,Nle<sup>14</sup>] Bombesin(6-14) üben eine mitogene Wirkung auf NCI-N417 Zellen aus. Nur das als Positivkontrolle eingesetzte FCS führt zu einem Anstieg der Proliferation. Dieses Ergebnis stimmt mit der von Ryan *et al.* (1998) gemachten Beobachtung überein. Auch dort wurde eine mitogene Aktivität des synthetischen Bombesinanalogs auf NCI-N417 Zellen nicht beobachtet.

In der vorliegenden Arbeit konnte für VV-H-7 und dem synthetischen Bombesinanalogs eine Aktivierung der MAP-Kinase gezeigt werden. Auch dieses Ergebnis wird durch die Arbeit von Weber *et al.* (2001) bestätigt, in der gezeigt wurde, dass es nach Applikation des synth. Bombesinanalogs auf NCI-H1299 Zellen, die zusätzlich mit dem hBRS-3 transfiziert wurden, zu einer Aktivierung der MAP-Kinase kommt. In der vorliegenden Arbeit konnte zum erstenmal eine Aktivierung der MAP-Kinase durch Liganden für den BRS-3 in nicht transfizierten humanen Lungentumorzellen gezeigt werden.

Eine Aktivierung der MAP-Kinase muss nicht zwangsläufig zu einer Aktivierung der Proliferation führen, sondern kann auch andere zelluläre Effekte nach sich ziehen. Hellmich

*et al.* (1999) beschreiben die Sekretion von Gastrin nach Bindung von GRP an den GRP-Rezeptor. Zuerst kommt es zu einer Stimulierung der Phospholipase C, die zur Produktion von Inositol-1,4,5-trisphosphat und Diacylglycerin und dann zur Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration führt. Im weiteren kommt es zur Aktivierung der Proteinkinase C und der MAP-Kinase, wobei es dann zur Sekretion von Gastrin kommt. In der Arbeit wird gezeigt, dass eine Aktivierung der MAP-Kinase notwendig ist, damit es zur beschriebenen Sekretion kommt. Insgesamt wird in den NCI-N417-Zellen die gleiche Signaltransduktion aktiviert, so dass möglicherweise diese Zellen nach Ligandenbindung ebenfalls Peptide oder andere Stoffe sekretieren.

Eine Aktivierung der MAP-Kinase kann auch zur Differenzierung von Zellen führen. Zum Beispiel führt in der „neuronalen“ Phaeochromocytoma (PC12) Zelllinie die Aktivierung der MAP-Kinase zu einem Wachstum von „Neuriten“ (Traverse *et al.*, 1992). Durch die Phosphorylierung von strukturellen Proteinen in der Zelle durch die aktivierte MAP-Kinase, z.B. Myelin basisches Protein oder Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2, kann es auch zu Änderungen in der Zellstruktur kommen (Erickson *et al.*, 1990; Ray *et al.*, 1987).

Auch bei der Internalisierung der GPCRs wird die MAP-Kinase phosphoryliert. Lutrell *et al.*, (2001) postulieren eine Aktivierung der MAP-Kinase während der Desensibilisierung von GPCRs. Dabei kommt es nach Ligandenbindung und Freisetzung der G $\beta\gamma$ -Untereinheit zur Phosphorylierung des Rezeptors durch GRKs (G-Protein gekoppelte Rezeptor-Kinasen).  $\beta$ -Arrestin 1 bindet den phosphorylierten Rezeptor und Kinasen der MAP-Kinase-Kaskade. Letztlich kommt es zur Bildung eines Komplexes, der u.a. auch die aktivierte MAP-Kinase enthält. Der gesamte Komplex wird dann zu den Endosomen geführt. Zusammenfassend muss eine Aktivierung der MAP-Kinase nicht unbedingt zur Proliferation führen. In Abbildung 25 ist die Signaltransduktionskaskade, die in dieser und anderen Arbeiten nach Aktivierung des BRS-3 untersucht wurde, dargestellt.

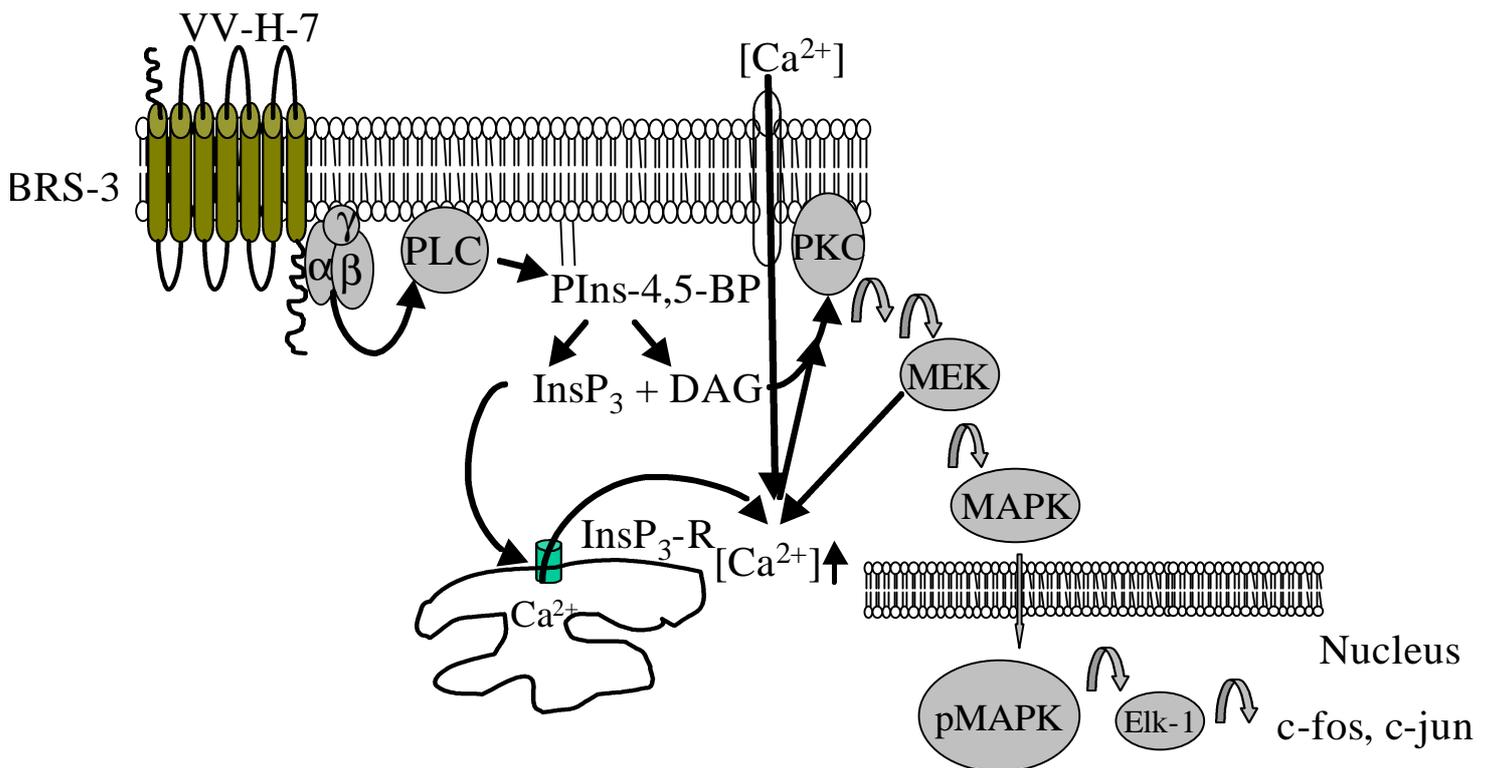


Abbildung 25: Darstellung der Signaltransduktion nach Ligandenbindung am BRS-3

Abkürzungen: BRS-3: Bombesin Rezeptor Subtyp 3; VV-H-7: VV-Hämorphin-7; *a*, *b*, *g* Untereinheiten des G-Proteins; PLC: Phospholipase C; PIns-4,5-BP: Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphat; InsP<sub>3</sub>: Inositol-(1,4,5)-trisphosphat; DAG: Diacylglycerin; ; InsP<sub>3</sub>-R: Inositol-(1,4,5)-trisphosphat-Rezeptor; PKC: Proteinkinase C; MEK: MAPK-Kinase; MAPK: Mitogen aktivierte Protein-Kinase; pMAPK: phosphorylierte MAP-Kinase; Elk-1: Transkriptionsfaktoren

#### 4.5.3 Bisher bekannte biologische Funktionen der Hämorphine

Neben der schon erwähnten Funktion der Hämorphine als Opioidrezeptoragonisten interagieren sie auch mit dem Renin-Angiotensin System. Einige Hämorphine, besonders aber LVV-H-6 und LVV-H-7, inhibieren das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) (Lantz *et al.*, 1991; Zhao *et al.*, 1994) und scheinen damit einen Einfluss auf die Regulation des Blutdrucks zu haben. Obwohl Hämorphine nicht direkt an vaskuläres Gewebe binden, so hemmen sie die ACE in einer nicht kompetitiven Weise. Eine Hemmung dieses Enzyms führt dazu, dass die Bildung des potenten vasokonstriktorisches Peptides Angiotensin II in der Mikrovaskularisierung des Tumors gehemmt wird und gleichzeitig für eine verlängerte Halbwertszeit des vasodilatorischen Peptides Bradykinin sorgt (Gardiner *et al.*, 1993). Daraus resultiert eine Erhöhung des Blutflusses durch den Tumor. Ebenso kompetitiert LVV-H-7 mit Angiotensin IV um die Aminopeptidase N (Garreau *et al.*, 1998), die durch

Abspaltung des N-terminalen Arginins des Angiotensin III Angiotensin IV produziert (Ahmad und Ward, 1990; Ardaillou und Chansel, 1997).

Darüber hinaus bindet LVV-H-7 an Angiotensin IV-Bindungsstellen in verschiedenen Hirnregionen (Moeller *et al.*, 1997) im nanomolaren Bereich, so dass LVV-H-7 neben Angiotensin IV als endogener Ligand des putativen Angiotensin IV Rezeptors gilt. Angiotensin IV-Bindungsstellen sind auch im Hippocampus, in sensorischen, motorischen und cholinergen Neuronen bei Meerschweinchen (Harding *et al.* 1992; Miller-Wing *et al.*, 1993), und der Nebennierenrinde von verschiedenen Spezies, im Herzen von Hasen und Rindern (Swanson *et al.*, 1992; Jarvis *et al.*, 1992) zu finden.

Angiotensin IV verstärkt die Gedächtnisleistung (Braszko *et al.*, 1988) und induziert c-fos Expression im Hippocampus (Roberts *et al.*, 1995). Allerdings wird das Wachstum von Neuriten in kultivierten, embryonalensympathischen Neuronen inhibiert (Moeller *et al.*, 1996). Da die Hämorphine und Angiotensin IV sich den gleichen Rezeptor (Ang IV-R) und die gleichen Abbauweg teilen (Aminopeptidase N), könnte dies ein Indiz dafür sein, dass sie die endogenen Analoge des Angiotensin IV im Gehirn und der Niere sind (Moeller *et al.*, 1997).

Allerdings kann man aufgrund unserer Befunde davon ausgehen, dass der BRS-3 nicht dem putativen Angiotensin IV-Rezeptor entspricht, da keinerlei Interaktion von Angiotensin IV mit dem BRS-3 zu beobachten ist.

#### **4.6 Ausblick**

Abschließend stellt sich die Frage, ob neben den isolierten Liganden VV-H-7 und LVV-H-7 weitere endogene Liganden des BRS-3 existieren. Es ist davon auszugehen, dass Hämorphine durch die proteolytische Spaltung von Hämoglobin nach vorhergehender Lyse von Erythrozyten entstehen. Wie die Untersuchungen an BRS-3 knock-out Mäusen zeigen, spielt dieser Rezeptor bei der Regulation des Körpergewichtes und der Kontrolle des Insulin- und Glucosemetabolismus (s.1.5.2) eine wichtige Rolle (Ohki-Hamazaki *et al.*, 1997b). Da deswegen kurzfristig (Insulinkonzentration) bzw. langfristig (Körpergewicht) wichtige physiologische Änderungen bewirkt werden, kann dies wahrscheinlich nicht allein durch die Lyse von Erythrozyten und die hydrolytische Spaltung von Hämoglobin geschehen. Es ist durchaus denkbar, dass weitere Liganden für den BRS-3 im Hypothalamus gefunden werden, da dies das Zentrum zur Kontrolle des Körpergewichts ist und der Rezeptor dort exprimiert wird.

Die Hämorphine treten bei pathophysiologischen Zuständen auf (Gehirnblutungen, mikroangiopathischen hämolytischen Anämie, in der Lungenlavage eines Patienten mit Adenokarzinoms der Lunge). Hohe Konzentrationen der Hämorphine in der Lungenlavage eines Lungentumorpatienten sind in diesem Zusammenhang zu erwähnen, da auch Lungenkarzinomzelllinien den BRS-3 exprimieren. Möglicherweise können die in dieser

Arbeit isolierten und charakterisierten spezifische Liganden als Ausgangspunkt zur Entwicklung von hochaffinen Agonisten oder Antagonisten führen.

## 5 Literaturverzeichnis

Aguayo SM, Kane MA, King TE Jr, Schwarz MI, Grauer L, Miller YE. (1989) Increased levels of bombesin-like peptides in the lower respiratory tract of asymptomatic cigarette smokers. *J Clin Invest*; **84**: 1105-13

Ahmad S, Ward PE. (1990) Role of aminopeptidase activity in the regulation of the pressor activity of circulating angiotensins. *J Pharmacol Exp Ther*; **252**: 643-50

Akeson M, Sainz E, Mantey SA, Jensen RT, Battey JF. (1997) Identification of four amino acids in the gastrin-releasing peptide receptor that are required for high affinity agonist binding. *J Biol Chem*. **272**: 17405-9.

Anastasi A. (1971) Alytesin and bombesin, two peptide analogs from amphibian skin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*; **269**: 135-9

Ardailou R, Chansel D. (1997) Synthesis and effects of active fragments of angiotensin II. *Kidney Int*; **52**: 1458-68

Attwood TK, Findlay JB. (1994) Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Eng*; **7**: 195-203

Battey JF, Way JM, Corjay MH, Shapira H, Kusano K, Harkins R, Wu JM, Slattery T, Mann E, Feldman RI (1991) Molecular cloning of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor from Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci*; **88**: 395-9

Berman DM, Gilman AG. (1998) Mammalian RGS proteins: barbarians at the gate. *J Biol Chem*; **273**: 1269-72

Bertaccini G, Impicciatore M. (1975) Action of bombesin on the motility of the stomach. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*; **289**: 149-56

van Biesen T, Hawes BE, Luttrell DK, Krueger KM, Touhara K, Porfiri E, Sakaue M, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. (1995) Receptor-tyrosine-kinase- and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature*; **376**: 781-4

Bouvier M, Hausdorff WP, De Blasi A, O'Dowd BF, Kobilka BK, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1988) Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature*; **333**: 370-3

Brantl V, Gramsch C, Lottspeich F, Mertz R, Jaeger KH, Herz A. (1986) Novel opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins. *Eur J Pharmacol.* **125**: 309-310.

Braszko JJ, Kupryszewski G, Witczuk B, Wisniewski K (1988) Angiotensin II-(3-8)-hexapeptide affects motor activity, performance of passive avoidance and a conditioned avoidance response in rats. *Neuroscience*, **27**:777-83

Chambers J, Ames RS, Bergsma D, Muir A, Fitzgerald LR, Hervieu G, Dytko GM, Foley JJ, Martin J, Liu WS, Park J, Ellis C, Ganguly S, Konchar S, Cluderay J, Leslie R, Wilson S, Sarau HM. (1999) Melanin-concentrating hormone is the cognate ligand for the orphan G-protein-coupled receptor SLC-1. *Nature*; **400**: 261-5

Chang RC, Huang WY, Redding TW, Arimura A, Coy DH, Schally AV (1980) Isolation and structure of several peptides from porcine hypothalami. *Biochim Biophys Acta*; **625**: 266-73

Chatzistamou I, Schally AV, Sun B, Armatis P, Szepeshazi K. (2000) Inhibition of growth of OV-1063 human epithelial ovarian cancers and c-jun and c-fos oncogene expression by bombesin antagonists. *Br J Cancer.* **83**: 906-13.

Chave HS, Gough AC, Palmer K, Preston SR, Primrose JN. (2000) Bombesin family receptor and ligand gene expression in human colorectal cancer and normal mucosa. *Br J Cancer.* **82**: 124-30.

Corjay MH, Dobrzanski DJ, Way JM, Viallet J, Shapira H, Worland P, Sausville EA, Battey JF (1991) Two distinct bombesin receptor subtypes are expressed and functional in human lung carcinoma cells *J Biol Chem* ;**266**: 18771-9

Coy D, Wang LH, Jiang NY, Jensen R. (1990) Short chain bombesin pseudopeptides with potent bombesin receptor antagonist activity in rat and guinea pig pancreatic acinar cells. *Eur J Pharmacol*; **190**: 31-8

Cuttitta F, Carney DN, Mulshine J, Moody TW, Fedorko J, Fischler A, Minna JD. (1985) Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. *Nature*; **316**: 823-6

DeMichele MA, Davis AL, Hunt JD, Landreneau RJ, Siegfried JM. (1994) Expression of mRNA for three bombesin receptor subtypes in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **11**: 66-74.

Dohlman HG, Thorner J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1991) Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem*. **60**: 653-88.

Drews J. (1996) Genomic sciences and the medicine of tomorrow. *Nat Biotechnol* **14**: 1516-8

Dryja TP, Li T. (1995) Molecular genetics of retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet*; **4**: 1739-43

Duethman D, Dewan N, Conlon JM. (2000) Isolation of the opioid peptide Leu-Val-Val-hemorphin-7 from bronchoalveolar lavage fluid of a patient with non-small cell lung cancer. *Peptides*. **21**: 137-142.

Eng JK, McCormack AL, Yates JR III. (1994) An Approach to Correlate Tandem Mass Spectral Data of Peptides with Amino Acid Sequences in a Protein Database. *J Am Mass Spectrom*. **5**: 976 - 989

Erickson AK, Payne DM, Martino PA, Rossomando AJ, Shabanowitz J, Weber MJ, Hunt DF, Sturgill TW (1990) Identification by mass spectrometry of threonine 97 in bovine myelin basic protein as a specific phosphorylation site for mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*; **265**: 19728-35

Fathi Z, Corjay MH, Shapira H, Wada E, Benya R, Jensen R, Viallet J, Sausville EA, Battey JF. (1993) BRS-3: a novel bombesin receptor subtype selectively expressed in testis and lung carcinoma cells. *J Biol Chem*. **268**: 5979-84.

Fathi Z, Way JW, Corjay MH, Viallet J, Sausville EA, Battey JF. (1996) Bombesin receptor structure and expression in human lung carcinoma cell lines. *J Cell Biochem Suppl*. **24**: 237-46.

Figeys D, Oostveen I v, Ducret A, Aebersold R (1996) Protein Identification by Capillary Zone Electrophoresis/Microelectrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry at the Subfemtomole Level. *Anal Chem.* **68**: 1822-8.

Flower DR (1999) Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochim Biophys Acta.*; **1422**: 207-34.

Forssmann K, Hock D, Herbst F, Schulz-Knappe P, Talartschik J, Scheler F, Forssmann WG (1986) Isolation and structural analysis of the circulating human cardiodilatin (alpha ANP). *Klin Wochenschr* **64**: 1276-80

Forssmann WG, Schulz-Knappe P, Meyer M, Adermann K, Forssmann K, Hock D, Aoki A. (1993) in *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> Japan Symposium on Peptide Chemistry* (Yanaihara, N. Ed.) pp 553 – 557, Escom, Leiden.

Frankel A, Tsao MS, Viallet J. (1994) Receptor subtype expression and responsiveness to bombesin in cultured human bronchial epithelial cells. *Cancer Res*; **54**: 1613-6

Fruitier I, Garreau I, Piot JM. (1998) Cathepsin D is a good candidate for the specific release of a stable hemorphin from hemoglobin in vivo: VV-hemorphin-7. *Biochem Biophys Res Commun.* **246**: 719-724.

Garcia LJ, Pradhan TK, Weber HC, Moody TW, Jensen RT. (1997) The gastrin-releasing peptide receptor is differentially coupled to adenylate cyclase and phospholipase C in different tissues. *Biochim Biophys Acta*; **1356**: 343-54

Gardiner SM, Kemp PA, Bennet T. (1993) Differential effects of captopril on regional haemodynamic responses to angiotensin I and bradykinin in conscious rats. *Br J Pharmacol*; **108**: 769 - 75

Garreau I, Chansel D, Vandermeersch S, Fruitier I, Piot JM, Ardaillou R (1998) Hemorphins inhibit angiotensin IV binding and interact with aminopeptidase N. *Peptides.* **19**:1339-1348.

Giladi E, Nagalla SR, Spindel ER. (1993) Molecular cloning and characterization of receptors for the mammalian bombesin-like peptides. *J Mol Neurosci*; **4**: 41-54

Glämsta EL, Meyerson B, Silberring J, Terenius L, Nyberg F. (1992) Isolation of a hemoglobin-derived opioid peptide from cerebrospinal fluid of patients with cerebrovascular bleedings. *Biochem Biophys Res Commun.* **184**: 1060-1066.

Glämsta EL, Morkrid L, Lantz I, Nyberg F. (1993) Concomitant increase in blood plasma levels of immunoreactive hemorphin-7 and beta-endorphin following long distance running. *Regul Pept.* **49**: 9-18.

Gorbulev V, Akhundova A, Buchner H, Fahrenholz F. (1992) Molecular cloning of a new bombesin receptor subtype expressed in uterus during pregnancy. *Eur J Biochem*; **208**: 405-10

Gorbulev V, Akhundova A, Grzeschik KH, Fahrenholz F. (1994) Organization and chromosomal localization of the gene for the human bombesin receptor subtype expressed in pregnant uterus. *FEBS Lett*; **340**: 260-4

Gutowski S, Smrcka A, Nowak L, Wu DG, Simon M, Sternweis PC. (1991) Antibodies to the alpha q subfamily of guanine nucleotide-binding regulatory protein alpha subunits attenuate activation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis by hormones. *J Biol Chem*; **266**: 20519-24

Hamm HE. (1998) The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem*; **273**: 669-72

Hannun YA, Loomis CR, Merrill AH Jr, Bell RM. (1986) Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. *J Biol Chem*; **261**: 2604-9

Harding JW, Cook VI, Miller-Wing AV, Hanesworth JM, Sardinia MF, Hall KL, Stobb JW, Swanson GN, Coleman JK, Wright JW, et al (1992) Identification of an AngII(3-8) [AngIV] binding site in guinea pig hippocampus. *Brain Res*; **583**: 340-3

Hausdorff WP, Bouvier M, O'Dowd BF, Irons GP, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1989) Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J Biol Chem*; **264**:12657-65

Hellmich MR, Ives KL, Udipi V, Soloff MS, Greeley GH, Christensen BN, Townsend CM (1999) Multiple protein kinase pathways are involved in Gastrin-releasing peptide Receptor-regulated secretion. *J Biol Chem*; **274**: 23901-09

Henderson R, Schertler GF. (1990) The structure of bacteriorhodopsin and its relevance to the visual opsins and other seven-helix G-protein coupled receptors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; **326**: 379-89

Herbert JM, Augereau JM, Gleye J, Maffrand JP. (1990) Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun*; **172**: 993-9

Hess R, Kuhn M, Schulz-Knappe P, Raida M, Fuchs M, Klodt J, Adermann K, Kaefer V, Cetin Y, Forssmann WG. (1995) GCAP-II: isolation and characterization of the circulating form of human uroguanylin. *FEBS Lett*; **374**: 34-8

Hinuma S, Habata Y, Fujii R, Kawamata Y, Hosoya M, Fukusumi S, Kitada C, Masuo Y, Asano T, Matsumoto H, Sekiguchi M, Kurokawa T, Nishimura O, Onda H, Fujino M. (1998) A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature* ; **393**: 272-276

Hipskind RA, Rao VN, Mueller CG, Reddy ES, Nordheim A. (1991) Ets-related protein Elk-1 is homologous to the c-fos regulatory factor p62TCF. *Nature*; **354**: 531-4

Horn F., Weare J., Beukers M.W., Hörsch S., Bairoch A., Chen W., Edvardsen O., Campagne F., and Vriend G. (1998) GPCRDB: an information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acid Res.* **26**: 275 – 281.

Hoth M, Penner R. (1992) Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*; **355**: 353-6

Hotta K, Matsukawa Y, Nishida M, Kotani K, Takahashi M, Kuriyama H, Nakamura T, Wada K, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. (2000) Mutation in bombesin receptor subtype-3 gene is not a major cause of obesity in the Japanese. *Horm Metab Res.* **32**: 33-4.

Howard AD, McAllister G, Feighner SD, Liu Q, Nargund RP, Van der Ploeg LH, Patchett AA. (2001) Orphan G-protein-coupled receptors and natural ligand discovery. *Trends Pharmacol Sci* ; **22**: 132-40

Jarvis MF, Gessner GW, Ly CQ (1992) The angiotensin hexapeptide 3-8 fragment potently inhibits [<sup>125</sup>I]angiotensin II binding to non-AT1 or -AT2 recognition sites in bovine adrenal cortex. *Eur J Pharmacol*; **219**: 319-22

Jian X, Sainz E, Clark WA, Jensen RT, Battey JF, Northup JK. (1999) The bombesin receptor subtypes have distinct G protein specificities. *J Biol Chem*. **274**: 11573-81.

Jiang Y, Ma W, Wan Y, Kozasa T, Hattori S, Huang XY. (1998) The G protein G alpha12 stimulates Bruton's tyrosine kinase and a rasGAP through a conserved PH/BM domain. *Nature*, **395**: 808-13

Johnson DE, Lock JE, Elde RP, Thompson TR. (1982) Pulmonary neuroendocrine cells in hyaline membrane disease and bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Res*; **16**: 446-54

Jordan BA, Devi LA (1999) G-protein coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* **399**, 697-700.

Kachur JF, Miller RJ, Field M, Rivier J. (1982) Neurohumoral control of ileal electrolyte transport. I. Bombesin and related peptides. *J Pharmacol Exp Ther* ; **220**: 449-55

Kiaris H, Schally AV, Nagy A, Sun B, Armatas P, Szepeshazi K. (1999) Targeted cytotoxic analogue of bombesin/gastrin-releasing peptide inhibits the growth of H-69 human small-cell lung carcinoma in nude mice. *Br J Cancer*. **81**: 966-71.

Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*; **402**: 656-60

Kozasa T, Hepler JR, Smrcka AV, Simon MI, Rhee SG, Sternweis PC, Gilman AG. (1993) Purification and characterization of recombinant G16 alpha from Sf9 cells: activation of purified phospholipase C isozymes by G-protein alpha subunits. *Proc Natl Acad Sci*; **90**: 9176-80

Kozasa T, Jiang X, Hart MJ, Sternweis PM, Singer WD, Gilman AG, Bollag G, Sternweis PC. (1998) p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Galpha12 and Galpha13. *Science*; **280**: 2109-11

Kuhn M, Raida M, Adermann K, Schulz-Knappe P, Gerzer R, Heim JM, Forssmann WG. (1993) The circulating bioactive form of human guanylin is a high molecular weight peptide (10.3 kDa). FEBS Lett; **318**: 205-9

Lach EB, Broad S, Rozengurt E. (1995) Mitogenic signaling by transfected neuromedin B receptors in Rat-1 cells. Cell Growth Differ; **6**: 1427-35

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature; **227**: 680-5

Lantz I, Glämsta EL, Talback L, Nyberg F. (1991) Hemorphins derived from hemoglobin have an inhibitory action on angiotensin converting enzyme activity. FEBS Lett. **287**: 39-41.

Lefkowitz RJ. (1993) G protein-coupled receptor kinases. Cell; **74**: 409-12

Lehy T, Accary JP, Labeille D, Dubrasquet M (1983) Chronic administration of bombesin stimulates antral gastrin cell proliferation in the rat. Gastroenterology; **84**: 914-9

Lijnen P, Hespel P, Fagard R, Lysens R, Vanden Eynde E, Goris M, Goossens W, Lissens W, Amery A (1988) Indicators of cell breakdown in plasma of men during and after a marathon race. Int J Sports Med, 9: 108-13

Liu F, Wan Q, Pristupa ZB, Yu XM, Wang YT, Niznik HB. (2000) Direct protein-protein coupling enables cross-talk between dopamine D5 and gamma-aminobutyric acid A receptors. Nature; **403**: 274-80

Lohrmann HP, Adam W, Heymer B, Kubanek B. (1973) Microangiopathic hemolytic anemia in metastatic carcinoma. Report of eight cases. Ann Intern Med; **79**: 368-75

Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, Miller WE, Field ME, Pierce KL, Lefkowitz RJ. (2001) Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta -arrestin scaffolds. Proc Natl Acad Sci; **98**: 2449-2454

Majerus PW. (1992) Inositol phosphate biochemistry. Annu Rev Biochem; **61**: 225-50

Mantey SA, Weber HC, Sainz E, Akeson M, Ryan RR, Pradhan TK, Searles RP, Spindel ER, Battey JF, Coy DH, Jensen RT. (1997) Discovery of a high affinity radioligand for the human orphan receptor, bombesin receptor subtype 3, which demonstrates that it has a unique pharmacology compared with other mammalian bombesin receptors. *J Biol Chem.* **272**: 26062-71.

Mantey SA, Coy DH, Pradhan TK, Igarashi H, Rizo IM, Shen L, Hou W, Hocart SJ, Jensen RT. (2001) Rational design of a peptide agonist that interacts selectively with the orphan receptor, bombesin receptor subtype 3. *J Biol Chem.* **276**: 9219-9229.

McDonald TJ, Nilsson G, Vagne M, Ghatei M, Bloom SR, Mutt V (1978) A gastrin releasing peptide from the porcine nonantral gastric tissue. *Gut* **19**: 767-74.

McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM. (1998) RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*; **393** (6683):333-9

McMaster GK, Carmichael GG. (1977) Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc Natl Acad Sci*; **74**: 4835-8

Menard L, Ferguson SS, Zhang J, Lin FT, Lefkowitz RJ, Caron MG, Barak LS. (1997) Synergistic regulation of beta2-adrenergic receptor sequestration: intracellular complement of beta-adrenergic receptor kinase and beta-arrestin determine kinetics of internalization. *Mol Pharmacol*; **51**: 800-8

Miller-Wing AV, Hanesworth JM, Sardinia MF, Hall KL, Wright JW, Speth RC, Grove KL, Harding JW (1993) Central angiotensin IV binding sites: distribution and specificity in guinea pig brain. *J Pharmacol Exp Ther*; **266**: 1718-26

Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. (1983) Neuromedin B: a novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun*; **114**: 541-8

Moeller I, Small DH, Reed G, Harding JW, Mendelsohn FA, Chai SY (1996) Angiotensin IV inhibits neurite outgrowth in cultured embryonic chicken sympathetic neurones. *Brain Res*; **725**:61-6

Moeller I, Lew RA, Mendelsohn FA, Smith AI, Brennan ME, Tetaz TJ, Chai SY. (1997) The globin fragment LVV-hemorphin-7 is an endogenous ligand for the AT4 receptor in the brain. *J Neurochem.* **68**: 2530-2537.

Nagalla SR, Barry BJ, Creswick KC, Eden P, Taylor JE (1995) Cloning of a receptor for amphibian [Phe<sup>13</sup>] bombesin distinct from the receptor for gastrin-releasing peptide: Identification of a fourth bombesin receptor subtype (BB<sub>4</sub>). *Proc Natl Acad Sci.* **92**: 6205-9.

Nevaril CG, Lynch EC, Alfrey CP Jr, Hellums JD. (1968) Erythrocyte damage and destruction induced by shearing stress. *J Lab Clin Med*; **71**:784-90

Nyberg G, Sanderson K, Andren P, Thornwall M, Einarsson M, Danielson B, Nyberg F. (1996) Isolation of haemorphin-related peptides from filter membranes collected in connection with haemofiltration of human subjects. *J Chromatogr A.* **723**: 43-49.

O'Dowd, B. F., Hnatowich, M., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., Bouvier, M (1989) Palmitoylation of the human beta 2-adrenergic receptor. Mutation of Cys341 in the carboxyl tail leads to an uncoupled nonpalmitoylated form of the receptor. *J Biol Chem.*; **264**: 7564-9.

Offermanns S, Simon MI. (1995) G alpha 15 and G alpha 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C. *J Biol Chem*; **270**: 15175-80

Ohki-Hamazaki H, Wada E, Matsui K, Wada K. (1997 a) Cloning and expression of the neuromedin B receptor and the third subtype of bombesin receptor genes in the mouse. *Brain Res.* **762**: 165-72.

Ohki-Hamazaki H, Watase K, Yamamoto K, Ogura H, Yamano M, Yamada K, Maeno H, Imaki J, Kikuyama S, Wada E, Wada K. (1997 b) Mice lacking bombesin receptor subtype-3 develop metabolic defects and obesity. *Nature.* **390**: 165-9.

Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. (2001) Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*; **411**: 613-7

Orbuch M, Taylor JE, Coy DH, Mrozinski JE Jr, Mantey SA, Battey JF, Moreau JP, Jensen RT. (1993) Discovery of a novel class of neuromedin B receptor antagonists, substituted somatostatin analogues. *Mol Pharmacol*; **44**: 841-50

Ovchinnikov YuA, Abdulaev NG, Bogachuk AS. (1988) Two adjacent cysteine residues in the C-terminal cytoplasmic fragment of bovine rhodopsin are palmitoylated. *FEBS Lett*, **230**: 1-5

Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*; **289**: 739-45

Pan Y, Metzenberg A, Das S, Jing B, Gitschier J. (1992) Mutations in the V2 vasopressin receptor gene are associated with X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *Nat Genet*; **2**: 103-6

Parekh AB, Penner R. (1997) Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev*; **77**: 901-30

Plonowski A, Nagy A, Schally AV, Sun B, Groot K, Halmos G. (2000) In vivo inhibition of PC-3 human androgen-independent prostate cancer by a targeted cytotoxic bombesin analogue, AN-215. *Int J Cancer*. **88**: 652-7.

Pradhan TK, Katsuno T, Taylor JE, Kim SH, Ryan RR, Mantey SA, Donohue PJ, Weber HC, Sainz E, Battey JF, Coy DH, Jensen RT. (1998) Identification of a unique ligand which has high affinity for all four bombesin receptor subtypes. *Eur J Pharmacol*. **343**: 275-87.

Premont RT, Inglese J, Lefkowitz RJ (1995) Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *FASEB J*. **9** : 175-82.

Probst WC, Snyder LA, Schuster DI, Brosius J, Sealfon SC. (1992) Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol*; **11**: 1-20

Raddatz R, Wilson AE, Artymyshyn R, Bonini JA, Borowsky B, Boteju LW, Zhou S, Kouranova EV, Nagorny R, Guevarra MS, Dai M, Lerman GS, Vaysse PJ, Branchek TA, Gerald C, Forray C, Adham N. (2000) Identification and characterization of two neuromedin U receptors differentially expressed in peripheral tissues and the central nervous system. *J Biol Chem*; **275**: 32452-9

Ray LB, Sturgill TW (1987) Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro. *Proc Natl Acad Sci*; **84**: 1502-6

Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A, Ardati A, Henningsen RA, Bunzow JR, Grandy DK, Langen H, Monsma FJ Jr, Civelli O. (1995) Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science*; **270**: 792-4

Roberts KA, Krebs LT, Kramar EA, Shaffer MJ, Harding JW, Wright JW (1995) Autoradiographic identification of brain angiotensin IV binding sites and differential c-Fos expression following intracerebroventricular injection of angiotensin II and IV in rats. *Brain Res*; **682**: 13-21

Rodriguez-Fernandez JL, Rozengurt E. (1996) Bombesin, bradykinin, vasopressin, and phorbol esters rapidly and transiently activate Src family tyrosine kinases in Swiss 3T3 cells. Dissociation from tyrosine phosphorylation of p125 focal adhesion kinase. *J Biol Chem*; **271**: 27895-901

Ryan RR, Weber HC, Hou W, Sainz E, Mantey SA, Battey JF, Coy DH, Jensen RT. (1997) Ability of various bombesin receptor agonists and antagonists to alter intracellular signaling of the human orphan receptor BRS-3. *J Biol Chem*. **273**: 13613-24.

Ryan RR, Weber HC, Mantey SA, Hou W, Hilburger ME, Pradhan TK, Coy DH, Jensen RT. (1998) Pharmacology and intracellular signaling mechanisms of the native human orphan receptor BRS-3 in lung cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther*. **287**: 366-80.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*; **239**: 487-91

Sainz E, Akesson M, Mantey SA, Jensen RT, Battey JF. (1998) Four amino acid residues are critical for high affinity binding of neuromedin B to the neuromedin B receptor. *J Biol Chem*. **273**: 15927-32.

Saito Y, Nothacker HP, Wang Z, Lin SH, Leslie F, Civelli O. (1999) Molecular characterization of the melanin-concentrating-hormone receptor. *Nature*, **400**: 265-9

Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M. (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*; **92**: 573-85

Salazar EP, Rozengurt E. (2001) Src family kinases are required for integrin-mediated but not for G protein-coupled receptor stimulation of focal adhesion kinase autophosphorylation at Tyr-397. *J Biol Chem*; **276**: 17788-95

Sambrook J, Greene R, Stringer J, Mitchison T, Hu SL, Botchan M. (1980) Analysis of the sites of integration of viral DNA sequences in rat cells transformed by adenovirus 2 or SV40. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*; **44**: 569-84

Schepky AG, Bensch KW, Schulz-Knappe P, Forssmann WG. (1994) Human hemofiltrate as a source of circulating bioactive peptides: determination of amino acids, peptides and proteins. *Biomed Chromatogr*; **8**: 90-4

Schulz-Knappe P, Magert HJ, Dewald B, Meyer M, Cetin Y, Kubbies M, Tomeczkowski J, Kirchhoff K, Raida M, Adermann K, Kist A., Reinecke M, Silard R., Pardigol A, Uguccioni M, Baggioloni M, Forssmann W.-F. (1996) HCC-1, a novel chemokine from human plasma. *J Exp Med*; **183**: 295-9

Schulz-Knappe P, Schrader M, Standker L, Richter R, Hess R, Jurgens M, Forssmann WG. (1997) Peptide bank generated by large-scale preparation of circulating human peptides. *J Chromatogr A*; **776**: 125-32

Seckl M, Rozengurt E. (1993) Tyrphostin inhibits bombesin stimulation of tyrosine phosphorylation, c-fos expression, and DNA synthesis in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem*; **268**: 9548-54

Seiler P, Standker L, Mark S, Hahn W, Forssmann WG, Meyer M. (1999) Application of a peptide bank from porcine brain in isolation of regulatory peptides. *J Chromatogr A*; **852**: 273-83

Seufferlein T, Withers DJ, Mann D, Rozengurt E. (1996) Dissociation of mitogen-activated protein kinase activation from p125 focal adhesion kinase tyrosine phosphorylation in Swiss

3T3 cells stimulated by bombesin, lysophosphatidic acid, and platelet-derived growth factor. *Mol Biol Cell*; **7**: 1865-75

Sinnett-Smith J, Zachary I, Valverde AM, Rozengurt E. (1993) Bombesin stimulation of p125 focal adhesion kinase tyrosine phosphorylation. Role of protein kinase C, Ca<sup>2+</sup> mobilization, and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*; **268**: 14261-8

Smrcka AV, Hepler JR, Brown KO, Sternweis PC. (1991) Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science*; **251**: 804-7

Smith RJ, Sam LM, Justen JM, Bundy GL, Bala GA, Bleasdale JE. (1990) Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness. *J Pharmacol Exp Ther*; **253**: 688-97

Spindel ER, Giladi E, Brehm P, Goodman RH, Segerson TP (1990) Cloning and functional characterization of a complementary DNA encoding the murine fibroblast bombesin/gastrin-releasing peptide receptor. *Mol Endocrinol*; **4**: 1956-63

Sternweis PC, Smrcka AV (1992). Regulation of phospholipase C by G proteins. *Trends Biochem Sci*; **17**: 502-6

Stiles GL, Benovic JL, Caron MG, Lefkowitz RJ (1984) Mammalian beta-adrenergic receptors. Distinct glycoprotein populations containing high mannose or complex type carbohydrate chains. *J Biol Chem*. **259**: 8655-63.

Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D (1994) Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem* **63**: 101-132

Sun B, Schally AV, Halmos G. (2000 a) The presence of receptors for bombesin/GRP and mRNA for three receptor subtypes in human ovarian epithelial cancers. *Regul Pept*. **90**:77-84.

Sun B, Halmos G, Schally AV, Wang X, Martinez M. (2000 b) Presence of receptors for bombesin/gastrin-releasing peptide and mRNA for three receptor subtypes in human prostate cancers. *Prostate*. **42**: 295-303.

Sunday ME, Kaplan LM, Motoyama E, Chin WW, Spindel ER (1998) Biology of disease: Gastrin-releasing peptide (mammalian bombesin) gene expression in health and disease. *Lab Invest*; **59**: 5-24.

Swanson GN, Hanesworth JM, Sardinia MF, Coleman JK, Wright JW, Hall KL, Miller-Wing AV, Stobb JW, Cook VI, Harding EC, et al (1992) Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regul Pept*; **40**: 409-19

Szekeres PG, Muir AI, Spinage LD, Miller JE, Butler SI, Smith A, Rennie GI, Murdock PR, Fitzgerald LR, Wu HI, McMillan LJ, Guerrera S, Vawter L, Elshourbagy NA, Mooney JL, Bergsma DJ, Wilson S, Chambers JK. (2000) Neuromedin U is a potent agonist at the orphan G protein-coupled receptor FM3. *J Biol Chem*; **275**: 20247-50

Szikra J, Benyhe S, Orosz G, Darula Z, Piot JM, Fruitier I, Monory K, Hanoune J, Borsodi A (2001) Radioligand binding properties of VV-hemorphin 7, an atypical opioid peptide. *Biochem Biophys Res Commun*; **281**: 670-7

Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, Kawamata Y, Fukusumi S, Hinuma S, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Fujino M. (1998) Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun*; **251**: 471-6

Taylor JE (1995) Human small cell cancer cells express high affinity naloxone-insensitive [<sup>125</sup>I]-endorphin binding sites. *Life Sci*; **56**: PL 97-102

Thomas F, Arvelo F, Antoine E, Jacrot M, Poupon MF. (1992) Antitumoral activity of bombesin analogues on small cell lung cancer xenografts: relationship with bombesin receptor expression. *Cancer Res*; **52**: 4872-7

Toi-Scott M, Jones CL, Kane MA. (1996) Clinical correlates of bombesin-like peptide receptor subtype expression in human lung cancer cells. *Lung Cancer*. **15**: 341-54.

Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E, Loriolle F, et al. (1991) The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem*; **266**: 15771-81

Traverse S, Gomez N, Paterson H, Marshall C, Cohen P. (1992) Sustained activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade may be required for differentiation of PC12 cells. Comparison of the effects of nerve growth factor and epidermal growth factor. *Biochem J*; 288: 351-5

Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem*; **269**:5241-8

Wada E, Way J, Shapira H, Kusano K, Lebacqz-Verheyden AM, Coy D, Jensen R, Batterry J (1991) cDNA cloning, characterization, and brain region-specific expression of a neuromedin-B-preferring bombesin receptor. *Neuron*; **6**: 421-30

Wajnrajch MP, Gertner JM, Harbison MD, Chua SC Jr, Leibel RL. (1996) Nonsense mutation in the human growth hormone-releasing hormone receptor causes growth failure analogous to the little (lit) mouse. *Nat Genet*; **12**: 88-90

Weber HC, Walters J, Leyton J, Casibang M, Purdom S, Jensen RT, Coy DH, Ellis C, Clark G, Moody TW. (2001) A bombesin receptor subtype-3 peptide increases nuclear oncogene expression in a MEK-1 dependent manner in human lung cancer cells. *Eur J Pharmacol* 2001; 412: 13-20

Wharton J, Polak JM, Bloom SR, Ghatei MA, Solcia E, Brown MR, Pearse AGE. (1978) Bombesin-like immunoreactivity in the lung. *Nature*, **273**: 769-770.

Wu JM, Nitecki DE, Biancalana S, Feldman RI. (1996) Discovery of high affinity bombesin receptor subtype 3 agonists. *Mol Pharmacol*. **50**:1355-63.

Yamada K, Wada E, Imaki J, Ohki-Hamazaki H, Wada K. (1999) Hyperresponsiveness to palatable and aversive taste stimuli in genetically obese (bombesin receptor subtype-3-deficient) mice. *Physiol Behav*. **66**: 863-7.

Yamada K, Ohki-Hamazaki H, Wada K. (2000) Differential effects of social isolation upon body weight, food consumption, and responsiveness to novel and social environment in bombesin receptor subtype-3 (BRS-3) deficient mice. *Physiol Behav*. **68**:555-61.

Yates JR III, Eng JK, McCormack AL, Schieltz D (1995) Method to correlate tandem mass spectra of modified peptides to amino acid sequences in the protein database. *Anal Chem.* **67**: 1426 – 36.

Yates JR III., McCormack AL, Eng JK (1996) Mining genomes with MS. *J Anal Chem.* **68**: 534A – 40A.

Yatskin ON, Philippova MM, Blishchenko EYu, Karelin AA, Ivanov VT. (1998) LVV- and VV-hemorphins: comparative levels in rat tissues. *FEBS Lett.* **428**: 286-90.

Zachary I, Gil J, Lehmann W, Sinnott-Smith J, Rozengurt E. (1991) Bombesin, vasopressin, and endothelin rapidly stimulate tyrosine phosphorylation in intact Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci*; **88**: 4577-81

Zachary I, Sinnott-Smith J, Rozengurt E. (1992) Bombesin, vasopressin, and endothelin stimulation of tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells. Identification of a novel tyrosine kinase as a major substrate. *J Biol Chem*; **267**: 19031-4

Zhang J, Ferguson SSG, Barak LS, Menard L, Caron MG (1996) Dynamin and  $\beta$ -Arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J. Biol. Chem.* **271**: 18302 - 18305

Zhang FL, Luo L, Gustafson E, Lachowicz J, Smith M, Qiao X, Liu YH, Chen G, Pramanik B, Laz TM, Palmer K, Bayne M, Monsma F. (2001) ADP is the cognate ligand for the orphan G-protein coupled receptor SP1999. *J. Biol. Chem.* **276**: 8608-8615

Zhao Q, Sannier F, Garreau I, Guillochon D, Piot JM (1994) Inhibition and inhibition kinetics of angiotensin converting enzyme activity by hemorphins, isolated from a peptic bovine hemoglobin hydrolysate. *Biochem Biophys Res Commun.* **204**: 216-23.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides Statt, daß die vorliegende Dissertation von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt wurde. Zu Hilfsleistungen herangezogene Institutionen habe ich vollständig angegeben. Ich versichere ferner, daß die Dissertation nicht schon als Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hans-Peter Lammerich

Hannover, 15.10.2001

## **Danksagung**

Ich danke Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wolf-Georg Forssmann für die Möglichkeit, diese Promotion im Rahmen des Orphan-Rezeptor Projektes in der IPF PharmaCeuticals GmbH in Hannover anfertigen zu können.

Für die kompetente Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit möchte ich vor allem Dr. Annette Busmann danken, die mir bei allen Problemen stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ebenso möchte ich Priv. Doz. Dr. Erik Maronde für die stete Diskussionsbereitschaft und wichtige Anregungen danken.

Für die Übernahme des Referates möchte ich Prof. Dr. Walter Müller vom Zentrum Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover und für die Übernahme des Koreferates Prof. Dr. Bernd Otto vom Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Aerosolforschung, Hannover, danken.

Mein Dank gilt weiterhin Dr. rer. nat. Christian Kutzleb für die Unterstützung bei den molekularbiologischen Arbeiten, Dr. rer. nat. Martin Wendland für die Unterstützung bei den Arbeiten zur Transfektion der Zellen und cand. rer. nat. Michael Walden für die Unterstützung bei den Arbeiten am LCQ-ESI-Massenspektrometer.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Abteilung Präparative Peptidchemie, Ute Block, Susann Busch, Viktor Habermehl, Wilfried Hahn, Susanne Hollrieder, Rolf Kopittke, Dr. med. Rudolf Richter, Ulrike Schrameck, Dr. rer. nat. Ludger Ständker, Ilka Uhrlandt, Hans Dieter Walouch und Daniela Zoch für die stets freundliche und kollegiale Zusammenarbeit.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Projektes "Isolierung und Identifizierung pharmakologisch wirksamer Peptidstoffe aus menschlichem Blutfiltrat über molekularbiologische Orphanrezeptorsysteme" durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) (Förderkennzeichen: 0311797) finanziell unterstützt.

## **Publikationen**

Behandlung von Braunkohlebestandteilen zum Zwecke der Veredelung

Erfinder: Fakoussa R.M.; Lammerich, H.-P.; Goetz G.

Pat.Nr.: DE19945975 A

Hemorphins as endogenous ligands for human G-protein coupled bombesin receptor subtype 3. Lammerich H.-P., Busmann A., Kutzleb C., Wendland M, Seiler P., Berger C., Eickelmann P., Markus Meyer M. , Forssmann W. G.; Maronde E

Patentanmeldung Nr.: 01102383.5-1223

Hemorphins VV-H-7 and LVV-H-7 activate the orphan bombesin subtype 3 receptor

Lammerich H.-P., Busmann A., Kutzleb C., Wendland M, Seiler P., Berger C., Eickelmann P., Markus Meyer M. , Forssmann W. G.; Maronde E. FEBS Lett submitted

# **Lebenslauf**

## **Persönliche Daten**

Name: Hans-Peter Lammerich

Geburtsdatum /-ort: 29.01.1973 in Porz / Köln

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

## **Schulische Ausbildung**

August 1979 – Juni 1983: Kath. Grundschule Rheidt, Stadt Niederkassel

August 1983 – Juni 1992: städt. Kopernikus-Gymnasium Niederkassel

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

## **Wehrdienst**

Juli 1992 – September 1993: Zivildienst Arbeiter Samariter Bund, Rhein-Sieg

## **Hochschulausbildung**

Oktober 1993 – September 1998: Studium der Biologie an der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Abschluss: Diplom

seit November 1998: Promotionsstudium am IPF PharmaCeuticals GmbH, Hannover

(An-Institut der Medizinischen Hochschule Hannover)