THE CFTR-BASED HIGH-THROUGHPUT SCREENING ASSAY FOR GPCR MODULATORS

BURANEE YANGTHARA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(PHYSIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2008

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

การคัดกรองหาสารปรับการทำงานของรีเซพเตอร์ที่จับกับจีโปรตีน โดยอาศัยซีเอฟทีอาร์โปรตีน (THE CFTR-BASED HIGH-THROUGHPUT SCREENING ASSAY FOR GPCR MODULATORS)

บุรณี อย่างธารา 4537109 SCPS/D

ปร.ด. (สรีรวิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: วรนุช ฉัตรสุทธิพงษ์ Ph.D.; แอลลัน เอส. เวิคแมน MD., Ph.D.; ชุมพล ผลประมูล Ph.D.; สุรศักดิ์ กัณตชูเวศิริ MD., Ph.D. และ ชัยรัตน์ ฉายากุล MD.

บทคัดย่อ

รีเซพเตอร์ที่จับกับจีโปรตีนเช่น เวโซเพรซซิน 2 รีเซพเตอร์ เป็นเป้าหมายที่สำคัญในการผลิตยา วิธีการคัดกรองหาสารปรับการทำงานของ รีเซพเตอร์ดังกล่าวได้รับการพัฒนาขึ้นในเซลล์ต่อมไทรอยด์ของหนูฟิชเชอร์ที่มี ซีเอฟทีอาร์ เวโซเพรซซิน 2 รีเซพเตอร์ และ โปรตีนเรืองแสงสีเหลือง (เป็นตัววัดคลอไรด์) โดยวัดปริมาณไซคลิกเอเอ็มพีที่เพิ่มขึ้นหลังการกระตุ้นรีเซพเตอร์ซึ่งจะไปมีผลเพิ่มความสามารถในการนำคลอไรด์ผ่าน ซีเอฟทีอาร์(ช่องทางผ่านของคลอไรด์) วิธีคัดกรองนี้ให้ค่าซีไพรมเฟคเตอร์ 0.71 ซึ่งเข้าเกณฑ์การคัดกรองที่ได้มาตรฐานดีมาก การใช้การคัดกรองแบบใหม่นี้กับสารเคมีโมเลกุลเล็กจำนวน 50,000 โมเลกุลพบโมเลกุล 2 ชนิดซึ่งมีฤทธิ์เป็นเวโซเพรซซิน 2 รีเซพเตอร์แอนทาโกนิส (5-aryl-4-benzoyl-3-hydroxy-1-(2-arylethyl)-2H-pyrrol-2-one หรือ V_2R_{inh}) และ สารที่อาจเป็นตัวกระตุ้นฟอสฟอไดเอสเตอเรสหรือเอนไซม์ที่สลายไซคลิกเอเอ็มพี (2-(acylamino)-3-thiophenecarboxylates หรือ PDE_{act}) ตามลำดับ V_2R_{inh} ตัวที่ดีที่สุดสามารถแทนที่เวโซเพรซซินกัมมันตภาพรังสีได้ 50% ที่ความเข้มข้น 70nM ในขณะที่ PDE_{act} ยับยั้งกระแสไฟฟ้าข้ามเซลล์ และ การเพิ่มขึ้นของไซคลิกเอเอ็มพีที่เกิดจาก ดีดีเอวีพี ฟอสโคลิน และ พิษคอเลราได้ รวมทั้งยังยั้งกระแสไฟฟ้าข้ามเซลล์จากไดบิวไทริวไซคลิกเอเอ็มพีได้ ดังนั้นกลไกการออกฤทธิ์ที่เป็นไปได้มากที่สุดจึงน่าจะเป็นการกระตุ้นฟอสโฟไดเอสเตอเรส คุณสมบัติของสารเคมีทั้งสองชนิดดังกล่าวสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการขับน้ำออกจากร่างกาย และใช้ในโรคหรือสภาวะที่มีการเพิ่มขึ้นอย่างผิดปรกติของไซคลิกเอเอ็มพี

161 หน้า

Copyright by Mahidol University

THE CFTR-BASED HIGH-THROUGHPUT SCREENING ASSAY FOR GPCR MODULATORS

BURANEE YANGTHARA 4537109 SCPS/D

Ph.D. (PHYSIOLOGY)

THESIS ADVISOR: VARANUJ CHATSUDIPONG, Ph.D.; ALAN S. VERKMAN, MD., Ph.D.; CHUMPOL PHOLPRAMOOL, Ph.D.; SURASAK KANTACHUVESIRI, MD., Ph.D. AND CHAIRAT SHAYAKUL, MD.

ABSTRACT

G-protein coupled receptors (GPCRs) such as the vasopressin-2 receptor (V_2R) are an important class of drug targets. An efficient high-throughput screening assay was developed for GPCR-induced cAMP elevation using as read-out cAMP activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Cl^- channels. Fischer rat thyroid cells expressing CFTR and a halide-sensing yellow fluorescent protein (YFP-H148Q/I152L) were transfected with V_2R. Increased cell Cl^- conductance following agonist-induced cAMP elevation was assayed using a platereader from the cell fluorescence following solution I^- addition. The Z'-factor for the assay was ~0.7 with the V_2R agonist dDAVP (1 nM) as positive control. Primary screening of 50,000 small molecules yielded novel classes of 5-aryl-4-benzoyl-3-hydroxy-1-(2-arylethyl)-2H-pyrrol-2-one (V_2R_{inh} class), a V_2R antagonist, and 2-(acylamino)-3-thiophenecarboxylates (PDE_{act} class), a possible phosphodiesterase activator. The most potent compounds in the V_2R_{inh} class, V_2R_{inh}-02, fully displaced the radiolabeled vasopressin in binding experiments with the IC_{50} of ~70 nM. Through reduction of the cAMP level, the PDE_{act} inhibited not only the dDAVP-, but also cholera toxin-, forskolin-, and dibutylryl cAMP-induced transepithelial currents. Therefore, activation of phosphodiesterase was a suggested mechanism action. The in vitro properties of the V_2R_{inh} and PDE_{act} suggested their potential utility in aquaretic applications, and in conditions with pathologic elevation of cyclic nucleotide levels, respectively.

KEY WORDS: G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR / VASOPRESSIN V_2 RECEPTOR / CFTR

161 pp.

Copyright by Mahidol University