

Entwicklung selektiver Peptidliganden für CRF₂-Rezeptoren

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Doreen Wietfeld

geb. am 24.06.1971 in Perleberg

Oktober 2005

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Rademann

Institut für Chemie und Biochemie der Freien Universität Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Bienert

Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie Berlin

Disputation am: 01. März 2006

Inmitten des Wirrwarrs gilt es, das Einfache zu finden.

Albert Einstein

Dank

Die vorliegende Arbeit ist ein Ergebnis des DFG-Projekts 299/2-1 „Optimierte molekulare Bibliotheken zum Studium biologischer Erkennungsprozesse“. Sie wurde am Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie (FMP) Berlin in der Abteilung Peptidchemie unter Betreuung von Herrn Dr. M. Beyermann und Herrn Prof. Dr. M. Bienert angefertigt. Ihnen gilt mein besonderer Dank für die interessante Themenstellung und stets gewährte Hilfe, ihre wertvollen Anregungen und konstruktiven Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. J. Rademann danke ich vielmals für die Betreuung des Dissertationsvorhabens seitens der Freien Universität Berlin.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinen Kolleginnen und Kollegen der Peptidchemie für die freundliche und offene Arbeitsatmosphäre, so daß ich mich auch heute noch dazugehörig fühle. Insbesondere danke ich Herrn Dr. H. Berger sowie Herrn Dr. K. Fechner für ihre unermüdliche Diskussionsbereitschaft und für die Bereitstellung von Meßdaten, Frau G. Vogelreiter für ihre stets helfende Hand bei experimentellen Arbeiten, Frau A. Ehrlich für die Synthese der Peptidbibliotheken sowie Frau A. Klose und Frau D. Krause für die Bereitstellung aller anderen Peptide. Frau I. Gogalla danke ich für die Durchführung der abschließenden Adenylatcyclase Assays. Ferner stand mir Frau M. Dreißigacker jederzeit bei allen organisatorischen Fragen mit Rat und Tat zur Seite.

Herr Prof. Dr. R. Hermosilla übernahm freundlicherweise die Durchsicht des Manuskriptteils „Klonierung“ – vielen Dank! Ebenso danke ich Frau J. Eichhorst, die mich mit allen praktischen Gegebenheiten des Bindungs- und Adenylatcyclase Assays vertraut machte. Frau Dr. G. Papsdorf sowie Frau R. Loose weckten in mir die Begeisterung für die Zellkultur.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. U.B. Kaupp für die hervorragende Zusammenarbeit mit dem Institut für Biologische Informationsverarbeitung (IBI 1) am Forschungszentrum Jülich, was entscheidend zum Fortgang dieser Arbeit beigetragen hat. Frau Dr. R. Gauß und Frau Dr. C. Rohland haben mich in ihrem Labor sehr freundlich aufgenommen. Ihnen habe ich besonders für ihre fachdienlichen Hinweise zu Klonierungstechniken sowie für ihre Einführung zum HTS-Bioassay zu danken. Herr Dr. R. Seifert und Herr Dr. K.H. Körschen ermöglichten die Nutzung des Screening-Assays. Herrn J. Schmitz danke ich sehr für die Kultivierung und Bereitstellung der Zelllinien.

Abschließend gilt mein Dankeschön Anna-Yvonne Armer und Kerstin Hasse, die mich in meinem Erziehungsurlaub schnell und unverzüglich mit aktueller Literatur versorgten. Meiner Familie danke ich herzlich für ihre vertrauensvolle Förderung während der zurückliegenden Jahre. Meinem Lebenspartner Thomas Minack gilt der größte Dank für sein Verständnis, daß ich zahlreiche Wochenenden im Zellkulturlabor zubrachte sowie für seine Geduld und ausdauernde Unterstützung.

Summary

Selective, CRF receptor subtype-specific ligands are necessary for the investigation of the biological activity of the CRF/urocortin peptide family and their receptor subtypes, because they are important for many biological processes. These receptors are involved in many neuropsychiatric, neurodegenerative and gastrointestinal disorders. The goal of this work was to show the influence of certain amino acid side chains of the ligands of the CRF/urocortin peptide family and to understand their meaning for a CRF receptor subtype selectivity. This was achieved by structure-activity relationship studies with the intention to develop receptor subtype-selective agonists.

In the present study the cDNA of receptor splice variants CRF_{2a} and CRF_{2b} were cloned from rat (*rattus norvegicus*). The rCRF₁ and both rCRF₂ receptors were transiently and stably expressed in HEK 293 cells. With the establishment of test systems, in particular stably expressing CRF receptor cell lines, a basis was created for detailed studies of the receptor's signal transduction. Using one-site-fit transiently and stably expressed rCRF₁ receptors showed identical affinities in the saturation binding assays with sauvagine, although different receptor capacities were determined. The binding behaviour of selected ligands of the CRF/urocortin peptide family on heterologously expressed rCRF₁ and rCRF_{2b} receptors correlated with the relative binding affinities, which were determined in rat brain (CRF₁ receptors) and mouse heart (CRF_{2b} receptors) membranes. Thus the heterologously expressed rCRF receptor systems reflect the native systems very well. In addition the heterologously expressed rCRF receptors were characterised by adenylatcyclase assay and a HTS biological assay, which measures the agonist-induced intracellular calcium change, using oCRF, sauvagine, urotensin I, r/hCRF, urocortin I and urocortin II. Both functional assays showed a clear differentiation between urocortin I and urocortin II on both rCRF receptor subtypes, so the basis of this work for structure-activity relationship studies of these ligands was given.

The substitution of non-conserved amino acids or short peptide sequences (3 - 4 amino acids) within the CRF/urocortin peptide family showed that no individual amino acid or peptide domain is responsible for the differences in receptor selectivity found among the examined ligands sauvagine, urotensin I and oCRF. Instead, it seems that the overall sequence of the peptides is responsible for receptor selectivity.

Based on the model of two segregated receptor binding domains of CRF receptor ligands, N- and C-terminal receptor binding sites of an α -helical model peptide UEK(1-40) (DDPPLSIDLTFHLLRTLLEIEKEEKEKRRKEQNRKLLDEV-NH₂) were connected by helical linkers of variable lengths and yielded highly potent agonists without any receptor subtype selectivity in the HTS biological assay. Connection of the two binding sites by highly flexible ϵ -aminocaproic acid residue linkers resulted in agonists with weak potencies independent of the linker length. They did not affect the receptor subtype selectivity on rCRF₁ or rCRF₂ receptor.

After the discovery of the CRF₂ receptor-selective urocortin II, the sequence motif VPIG within the N-terminus of urocortin II was inserted into the corresponding positions of the non-selective urocortin I. This resulted in a selective agonist on the rCRF₂ receptor in the HTS biological assay. No agonistic activity could be detected on the rCRF₁ receptor. The resulting peptide VPIG(9-12)-urocortin I was highly potent (EC₅₀ 15 nM) on the rCRF_{2b} receptor. The question arising from this finding, whether individual amino acids of this tetrapeptide sequence determine the selectivity of both VPIG(9-12)-urocortin I and urocortin II itself, led to the setup and characterisation of two peptide libraries. Both libraries, each with 80 ligands, were synthesised by spot-synthesis on cellulose membranes. The four amino acid residues of the tetrapeptide sequence of the N-terminal region of urocortin I and urocortin II were substituted by each of the 20 proteinogenic amino acids (positional scanning). All ligands were tested in the functional HTS biological assay on all three CRF receptors. Selected peptides were individually synthesised by SPPS and their biological activities were verified by adenylatcyclase assays and binding studies.

The substitution analysis of each position in the VPIG motif of the VPIG(9-12)-Urocortin I resulted in only 5 of 80 peptide analogues showing a high activity at concentrations of 10 nM in the HTS Bioassay. These analogues were selective for the rCRF₂ receptors. The essential motif for this selective CRF₂ activity of urocortin I was found to be VPXX at positions 9 - 12, whereby P is essential and at least one X is a residue with hydrophobic side chain. On the other hand, the corresponding substitution analysis of the VPIG motif in the N-terminal region of urocortin II surprisingly showed that 57 of 80 analogues of this peptide library were selective for the rCRF₂ receptor and had a high activity at concentrations of 10 nM in the same assay. None of the individual amino acid side chains within this motif were essential for the high receptor selectivity and activity of urocortin II on the rCRF₂ receptor. Thus the selectivity of urocortin II does not result from the VPIG motif itself and in principle the CRF₂ receptor selectivity seems to be determined by other domains in urocortin II. With the help of these peptide libraries, it could be demonstrated that the N-terminal tetrapeptide sequence motif in urocortin I, but not in the case of urocortin II, is responsible for the ligand-receptor subtype selectivity.

However, the incorporation of the VPIG motif into other members of the CRF/urocortin peptide family led to a change of their biological potencies and receptor selectivities. Whereas VPIG(9-12)-sauvagine, VPIG(10-13)-urotensin I and VPIG(10-13)-r/hCRF only showed very little potency on the rCRF₁ receptor in the HTS biological assay, VPIG(9-12)-sauvagine proved to be an agonist with high potency (EC₅₀ 0.3 nM) for the rCRF₂ receptor and, therefore, high rCRF₂ receptor selectivity. On the other hand, VPIG(10-13)-urotensin I as well as VPIG(10-13)-r/hCRF showed little potency on the rCRF₂ receptor and thus a weaker rCRF₂ receptor selectivity was observed. These results show that the VPIG motif does not represent a motif for selectivity in principle for this ligand family. Therefore, it is expected that the selectivity within this peptide family is also determined by other domains.

Conclusively, it could be shown that a large number of peptides can be examined by combination of efficient simultaneous synthesis of peptides using the spot-technology and employment of a cellular HTS biological assay. The spot-synthesis succeeds even for peptides with a length of 40 amino acids and supplies sufficient quantities of analogues, whose biological activities determined by the HTS Bioassay, could be confirmed by adenylatcyclase assay. Furthermore the HTS Bioassay proved outstandingly suitable for ensuring rationally and efficiently the screening of a large number of compounds in parallel at all three CRF receptors. With VPIG(9-12)-urocortin I and VPIG(9-12)-sauvagine two highly potent and CRF₂ receptor-selective ligands were developed. The results of the structure-activity relationship studies refer not only to different receptor binding sites of the two agonists urocortin I and urocortin II on the CRF₂ receptor, but also make clear that the different ligands of the CRF/urocortin peptide family obviously have different binding modes on the CRF receptors.

Inhaltsverzeichnis

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis	I
1 Einleitung und Zielsetzung.....	1
1.1 Corticotropin-Releasing Faktor und seine physiologische Bedeutung in der Streßachse	1
1.2 Die CRF/Urocortin Peptidfamilie	3
1.3 Corticotropin-Releasing Faktor Rezeptoren	5
1.4 Wechselwirkung der CRF-Rezeptoren mit einigen Peptidliganden unter physiologischem und pathophysiologischem Aspekt	7
1.5 Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Peptiden der CRF/Urocortin Peptidfamilie.....	10
1.5.1 Die Bedeutung einzelner Rezeptordomänen für die Ligandbindung.....	10
1.5.2 Die Bedeutung einzelner Peptiddomänen für die biologische Potenz	11
1.5.3 Das 2-Domänen-Bindungsmodell für langkettige Peptidhormone	12
1.6 Peptidische und nichtpeptidische CRF-Rezeptor-Liganden	13
1.6.1 Selektive Agonisten für CRF-Rezeptoren	13
1.6.2 Selektive Antagonisten für CRF-Rezeptoren	13
1.7 CRF- und Urocortin I-induzierte Signaltransduktion	17
1.8 Screening als Hochdurchsatzverfahren – ein wichtiges Werkzeug in der Wirkstoffentwicklung	19
1.9 Zielsetzung	21
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Material.....	23
2.1.1 Peptide und Peptidbibliotheken	23
2.1.2 Zelllinien und CRF-Rezeptoren-cDNA	26
2.1.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	26
2.2 Molekularbiologische Techniken	27
2.2.1 Bakterienstämme und Plasmidvektoren	27
2.2.1.1 Escherichia coli K12-Bakterienstämme.....	27
2.2.1.2 Plasmidvektoren	27
2.2.2 Herstellung des Kulturmediums für E. coli	27
2.2.3 Anzucht von E. coli-Bakterienkulturen	28
2.2.3.1 Anzucht von E. coli-Zellen zur Plasmidpräparation	28
2.2.3.2 Herstellung kompetenter Zellen zur Transformation von Plasmid-DNA...	28
2.2.4 Präparation von Plasmid-DNA	29
2.2.4.1 Mini-DNA-Präparation durch alkalische Lyse	29
2.2.4.2 Alkalische Midi- und Maxi-DNA-Präparation.....	29
2.2.5 Reinigung von Nukleinsäuren	30
2.2.5.1 Phenol/Chloroform-Extraktion.....	30
2.2.5.2 Ethanol-Präzipitation.....	30

2.2.6	Auftrennung und Elution von Nukleinsäuren durch Gelelektrophorese ...	31
2.2.6.1	DNA-Größen- und Mengenstandards	31
2.2.6.2	Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese	31
2.2.6.3	Elution von DNA aus Agarosegelen durch Adsorption an QIAEX.....	31
2.2.7	Modifizierung von DNA-Fragmenten	32
2.2.7.1	Glätten überhängender Einzelstrang-Enden	32
2.2.7.2	Phosphorylierung von 5'-DNA-Enden	32
2.2.7.3	Dephosphorylierung geschnittener DNA-Vektoren	32
2.2.8	Klonierung von DNA-Fragmenten	32
2.2.8.1	Ligation	32
2.2.8.2	Transformation.....	33
2.2.9	Amplifizierung von DNA durch Polymerase-Ketten-Reaktion	33
2.2.10	Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen	34
2.2.11	DNA-Sequenzierung mit LI-COR DNA-Sequenzierer	34
2.2.11.1	Sequenzierreaktion	34
2.2.11.2	PCR zur Sequenzierung	35
2.2.11.3	Acrylamid-Gelelektrophorese zur Sequenzierung	35
2.2.12	Präparation von RNA	36
2.2.12.1	Präparation von Gesamt-RNA	36
2.2.12.2	Präparation von polyadenylierter RNA	36
2.2.13	cDNA-Synthese durch Reverse Transkription	37
2.2.14	Quantifizierung von Nukleinsäuren und Proteinen	37
2.2.14.1	Quantifizierung von Nukleinsäuren	37
2.2.14.2	Quantifizierung von Proteinen.....	38
2.3	Heterologe Genexpression in HEK 293-Zellen	38
2.3.1	Kulturbedingungen für HEK 293-Zellen	38
2.3.2	Transiente Expression von Proteinen in HEK 293-Zellen	39
2.3.3	Stabile Expression von Proteinen in HEK 293-Zellen	39
2.3.4	Präparation von Membranproteinen aus HEK 293-Zellen	40
2.4	Pharmakologische Charakterisierung der heterolog exprimierten CRF- Rezeptoren	41
2.4.1	Begriffsdefinitionen	41
2.4.2	Bindungsassays an intakten Zellen mit heterolog exprimierten CRF- Rezeptoren	41
2.4.2.1	Sättigungsbindungsassay	42
2.4.2.2	Kompetitionsbindungsassay	43
2.4.3	Funktionelle Bioassays an heterolog exprimierten CRF-Rezeptoren	43
2.4.3.1	Messung der Rezeptoraktivierung über die Bestimmung von intrazellulärem Calcium als Screening-Verfahren an intakten heterolog exprimierenden Zellen	43
2.4.3.2	Adenylatcyclase Assay an heterolog exprimierten Membranproteinen	45
2.4.4	Analyse der pharmakologischen Daten	45

3	Etablierung zellulärer CRF-rezeptorsubtypspezifischer Testsysteme	47
3.1	Einführung.....	47
3.2	Klonierung der Ratten-cDNA der CRF ₂ -Rezeptoren	49
3.2.1	Corticotropin-Releasing Faktor Typ 2a Rezeptor	49
3.2.2	Corticotropin-Releasing Faktor Typ 2b Rezeptor	50
3.2.3	Sequenzvergleich mit der publizierten Datenbanksequenz	51
3.3	Heterologe Expression des Ratten-CRF ₁ -Rezeptors	52
3.3.1	Charakterisierung des transient exprimierten CRF ₁ -Rezeptors.....	53
3.3.2	Charakterisierung des stabil exprimierten CRF ₁ -Rezeptors	54
3.4	Vergleich und Schlußfolgerungen: Transient und stabil exprimierte CRF ₁ -Rezeptorsysteme.....	57
4	Aufbau biochemischer Assays für CRF-Rezeptoren.....	61
4.1	Einführung.....	61
4.2	Bindungsassays zur Charakterisierung der heterolog exprimierten CRF-Rezeptoren.....	62
4.2.1	Auswahl des geeigneten Radioliganden	62
4.2.2	Optimierung der Versuchsbedingungen für Bindungsstudien	64
4.2.3	Charakterisierung der Expression der CRF-Rezeptoren in Sättigungsbindungsstudien	66
4.2.4	Charakterisierung der CRF-Rezeptoren in Kompetitionsbindungsstudien	69
4.2.5	Vergleich: Bindungsassays an heterolog exprimierten CRF-Rezeptoren und an endogenen CRF-Rezeptormembranen	72
4.3	Funktionelle Assays zur Charakterisierung der heterolog exprimierten CRF-Rezeptoren.....	74
4.3.1	Pharmakologische Charakterisierung der CRF-Rezeptoren im Adenylatcyclase Assay	74
4.3.2	Pharmakologische Charakterisierung der CRF-Rezeptoren im HTS-Bioassay	76
4.4	Schlußfolgerungen – Methodenvergleich	80
5	Selektive Liganden für CRF₂-Rezeptoren.....	85
5.1	Einführung.....	85
5.2	Der Einfluß ausgewählter Peptidomänen und Aminosäuren auf die CRF-Rezeptorsubtypselektivität.....	87
5.2.1	Die Variation der Linkerlänge eines Modellpeptids durch helikale Linkersequenzen	87
5.2.2	Die Variation der Linkerlänge eines Modellpeptids durch ε-Aminocaprinsäure	88
5.2.3	Peptidchimäre aus oCRF, Urotensin I und Sauvagin und deren Einfluß auf die CRF-Rezeptorselektivität.....	89

5.2.4	Die Rolle des VPIG-Motivs für die CRF-Rezeptorselektivität des Urocortin I, Sauvagin, Urotensin I und r/hCRF.....	91
5.2.5	Die Rolle des VPIG-Motivs für die CRF-Rezeptorselektivität des Urocortin I.....	93
5.2.6	Die Rolle des VPIG-Motivs für die CRF-Rezeptorselektivität des Urocortin II.....	97
5.3	Schlußfolgerungen – Die CRF-Rezeptorsubtypselektivität der Ligan- den der CRF/Urocortin Peptidfamilie und selektive Agonisten für CRF ₂ -Rezeptoren	104
6	Zusammenfassung	107
7	Literaturverzeichnis	111
8	Anhang	129
8.1	Hybridisierungsbereiche der PCR-Primer in pCRF _{2a}	129
8.2	Hybridisierungsbereiche der PCR-Primer in pCRF _{2b}	130
8.3	Vergleich der publizierten und klonierten CRF _{2a} -Sequenz	131
8.4	Sequenzen der verwendeten Primer	133
8.5	Primärstrukturen der in den Struktur-Wirkungs-Untersuchungen eingesetzten Peptide	134
8.6	Primärstrukturen der Urocortin II-Peptidbibliothek.....	135
8.7	Primärstrukturen der VPIG(9-12)-Urocortin I-Peptidbibliothek	137
	Selbständigkeitserklärung	139
	Publikationen und Poster	141
	Lebenslauf.....	143