

## **1 Einleitung und Zielsetzung**

In Deutschland leiden rund acht Millionen Menschen unter Depressionen (Meyendorf und Kabza, 2005). Anders als die üblichen Zivilisationserkrankungen trifft sie Jung und Alt. Die Weltgesundheitsbehörde WHO setzt die Depression für das Jahr 2020 auf Platz zwei der größten Gesundheitsprobleme der Welt. Die Wahrscheinlichkeit, im Laufe des Lebens an einer Depression oder an einem Angstleiden zu erkranken, liegt bei 15%. Diese Krankheiten haben in der Hälfte der Fälle einen chronischen bzw. chronisch wiederkehrenden Verlauf (Wiedemann, 2001). Epidemiologische Studien zeigen, daß annäherungsweise 40 - 50% der Risiken, an Depression zu erkranken, genetische Ursachen haben (Nestler et al., 2002). Ein Depressionsgen wurde bis heute nicht gefunden. Viel wahrscheinlicher ist es, daß die Depressionserkrankung ein sehr komplexes Phänomen ist, in das vermutlich viele Gene involviert sind. Verschiedene Risikogene scheinen dazu beizutragen, damit die Krankheit unter gewissen Umweltbedingungen ausbrechen kann.

Neben der genetischen Veranlagung bestimmen nichtgenetische Faktoren wie Streß, emotionale Traumata, Virusinfektionen und Zufallsprozesse während der Gehirnentwicklung die Anfälligkeit für Depressionen (Nestler et al., 2002).

### **1.1 Corticotropin-Releasing Faktor und seine physiologische Bedeutung in der Streßachse**

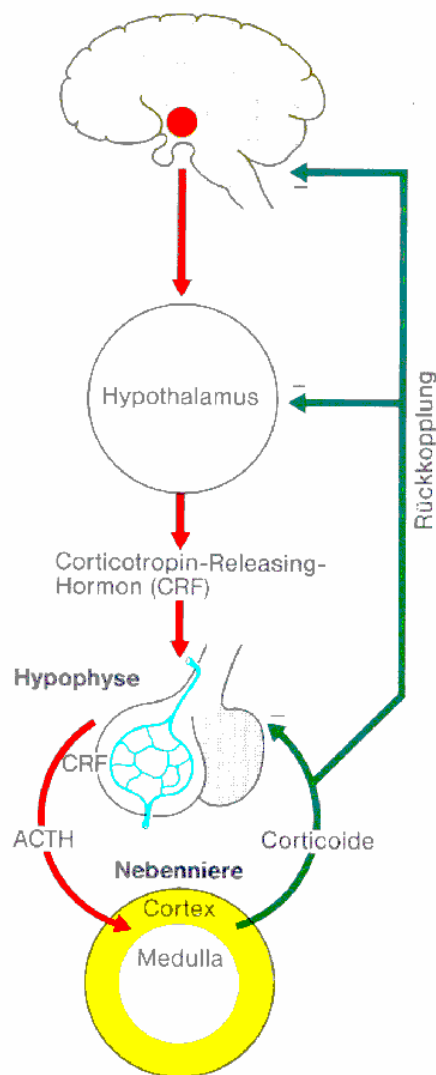
In den letzten Jahren wurde entdeckt, daß bei Menschen und Tieren bei Depressionen und Streß ähnliche hormonelle Regulationen stattfinden. Eine ganz besondere Rolle in den hormonellen Regelkreisen von Säugetieren kommt dem System Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (hypothalamo-pituitary-adrenal axis; HPA- bzw. Streßachse) zu. Schlüsselhormon ist das aus 41 Aminosäuren aufgebaute Neuropeptid Corticotropin-Releasing Faktor (CRF<sup>1</sup>). Es wurde erstmals 1981 aus dem Hypothalamus isoliert (Vale et al., 1981) und als Hauptfaktor der endokrinen Streßantwort in Säugetieren charakterisiert.

Wirkt ein unspezifischer Reiz in Form eines Nervenimpulses, als chemische Substanz oder als Mangel an einem notwendigen Stoffwechselfaktor auf den Hypothalamus im Zwischenhirn ein, wird CRF in die Blutbahn freigesetzt (Abb. 1.1).

---

<sup>1</sup> Nomenklatur nach Konvention der Internationalen Union der Pharmakologie (IUPHAR)

Es gelangt als Botenstoff über das portale Blutsystem zur Hypophyse. Hier wird in einigen Zellen ein spezielles POMC-Gen aktiviert, das wiederum für das Vorläufermolekül Proopiomelanocortin kodiert. Dieses POMC-Gen wird u.a. in ein weiteres Schlüsselpolypeptid der Streßachse prozessiert – in das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH), welches in den Blutkreislauf freigesetzt wird und zur Nebennierenrinde gelangt. Es werden Glucocorticoide (z. B. Cortisol, Corticosteron) produziert und mit deren Freisetzung aus dem Cortex zahlreiche Gewebe- und Stoffwechselprozesse im Körper beeinflusst (Temml, 1997). Glucocorticoide sind die Endeffektoren der HPA-Achse und kontrollieren die Homöostasis des gesamten Körpers sowie die Antwort eines Organismus auf Streß (Tsigos und Chrousos, 2002).



**Abbildung 1.1: CRF als Mediator in der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (Stressachse).** [aus Dirk Hellhammer, Mannheimer Forum 92/93].

Diese Signalkaskade wird durch mehrere Rückkopplungsmechanismen kontrolliert. Einer davon ist die Hemmung der CRF- und ACTH-Ausschüttung durch Cortisol, eine negative Rückkopplungskontrolle, die sehr entscheidend für die Streßbewältigung<sup>2</sup> ist.

Unter pathologischen Bedingungen, bei Angststörungen und Depressionserkrankungen, kann die normale Funktion dieser Streßachse gestört sein. Bei Gefahr wird mehr CRF im Hypothalamus produziert. Die biochemische Kaskade wird über die Bildung von ACTH gestartet, und eine dadurch angeregte Ausschüttung des Streßhormons Cortisol verteilt sich im Blutkreislauf. Bei Patienten mit Depression treten beständig CRF-Schübe auf; sie stehen unter Dauerstreß (Holsboer, 1999). Die normalerweise stattfindende Hemmung der Produktion von CRF und ACTH durch eine bestimmte Cortisol-Konzentration findet nicht statt.

### 1.2 Die CRF/Urocortin Peptidfamilie

Unter der CRF/Urocortin Peptidfamilie (Tab. 1.1) sind Neuropeptide zusammengefaßt, die strukturell ähnlich sind und sowohl aus Säugetieren als auch aus anderen Wirbeltieren isoliert wurden. Dabei stellt die Region des N-Terminus mit seinen homologen Aminosäuren die konserviertere gegenüber der des C-Terminus dar.

**Tabelle 1.1: Primärstruktur und Sequenzidentität der CRF/Urocortin Peptidligandfamilie.** Homologe Aminosäuren sind rot dargestellt.

Peptid	Sequenz	Identität
oCRF	SQEPPISLDLTFHLLREVLEMTKADQLAQQAHSNRKLDDIA-NH <sub>2</sub>	83%
r/hCRF	SEEPPISLDLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKLMEII-NH <sub>2</sub>	100%
Sauvagin	ZGPPISIDLSELLRKMIEIEKQEKEKQQAANRLLLDTI-NH <sub>2</sub>	45%
Urotensin I	NDDPPISIDLTFHLLRNMIEMARNENQREQAGLNRKYLDEV-NH <sub>2</sub>	54%
rUrocortin I	DDPPLSIDLTFHLLRTLLELARTQSQRERAQNRIFDSV-NH <sub>2</sub>	45%
hUrocortin I	DNPPLSIDLTFHLLRTLLELARTQSQRERAQNRIFDSV-NH <sub>2</sub>	45%
mUrocortin I	DDPPLSIDLTFHLLRTLLELARTQSQRERAQNRIFDSV-NH <sub>2</sub>	45%
oUrocortin I	DDPPLSIDLTFHLLRTLLELARTQSQRERAQNRIFDSV-NH <sub>2</sub>	45%
hUrocortin II	IVLSLDVPIGLLQILLEQARARAAREQATTNARILARV-NH <sub>2</sub>	34%
mUrocortin II	VILSLDVPIGLLRILLEQARYKAARNQAATNAQILAHV-NH <sub>2</sub>	34%
hUrocortin III	FTLSLDVPTNIMNLLFNIAKAKNLRAQAAANAHLMAQI-NH <sub>2</sub>	32%
mUrocortin III	FTLSLDVPTNIMNILFNIDKAKNLRAKAAANAQLMAQI-NH <sub>2</sub>	26%

<sup>2</sup> Eine zweite Hormonachse des vegetativen Nervensystems und die Transmitter Adrenalin und Noradrenalin sind in der Streßbewältigung involviert.

Nach der ersten Entdeckung von CRF aus Schaf-Hypothalamus (Kap. 1.1) erfolgte 1983 die Charakterisierung der Primärsequenz sowohl von CRF aus Ratte (Rivier et al., 1983) als auch von menschlichem CRF (Shibahara et al., 1983). Die beiden letzteren sind identisch in ihrer Aminosäuresequenz und unterscheiden sich in sieben von 41 Aminosäuren vom dem CRF aus dem Schaf. Neben dem CRF gehören das Sauvagin aus Amphibien (Montecucchi und Henschen, 1981) und das Urotensin I aus Fischen (Ichikawa et al., 1982; Lederis et al., 1982) zu dieser Peptidligandfamilie. Beide zeigen ~ 50% Sequenzidentität mit dem r/hCRF.

Ein zweites, aus Säugetieren stammendes Neuropeptid Urocortin I konnte aus Ratte (Vaughan et al., 1995), Mensch (Donaldson et al., 1996), Maus (Zhao et al., 1998) und Schaf (Cepoi et al., 1999) isoliert werden. Innerhalb der Spezies ist dieses Peptid in seiner Sequenz stärker konserviert als CRF. Bspw. unterscheidet sich das menschliche Urocortin I lediglich um zwei Aminosäuren im N-Terminus des Peptids von dem Urocortin I aus Ratte. Gegenüber anderen Mitgliedern der CRF/Urocortin Peptidfamilie besteht Sequenzhomologie von 63% gegenüber dem Urotensin I, 45% gegenüber dem r/hCRF und 35% gegenüber dem Sauvagin.

Die im Zentralnervensystem (ZNS) von Ratte nur geringe Überlappung von Urocortin I-enthaltenen Neuronen und Neuronen (Bittencourt et al., 1999), die CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren exprimieren (Kap. 1.3), ließ vermuten, daß es weitere endogene Liganden für CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren in Säugetieren geben muß. Auf der Suche nach neuen, nativen Liganden wurden durch Ableitung aus menschlichen genomischen Datenbanken weitere strukturell verwandte Neuropeptide identifiziert: das Urocortin II aus dem Maus-Genom (Reyes et al., 2001) und das Urocortin III aus Mensch und Maus (Lewis et al., 2001). Zeitgleich wurden das Stresscopin und das Stresscopin-artige Peptid durch PCR-Amplifikation aus einer menschlichen cDNA-Bibliothek isoliert (Hsu und Hsueh, 2001). Beide letztgenannten Peptide aus dem menschlichen Genom sind identisch zu dem menschlichen Urocortin III<sup>3</sup> bzw. Urocortin II<sup>4</sup> (Lewis et al., 2001).

Das Urocortin III stimmt bei Mensch und Maus zu 90% in seiner Primärsequenz überein und zeigt 40% Sequenzhomologie zu dem Maus-Urocortin II. Während das Urocortin II in seiner Aminosäuresequenz 34% identisch zu dem r/hCRF und 42% identisch zu dem Rat-

---

<sup>3</sup> Urocortin III/Stresscopin wird im weiteren Verlauf als Urocortin III benannt.

<sup>4</sup> Urocortin II/Stresscopin-artiges Peptid wird im weiteren Verlauf als Urocortin II benannt.

ten Urocortin I ist, beträgt die Übereinstimmung bei dem Urocortin III lediglich 32% gegenüber dem r/hCRF beim Mensch und 26% bei der Maus. Im Vergleich zu dem Urocortin I geht die Sequenzidentität von dem Urocortin III zurück auf 21% (Mensch) bzw. 18% (Maus).

Obwohl sich die Primärstruktur von dem Urocortin II und dem Urocortin III (Tab. 1.1) deutlich und besonders im N-terminalen Bereich von der Struktur der anderen Mitglieder der CRF/Urocortin Peptidfamilie unterscheidet, werden beide dieser Ligandfamilie zugeordnet. Grund dafür ist eine vermutlich  $\alpha$ -helikale Struktur über 30 Aminosäuren beider Peptide (Hsu und Hsueh, 2001) – ein charakteristisches Merkmal der CRF/Urocortin Peptidfamilie. Die unter induzierenden Bedingungen stabilisierte  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur ist milieuhängig (Dathe et al., 1996) und wahrscheinlich die biologisch aktive Konformation dieser Peptide (Lau et al., 1983).

### 1.3 Corticotropin-Releasing Faktor Rezeptoren

Die biologische Wirkung des Neuropeptids CRF wird durch die zwei Corticotropin-Releasing Faktor Rezeptoren<sup>5</sup> CRF<sub>1</sub> und CRF<sub>2</sub> vermittelt, die durch unterschiedliche Expressionsmuster (Tab. 1.2) sowie physiologische Funktionen (Kap. 1.4) gekennzeichnet sind. Beide CRF-Rezeptorsubtypen gehören zur Klasse B<sup>6</sup> der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Sie weisen 30% Sequenzhomologie zu anderen GPCR dieser Klasse, z. B. den Rezeptoren des PTH, Secretin, VIP, PACAP, Glucagon, Calcitonin und GH-RH, auf (Hauger et al., 2003). Alle diese Peptidrezeptoren besitzen vier extrazelluläre, vier intrazelluläre Domänen und sieben konservierte Transmembrandomänen, die die Zellmembran in Form von  $\alpha$ -Helices durchspannen. Die Rezeptorklasse B zeichnet sich vor allem durch einen sehr langen extrazellulären N-Terminus (~ 150 Aminosäuren) sowie mehrere konservierte Cysteine in dieser Domäne und in der ersten und zweiten extrazellulären Domäne aus, die ein Netzwerk aus Disulfidbrücken bilden (Gether, 2000).

Der CRF<sub>1</sub>-Rezeptor zeigt 70% Sequenzhomologie zu dem CRF<sub>2</sub>-Rezeptor (Lovenberg et al., 1995). Der höchste Grad an konservierter Aminosäuresequenz besteht in den intrazellulären und transmembranären Domänen der Aminosäurekette (> 85%); die dritte intrazelluläre Domäne ist hoch konserviert und damit bei beiden CRF-Rezeptorsubtypen

---

<sup>5</sup> Nomenklatur nach Konvention der Internationalen Union der Pharmakologie (IUPHAR)

<sup>6</sup> auch bezeichnet als die Secretin-ähnliche Familie oder als die Klasse 2 der GPCR

identisch (Donaldson et al., 1996). Zwischen den einzelnen Spezies beträgt die Übereinstimmung sowohl in der Sequenz des CRF<sub>1</sub>- als auch des CRF<sub>2</sub>-Rezeptors > 80%.

Die CRF<sub>1</sub>- und CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren werden durch zwei separate Gene des menschlichen Chromosoms 17 bzw. 7 kodiert (Catalano et al., 2003). Der CRF<sub>2</sub>-Rezeptor existiert in drei funktionellen Spleißvarianten (CRF<sub>2a</sub>, CRF<sub>2b</sub>, CRF<sub>2c</sub>). Diese Isoformen unterscheiden sich strukturell in ihrer N-terminalen Domäne und weisen signifikante Unterschiede sowohl in ihrer Gewebeverteilung als auch im Vorkommen in den Spezies auf.

**Tabelle 1.2: Die Familie der Corticotropin-Releasing Faktor Rezeptoren.**

Rezeptor	CRF <sub>1</sub>	CRF <sub>2a</sub>	CRF <sub>2b</sub>	CRF <sub>2c</sub>
Polypeptidlänge <sup>7</sup>	<b>415</b> - 446 AA	<b>411</b> - 413 AA	<b>431</b> - 438 AA	<b>397</b> AA
Vorkommen bei Säugertieren (Auswahl):	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cortex</li> <li>• Cerebellum</li> <li>• Hippokampus</li> <li>• Amygdala</li> <li>• Riechkolben</li> <li>• Hypophyse</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lateral septum</li> <li>• Hypothalamus</li> <li>• Amygdala</li> <li>• Choroid plexus</li> <li>• Herz</li> <li>• Skelettmuskel</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Retina</li> <li>• Cerebellum</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Septum</li> <li>• Hippokampus</li> </ul>
Klonierung aus:				
<b>Mensch</b>	(Chen et al., 1993) (Vita et al., 1993)	(Liaw et al., 1996), (Suman-Chauhan et al., 1999)	(Valdenaire et al., 1997), (Stenzel et al., 1995)	(Kostich et al., 1998)
<b>Ratte</b>	(Perrin et al., 1993), (Chang et al., 1993)	(Lovenberg et al., 1995), (Liaw et al., 1996), (Suman-Chauhan et al., 1999)	(Jain et al., 2000)	
<b>Maus</b>	(Vita et al., 1993)	(Chen et al., 2005)	(Kishimoto et al., 1995) (Stenzel et al., 1995)	

CRF<sub>1</sub>-Rezeptor mRNA bei Säugetieren ist vorrangig im Gehirn und in der Hypophyse exprimiert (Chalmers et al., 1995), weswegen dieser Rezeptor hauptsächlich in regulatorische Prozesse des Gehirns und insbesondere der Hypophyse involviert ist.

Dahingegen sind die CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren aufgrund ihres breiteren Vorkommens in peripheren Geweben (Herz, Blutgefäße) auch stärker an peripheren Regelkreisen beteiligt.

<sup>7</sup> Die Länge der Aminosäurenkette variiert in Abhängigkeit der Spezies.

Innerhalb der Klasse der Säugetiere liegen verschiedene Expressionsmuster vor. Bei Nagetieren ist der CRF<sub>2b</sub>-Rezeptorsubtyp vorzugsweise peripher exprimiert, während die vorherrschende Spleißvariante an der menschlichen Peripherie der CRF<sub>2a</sub>-Rezeptor ist (Dautzenberg et al., 2001). Der CRF<sub>2a</sub>-Rezeptor stellt außerdem den dominierenden CRF<sub>2</sub>-Rezeptor dar, der im Gehirn von Säugetieren exprimiert ist. Dagegen wurde der CRF<sub>2c</sub>-Rezeptor ausschließlich in der limbischen Region des menschlichen ZNS entdeckt (Kostich et al., 1998) (Tab. 1.2).

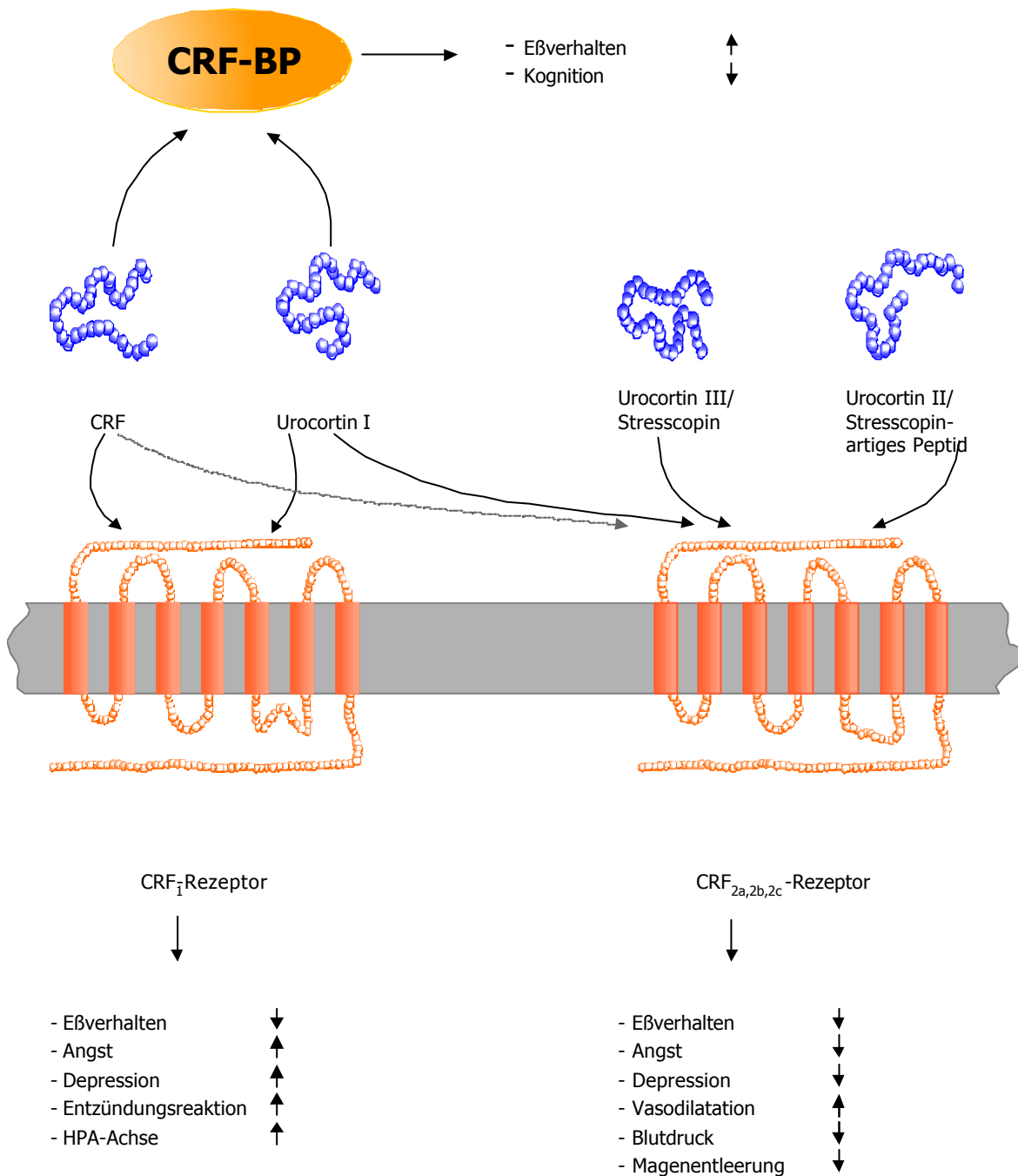
CRF-Rezeptoren wurden bereits in zahlreichen Wirbeltieren nachgewiesen. Neben der Klonierung aus Mensch, Ratte und Maus (Tab. 1.2) wurden cDNAs auch aus den Spezies Huhn (Yu et al., 1996), Frosch (Dautzenberg et al., 1997), Schaf (Myers et al., 1998) und Fisch (Arai et al., 2001; Pohl et al., 2001) isoliert und charakterisiert.

#### **1.4 Wechselwirkung der CRF-Rezeptoren mit einigen Peptidliganden unter physiologischem und pathophysiologischem Aspekt**

Die heterogene Verteilung von CRF<sub>1</sub>- und CRF<sub>2</sub>-Rezeptor mRNA (Kap. 1.3) im Organismus deutet auf vielfältige funktionelle Rollen jedes Rezeptorsubtyps im Ligand-Rezeptor-System hin. In vivo- und in vitro-Studien (Reul und Holsboer, 2002; Takahashi, 2001) zeigen, daß beide CRF-Rezeptorsubtypen an zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen teilnehmen (Abb. 1.2), die vor allem mit Stress - besonders im Zusammenhang mit Angst und Depression - verknüpft sind.

**CRF** ist sowohl ein Hormon als auch ein Neurotransmitter (Owens und Nemeroff, 1991). Es wird nicht nur vom Hypothalamus sondern auch von anderen Geweben und Organen (Gravanis et al., 2001; King et al., 2001; Slominski et al., 2001) synthetisiert, woraus verschiedene Funktionen sowohl im ZNS als auch an der Peripherie resultieren können (Abb. 1.2). CRF<sub>1</sub>-Rezeptoren binden CRF mit hoher Affinität. Neben seiner endokrinen Funktion bei der Biosynthese von POMC-Peptiden in der Hypophyse ist das Peptid vermutlich auch in Prozesse wie Nahrungsaufnahme (Eßverhalten) (Heinrichs et al., 2001; Mastorakos und Zapanti, 2004; Uehara et al., 1989), Magen-Darm-Beweglichkeit (Tache und Perdue, 2004), Entzündungsreaktion (Jessop et al., 2001), Reproduktion (Florio et al., 2002), Temperaturregulation (Strijbos et al., 1992) sowie Herz- und Gefäßfunktion (Parkes et al., 2001) eingebunden. Verhaltensphysiologisch hat CRF eine zentrale Bedeutung bei der Auslösung von Furcht und Angst (Holsboer, 1999; Sajdyk et al., 2004)

und bei der Verarbeitung von Streß (Koob, 1999). Seine Rolle als Neurotransmitter im ZNS wurde bei Alzheimer-Patienten nachgewiesen, bei denen die CRF-Rezeptorbindung im menschlichen Cortex in Gegenwart von verringerter CRF-artiger Immunoreaktivität reziprok erhöht war. Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese der möglichen Rolle des CRFs bei Demenzerkrankungen (De Souza et al., 1986).



**Abbildung 1.2: Wechselwirkungen zwischen CRF, Urocortin I, Urocortin II und Urocortin III mit den CRF-Rezeptoren (CRF<sub>1,2a,2b,2c</sub>) und mit dem CRF-Bindungsprotein (CRF-BP).** [aus Dautzenberg und Hauger, 2002].



**Urocortin I** wird im Gegensatz zu CRF von beiden CRF-Rezeptorsubtypen mit hoher Affinität gebunden. Für physiologische Prozesse (Abb. 1.2) bedeutet dies die Signalweitergabe via CRF<sub>1</sub>- oder CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren. Dennoch wurde die höchste Dichte an Urocortin I enthaltenden Neuronen in Regionen (z. B. Herz) beschrieben, die nahezu ausschließlich CRF<sub>2a</sub> mRNA exprimieren (Skelton et al., 2000). Immunoreaktivität von Urocortin I ist aufgrund seines Vorkommens im ZNS (Takahashi et al., 1998), im Herz-Kreislauf-System (Huang et al., 2004), im Verdauungs- (Tache und Perdue, 2004) und Immunsystem (Baigent, 2001) sowie im endokrinen und reproduktiven System (Florio et al., 2004) weit verteilt. Es ist wahrscheinlich außerdem in Prozesse der streßinduzierten Appetitregulation (Spina et al., 1996) sowie der Regulation des Wasserhaushalts (Skelton et al., 2000) und der Entwicklung des Hörvermögens (Vetter et al., 2002) eingebunden. Demnach zeigt neben CRF auch Urocortin I eine große physiologische Bedeutung in verschiedenen Organen und Geweben.

**Urocortin II** und **Urocortin III** sind spezifische endogene Liganden für den CRF<sub>2</sub>-Rezeptorsubtyp. Beide Peptide werden nur von den CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren selektiv gebunden. Während die Aktivierung der HPA-Achse über die CRF<sub>1</sub>-Rezeptoren erfolgt, wird über die CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren vermutlich eher der Vorgang der Streßbewältigung in der Erholungsphase vermittelt (Hsu und Hsueh, 2001). Nach Wechselwirkung des Rezeptors mit Urocortin II verringern sich Angst und Depressionssymptome (Abb. 1.2). Das Eß- und Trinkverhalten wird ebenfalls reduziert (Inoue et al., 2003; Reyes et al., 2001). Neben seines Angst-lösenden Effekts (Valdez et al., 2002) beeinflusst es möglicherweise auch die Magenentleerung (Million et al., 2002) sowie das Herz-Kreislauf-System. Die erhöhte Konzentration an Urocortin II mRNA im Nucleus des Hypothalamus (PVN) nach Streßimmobilisierung bzw. dreitägigem Wasserentzug führte zu der Annahme (Hashimoto et al., 2004), daß eventuell Urocortin II die Synthese von CRF und Vasopressin im PVN in parakriner oder autokriner Form durch CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren moduliert. Hashimoto et al. (2004) beschreiben ebenfalls einen Einfluß des Urocortin II auf den Blutdruck.

Urocortin III zeigt eine diskrete Verteilung im ZNS und an der Peripherie (Lewis et al., 2001) und ähnliche Effekte wie Urocortin II als kardiovaskuläres Peptid (Takahashi et al., 2004). Urocortin III-Immunoreaktivität konnte in Verbindung mit CRF<sub>2</sub>-Rezeptorbindungsstellen im Gehirn nachgewiesen werden (Li et al., 2002), das mit physiologischen Funktionen wie dem Eßverhalten oder neuroendokrinen Prozessen in Zusammenhang gebracht wird (Abb. 1.2). Es moduliert angeblich ebenso Streßprozesse durch sein Angst-

lösendes Verhalten (Valdez et al., 2003) und scheint die Glucagon- und Insulinsekretion in der Bauchspeicheldrüse via CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren zu regulieren (Li et al., 2003a).

Zusätzlich existiert ein hoch konserviertes, im Blut zirkulierendes CRF-Bindungsprotein (CRF-BP) in allen Wirbeltierklassen, das CRF und Urocortin I mit hoher Affinität bindet (Abb. 1.2). Die Bindung der Peptide wird als gleich affin bzw. affiner gegenüber der Bindung durch die CRF-Rezeptoren beschrieben (Seasholtz et al., 2001). Dem sekretierten Glycoprotein wird nicht nur eine eventuell inhibitorische Rolle im Gehirn und an der Peripherie zugesprochen, sondern diverse extra- und intrazelluläre Prozesse werden vermutlich in zellspezifischer Art und Weise durch das CRF-BP vermittelt (Seasholtz et al., 2002). Es moduliert die „freie“ Konzentration an CRF sowohl im menschlichen Plasma während des letzten Drittels der Schwangerschaft (Tian et al., 1999) als auch im Gehirn, was zur kognitiven Beeinträchtigung bei Alzheimer-Patienten (Behan et al., 1995) führen kann. Das CRF-BP scheint demnach in pathophysiologischen Störungen, wie Demenzerkrankungen und Fettleibigkeit (Behan et al., 1996), eingebunden zu sein, die mit einem niedrigen Gehalt an endogenem CRF assoziiert sind (Chalmers et al., 1996).

## **1.5 Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Peptiden der CRF/ Urocortin Peptidfamilie**

Im Hinblick auf eine Vielzahl an neuropsychiatrischen, neurodegenerativen sowie gastro-intestinalen Störungen (Abb. 1.2), in denen Peptide der CRF/Urocortin Peptidfamilie involviert sind, wurden zahlreiche Untersuchungen zur Entwicklung von selektiven, d. h. CRF-rezeptorsubtypspezifischen Liganden unternommen. Für ein spezifisches Ligandendesign war es zunächst notwendig, Vorstellungen zur molekularen Interaktion zwischen dem Rezeptor und dem Ligand zu gewinnen.

### **1.5.1 Die Bedeutung einzelner Rezeptordomänen für die Ligandbindung**

Ausgangspunkt zur Untersuchung extrazellulärer Domänen von GPCR der Klasse B und ihrer Bedeutung für die Ligandbindung waren Studien am Membran-gebundenen N-Terminus des PACAP-Rezeptors (Cao et al., 1995), aus denen erstmals abgeleitet wurde, daß der N-Terminus des Rezeptors eine wesentliche Rolle bei der Ligandbindung spielt. Untersuchungen an Konstrukten aus N-terminaler Domäne und erster transmembranärer Helix von CRF<sub>1</sub>- und CRF<sub>2b</sub>-Rezeptoren bekräftigten die Bedeutung des langen N-Terminus für die Ligandbindung (Beyermann et al., 1997). Ferner wurde durch Crosslinking- und Mutationsstudien anhand eines weiteren Rezeptors der Klasse B (PTH-Rezeptor) gezeigt,

daß der N-Terminus des Rezeptors mit dem C-Terminus seines Liganden interagiert (Mannstadt et al., 1998). Zwei weitere Studien an chimären Rezeptoren deuteten darauf hin, daß die N-terminale Domäne des CRF<sub>1</sub>-Rezeptors essentiell für die Liganderkennung ist. Der N-Terminus des xCRF<sub>1</sub>-Rezeptors ist allein für die Ligandenselektivität verantwortlich (Dautzenberg et al., 1998). Für die hoch affine Bindung des Urocortin I ist die N-terminale Domäne des rCRF<sub>1</sub>-Rezeptors am Beispiel des Chimärenpaares rCRF<sub>1</sub>-rGHRH-Rezeptor wesentlich erforderlich. Ferner wurde eine hohe Affinität des CRF<sub>1</sub>-Rezeptor N-Terminus für Urocortin I an einer Chimäre mit dem Activin II-B-Rezeptor gezeigt (Perrin et al., 1998). Schließlich wurde eine hohe Affinität für das Urocortin I auch an löslichen N-Termini vom rCRF<sub>1</sub>- (Hofmann et al., 2001), hCRF<sub>1</sub>- (Perrin et al., 2001) und mCRF<sub>2b</sub>-Rezeptor (Perrin et al., 2003) gefunden. Eine NMR-Struktur der N-terminalen extrazellulären Domäne des mCRF<sub>2b</sub>-Rezeptors im Komplex mit dem peptidischen Antagonisten Astressin wurde kürzlich beschrieben (Grace et al., 2004).

Neben der N-terminalen extrazellulären Rezeptordomäne als essentielles Merkmal für die Ligand-Rezeptor-Bindung konnten durch andere Studien an chimären Rezeptorkonstrukten und -mutanten weitere Ligandbindungsdomänen am CRF-Rezeptor lokalisiert werden. Einzelne Aminosäurereste in der zweiten und dritten extrazellulären Region des hCRF<sub>1</sub>- und hCRF<sub>2a</sub>-Rezeptors scheinen für eine optimale r/hCRF Agonistbindung und nachfolgende Rezeptoraktivierung nötig zu sein (Liaw et al., 1997). Auch die vierte extrazelluläre Rezeptordomäne des rCRF<sub>1</sub>-Rezeptors ist in der Bindung von oCRF involviert (Sydow et al., 1999).

### **1.5.2 Die Bedeutung einzelner Peptiddomänen für die biologische Potenz**

Umfassende Struktur-Wirkungs-Untersuchungen in den letzten zwei Jahrzehnten erfolgten vorrangig am oCRF. Aminosäuren im N-terminalen Bereich des oCRF in Position 1 – 3 sind für die biologische Potenz nicht erforderlich (Rivier et al., 1984). Ein Alanin-Scan (alanine-replacement) für oCRF zeigte, daß eine Substitution im N-terminalen Bereich des Peptids generell nachteilig für die Potenz ist. Substitutionen im C-Terminus werden dagegen besser toleriert. Der Austausch hydrophober Aminosäuren führt zu einem starken Verlust an biologischer Wirksamkeit, während die Alaninsubstitution an hydrophilen Positionen einen geringeren Potenzverlust nach sich zog (Kornreich et al., 1992). Ferner wurden oCRF-Analoga durch Einzelsubstitution seiner Aminosäuren mit den korrespondierenden D-Isomeren synthetisiert (D-amino acid-replacement) und der Einfluß auf die Potenz und

auf physikochemische Eigenschaften des Peptids untersucht (Rivier et al., 1993). Dabei führte der D-Aminosäureeinbau in den Positionen 12 oder 20 (D-Phenylalanin<sup>12</sup>, D-Glutamat<sup>20</sup>) zu einer Steigerung der Potenz des [D-Phe<sup>12</sup>]-oCRF und des [D-Glu<sup>12</sup>]-oCRF im Vergleich zum nativen oCRF. Mit dem Einbau des jeweiligen D-Aminosäuredipeptids (DD-amino acid-replacement) in oCRF wurde der Einfluß konformationeller Erfordernisse auf die biologische Potenz untersucht (Heinrich et al., 1998), wobei deutlich wurde, daß Konformationsstörungen die Potenz wesentlich verringern.

Ein Minimalaustausch-Set (minimal-replacement) aus oCRF-Analoga, bei denen jede Aminosäureposition durch jeweils eine andere, strukturchemisch ähnliche Aminosäure ersetzt wurde (z. B. Valin → Leucin; Serin → Threonin; Arginin → Lysin), ist in Bezug auf Rezeptorbindung und -aktivierung untersucht worden. Bereits minimale Änderungen der Seitenkettenstruktur im N-Terminus hatten zu einem starken Verlust an Potenz hinsichtlich der biologischen Wirksamkeit des oCRFs geführt, während der C-Terminus Aminosäurevariationen in vielen Positionen tolerierte (Beyermann et al., 1996).

Spezifische Strukturmerkmale des CRFs, die selektiv für die Erkennung durch CRF<sub>1</sub>- bzw. CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren verantwortlich sein könnten, wurden mit den oben beschriebenen Ansätzen nicht gefunden. Keines der Substitutionsanaloga zeigte eine receptorsubtypische Selektivität. Somit lieferte das rationale Design keine selektiven Liganden für CRF-Rezeptoren.

### **1.5.3 Das 2-Domänen-Bindungsmodell für langkettige Peptidhormone**

Der Mechanismus der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung kann durch die Identifizierung spezifischer Ligandbindungsstellen an CRF-Rezeptoren, aber auch durch die Charakterisierung von Bindungsdomänen in Peptidliganden beschrieben werden. Die Existenz von zwei Rezeptorbindungsdomänen bei Peptiden der Klasse B GPCR wurde für PTH- und Calcitonin-Rezeptorchimäre sowie ihrer chimären Liganden nachgewiesen (Bergwitz et al., 1996). Dabei wurde gezeigt, daß der Rezeptor N-Terminus den C-Terminus des Liganden und die Rezeptordomänen den Liganden N-Terminus bindet. Eine Aussage über die strukturelle Organisation der Peptidliganden wurde aus umfangreichen Struktur-Wirkungs-Untersuchungen abgeleitet (Beyermann et al., 2000). Danach können Peptide der CRF/Urocortin Peptidfamilie in eine N-terminale (aktivierende) Domäne, eine C-terminale (bindende) Domäne und einen mittelständigen Linker unterteilt werden. Dieses Bindungsmodell ist im Rahmen dieser Arbeit u. a. Grundlage für die Suche nach CRF-rezeptorsubtypselektiven Peptidliganden (siehe Kap. 5).

## **1.6 Peptidische und nichtpeptidische CRF-Rezeptor-Liganden**

### **1.6.1 Selektive Agonisten für CRF-Rezeptoren**

Zu Beginn dieser Arbeit waren keine selektiven Agonisten für CRF<sub>1</sub>- und CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren bekannt. Die nativen Liganden r/hCRF, Sauvagin, Urotensin I und Urocortin I sind wenig selektiv und interagieren mit beiden CRF-Rezeptorsubtypen. Eine Ausnahme bildet oCRF, das im Vergleich zum hCRF<sub>2a</sub>-Rezeptor 20fach potenter mit dem hCRF<sub>1</sub>-Rezeptor agiert (Dautzenberg et al., 1999).

Überraschenderweise erwiesen sich die 2001 durch Homologiebetrachtungen aus menschlichen genomischen Datenbanken abgeleiteten Urocortin II- (Reyes et al., 2001) und Urocortin III-Sequenzen (Lewis et al., 2001) als CRF<sub>2</sub>-rezeptorselektive Peptidliganden. Durch Urocortin II und Urocortin III erfolgt selektiv und hoch potent die Aktivierung des CRF<sub>2</sub>-Rezeptorsubtyps, wodurch cAMP sowohl in rekombinanten als auch in endogenen Zellen bei sub- bzw. niedrig nanomolarer Konzentration des Peptidliganden stimuliert wurde. Beide Peptide zeigen im funktionellen Bioassay auch bei hohen Konzentrationen (> 1 µM) keine Aktivierung des CRF<sub>1</sub>-Rezeptorsubtyps (Lewis et al., 2001).

Ein artifizielles Peptid mit CRF<sub>2</sub>-rezeptorselektiven Eigenschaften wurde als SV4 beschrieben (Tellam et al., 2002). Durch Screening einer genomischen Ratten-DNA-Bank mit Primern, die sich vom Sauvagin ableiteten, wurde eine Peptidsequenz identifiziert, die in der Primärstruktur große Ähnlichkeit zu den Peptiden der CRF/Urocortin Peptidfamilie aufweist. In Bindungsstudien wurde SV4 weder von der menschlichen bzw. der Maus-Variante des CRF<sub>1</sub>-Rezeptors gebunden. Im Gegensatz dazu bindet der CRF<sub>2</sub>-Rezeptorsubtyp im SPA-Assay (scintillation proximity assay) das Peptid mit vergleichbarer Affinität wie r/hCRF. Im zellulären Assay agiert SV4 als Partialagonist in der Aktivierung von heterolog exprimierten hCRF<sub>2</sub>-Rezeptoren. Im Vergleich zu Urocortin II und Urocortin III ist SV4 weniger potent in der Aktivierung des CRF<sub>2</sub>-Rezeptorsubtyps und damit als Ausgangspunkt für die Suche nach hochwirksamen, selektiven Peptidliganden für CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren nur von untergeordnetem Interesse.

### **1.6.2 Selektive Antagonisten für CRF-Rezeptoren**

CRF interagiert mit dem CRF<sub>1</sub>-Rezeptor in der HPA-Streßachse (Abb. 1.1). Um den Effekt der überhöhten Konzentration an CRF in dieser Signalkaskade zu limitieren, muß der CRF<sub>1</sub>-Rezeptor blockiert werden. Die Entwicklung möglicher therapeutisch relevanter CRF-Rezeptor-Antagonisten ist in den letzten Jahren stark auf die Wirkstoffentwicklung für die

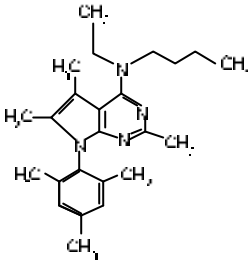
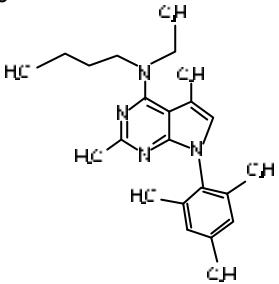
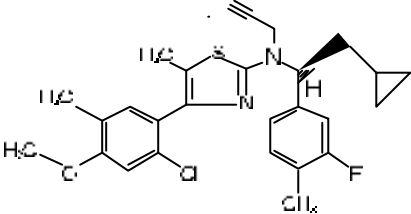
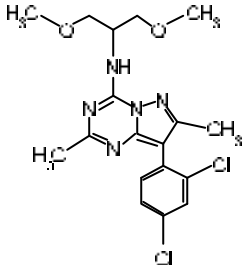
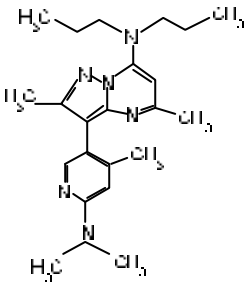
Behandlung von Störungen, die mit Streß einhergehen (z. B. Angst, Depression), fokussiert worden. Erste CRF-Rezeptor-Antagonisten waren peptidischer Natur (Tab. 1.3):  $\alpha$ -helikales CRF(9-41) und [D-Phe<sup>12</sup>,Nle<sup>21,38</sup>]-r/hCRF(12-41) leiteten sich durch N-terminale Verkürzung des r/hCRF ab. Da diese Peptide nicht die Blut-Hirn-Schranke passieren, wurden sie direkt ins Gehirn verabreicht (Rivier et al., 1984). Untersuchungen an Tiermodellen in vivo und in vitro demonstrierten, daß diese CRF-Antagonisten CRF-induzierte neuroendokrine sowie Verhaltensdefekte blockieren (Holsboer, 2001).

Struktur-Wirkungs-Untersuchungen am r/hCRF und ein Lactambrücken-Scan über Glutaminsäure sowie Lysin an Position [i, i+3] führte zur Entwicklung von Astressin und Astressin B (Tab. 1.3). Beide cyclischen Peptide leiten sich von einer verkürzten sowie durch die Einführung der Lactambrücke strukturstabilisierten Form des r/hCRF ab. Sie zeigen eine signifikant höhere antagonistische Potenz als  $\alpha$ -helikales CRF(9-41) und gelten bis heute als die potentesten peptidischen CRF-Rezeptor-Antagonisten. Jedoch antagonisieren alle vier Peptidliganden wenig selektiv beide CRF-Rezeptorsubtypen.

**Tabelle 1.3: Peptidische und nichtpeptidische Antagonisten für CRF-Rezeptoren.**

Verbindung	Rezeptor-subtyp	Tiermodell	Referenz
<b>Peptidische Antagonisten</b>			
$\alpha$ -helikales CRF(9-41)	CRF <sub>1</sub> , CRF <sub>2</sub>	Ratte, Maus	(Rivier et al., 1984)
[D-Phe <sup>12</sup> ,Nle <sup>21,38</sup> ]-r/hCRF(12-41)	CRF <sub>1</sub> , CRF <sub>2</sub>		(Hernandez et al., 1993)
Astressin cyclo(30-33)[D-Phe <sup>12</sup> ,Nle <sup>21,38</sup> ,Glu <sup>30</sup> ,Lys <sup>33</sup> ]- r/hCRF(12-41)	CRF <sub>1</sub> , CRF <sub>2</sub>	Ratte, Maus	(Gulyas et al., 1995)
Astressin B cyclo(30-33)[D-Phe <sup>12</sup> ,Nle <sup>21,38</sup> ,C $\alpha$ MeLeu <sup>27,40</sup> Glu <sup>30</sup> ,Lys <sup>33</sup> ]Ac-r/hCRF(9-41)	CRF <sub>1</sub> , CRF <sub>2</sub>	Ratte, Maus	(Rivier et al., 1999)
Astressin(27-41) cyclo(30-33)[Glu <sup>30</sup> ,Lys <sup>33</sup> ,Nle <sup>38</sup> ]Ac-r/hCRF (27-41)	CRF <sub>1</sub>	Ratte	(Rijkers et al., 2004)
„Kleines“ Astressin-Analogon cyclo(30-33)[Glu <sup>30</sup> ,D-Ala <sup>31</sup> ,Glu <sup>32</sup> ,Lys <sup>33</sup> , Cha <sup>38</sup> ,Asp <sup>39</sup> ]Ac-r/hCRF(30-41)	CRF <sub>1</sub>	Ratte	(Yamada et al., 2004)
Antisauvagin-30 [D-Phe <sup>11</sup> ,His <sup>12</sup> ]-Sauvagin(11-40)	CRF <sub>2</sub>	Ratte, Maus	(Ruhmann et al., 1998)

Fortsetzung Tabelle 1.3:

Verbindung	Rezeptor-subtyp	Tiermodell	Referenz
<b>Nichtpeptidische Antagonisten</b>			
Antalarmin	CRF <sub>1</sub>	Ratte, Maus, Primaten	(Webster et al., 1996)
			
CP-154526	CRF <sub>1</sub>	Ratte, Maus	(Schulz et al., 1996)
			
SSR-125543A	CRF <sub>1</sub>	Ratte	(Gully et al., 2002)
			
DMP-696	CRF <sub>1</sub>	Ratte	(Li et al., 2003b)
			
R-121919	CRF <sub>1</sub>	Ratte, Mensch	(Chen et al., 2004)
			

Weitere Struktur-Wirkungs-Untersuchungen am Astressin führten zu einer Minimalsequenz, die für eine antagonistische Aktivität eines Peptids erforderlich ist. Durch N-terminale Verkürzung unter Beibehaltung der strukturstabilisierten Lactambrücke wurde das Peptid Astressin(27-41) (Tab. 1.3) entwickelt, das hCRF<sub>1</sub>-Rezeptor-Membranen bindet und in vivo die ACTH-Freisetzung mit einer Potenz von 44% im Vergleich zum Astressin inhibiert. Außerdem wurde gefunden, daß alle verkürzten Analoga inaktiv am CRF<sub>2a</sub>-Rezeptor waren. Möglicherweise bindet der CRF<sub>1</sub>-Rezeptor kleine Peptidliganden unter der Bedingung, daß diese Peptide cyclisiert vorliegen. Im Gegensatz dazu kann es möglich sein, daß der CRF<sub>2</sub>-Rezeptor langkettige, lineare Peptidliganden bindet, während die Bindungsaffinität am CRF<sub>2</sub>-Rezeptor durch Einbau eines cyclischen Gerüsts verlorenght (Rijkers et al., 2004).

Ausgehend vom Astressin mit seinen 30 Aminosäuren wurde durch weitere N-terminale Verkürzung eine neue Klasse von kleinen peptidischen CRF-Antagonisten entwickelt. Eines dieser Liganden kurzer Peptidlänge (12 AA), das „kleine“ Astressin-Analogon (Tab. 1.3), zeigte insbesondere durch den Einbau von Cyclohexylalanin in Position 38 eine erhöhte Bindungsaffinität und durch D-Ala in Position 31 eine bessere Potenz in vivo. Dieser kleine Peptidligand mit D-Ala<sup>31</sup> und Cha<sup>38</sup> wurde im Bindungsassay vom CRF<sub>1</sub>-Rezeptor von einer mit Astressin vergleichbaren, hohen Affinität gebunden. Bei Verabreichung im Ratte-Tiermodell erfolgte signifikant eine Inhibierung der ACTH-Sekretion.

Mit der Entwicklung von Antisauvagin-30 (Tab. 1.3), einem N-terminal verkürzten und in zwei Aminosäurepositionen modifizierten Sauvagin-Analogon, stand erstmalig ein peptidischer Antagonist zur Verfügung, der 100fach affiner vom CRF<sub>2b</sub>-Rezeptorsubtyp als vom CRF<sub>1</sub>-Rezeptor gebunden wird. Außerdem ist Antisauvagin-30 im funktionellen Assay der bisher potenteste Peptidligand bei der Inhibierung der durch einen Agonist-induzierten Adenylatcyclase-Aktivität in Zellen, die den mCRF<sub>2b</sub>-Rezeptor exprimierten.

Peptidische Antagonisten sind zwar ideale Werkzeuge für mechanistische Studien, aber für klinische Indikationen sind kleine chemische, nichtpeptidische Moleküle interessanter, die eine hohe Bioverfügbarkeit sowie eine niedrige Bioabbaubarkeit aufweisen, und damit oral verabreichbar sind. Außerdem sind diese eher in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren. Eine Vielzahl nichtpeptidischer Antagonisten (einige Beispiele siehe Tab. 1.3) befinden sich in vorklinischen und pharmakologischen Studien, wie z. B. die Pyrrolopyrimidinderivate Antalarmin und CP-154526, das 2-Aminothiazol SSR-125543A, das Pyrazolotriazin DMP-696 und das Aminopyrazolopyrimidinderivat R-121919. Diese Verbindungen



sind CRF<sub>1</sub>-rezeptorselektive, potente und oral wirksame Antagonisten, die in vitro die Signalkaskade des aktivierten CRF<sub>1</sub>-Rezeptors blockieren. Sie zeigen in vivo bei der Inhibierung von streßartigen Zuständen und in Verhaltensexperimenten an Tiermodellen eine hohe Wirksamkeit (Gilligan und Li, 2004; Holsboer, 2001).

### 1.7 CRF- und Urocortin I-induzierte Signaltransduktion

Wird ein spezifischer Ligand (z. B. biogene Amine, Aminosäuren, Ionen, Lipide, Peptide, Pheromone, Opiate und Licht) durch einen GPCR gebunden (Abb. 1.3), erfolgt die Signalweitergabe durch die Zellmembran. Der dazugehörige Rezeptor wird aktiviert und durch ihn auch die auf der cytoplasmatischen Seite befindlichen heterotrimeren Guaninnukleotid-bindenden Proteine (G-Proteine). Diese sind die spezifischen Reaktionspartner in

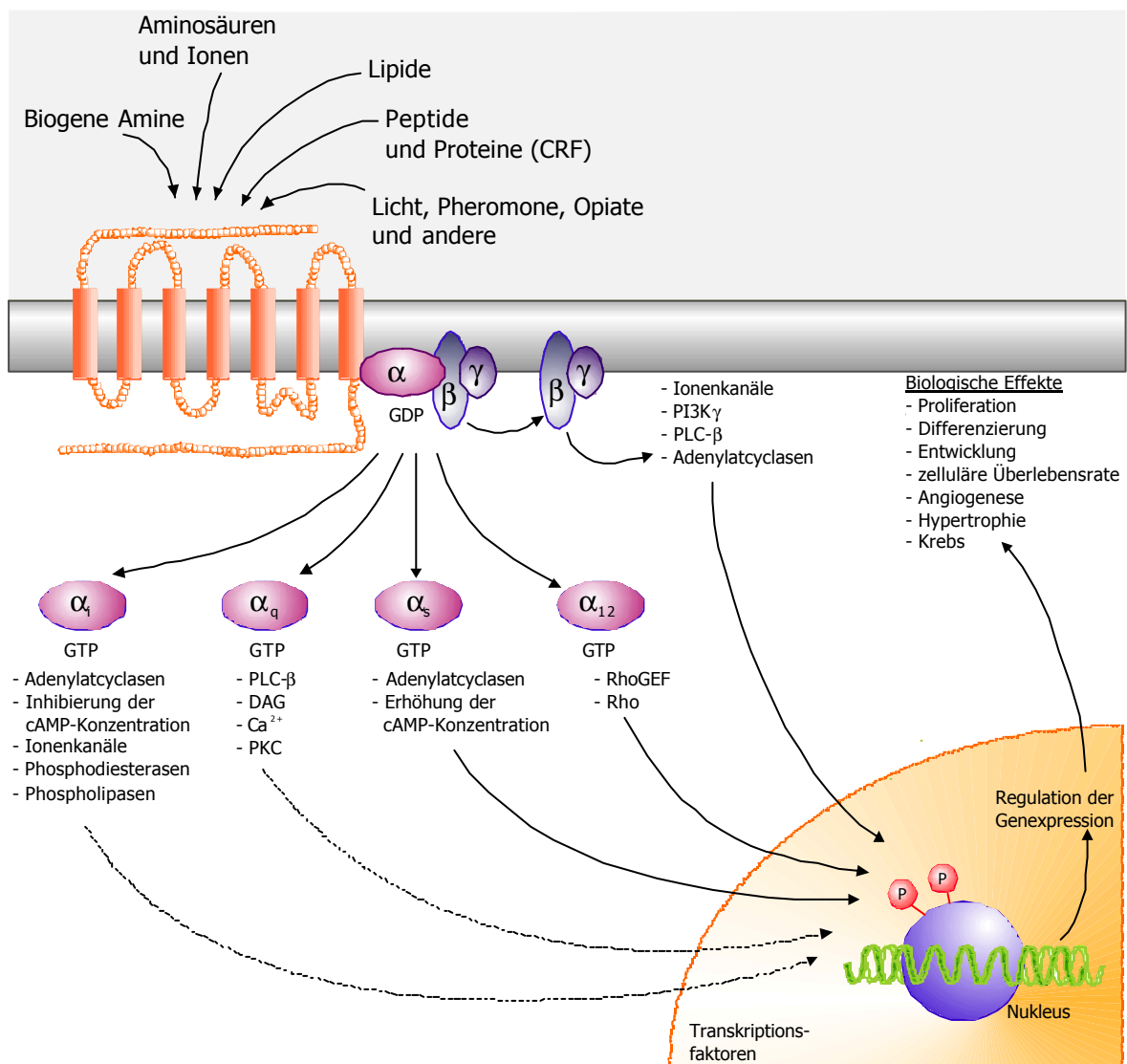


Abbildung 1.3: Agonist-induzierte Signaltransduktion von GPCR.

der Signalübertragung durch GPCR. Ihr gemeinsames Strukturmerkmal ist der Aufbau aus drei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). Die  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins besitzt eine Bindungsstelle für GDP bzw. GTP und trägt die GTPase-Aktivität. Die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten sind ein fest assoziierter Komplex und als solcher aktiv. Aktivierte G-Proteine geben das Signal an nachgeschaltete Effektormoleküle weiter, die enzymatische Aktivität tragen oder einen Ionenkanal darstellen (z. B. Adenylatcyclasen, Phosphodiesterasen und -lipasen, weitere Vgl. Abb. 1.3). Dabei führt die  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins (z. B.  $\alpha_i$ ,  $\alpha_q$ ,  $\alpha_s$  oder  $\alpha_{12}$ ) die spezifische Wechselwirkung mit den in der Signalkette vorgeschalteten Rezeptoren und mit den nachgeschalteten Effektormolekülen<sup>8</sup> durch. Die Aktivierung solcher Effektormoleküle hat eine Konzentrationsänderung diffusibler Signalmoleküle<sup>9</sup> wie bspw. cAMP, DAG,  $\text{Ca}^{2+}$  zur Folge, was weitere spezifische Reaktionen auslöst. Die Signale werden ins Zellinnere weiterleitet und zelluläre Reaktionen werden gesteuert ( $\rightarrow$  Regulation der Genexpression  $\rightarrow$  biologische Effekte, siehe Abb. 1.3).

Signale können u. a. durch niedermolekulare Botenstoffe, sogenannte „Second Messenger“, weitergeleitet werden. Dem Botenstoff cAMP kommt eine Schlüsselrolle in der Agonist-induzierten Signaltransduktion von GPCR zu. Es moduliert die Aktivität von cAMP abhängigen Proteinkinasen sowie CNG-Ionenkanälen und führt somit über diese Signalkaskade zur zellulären Antwort auf einen Stimulus (Tang und Hurley, 1998). Schlüsselschritt in der Akkumulation von intrazellulärem cAMP ist die Modulation der Adenylatcyclase-Aktivität. Die membranständige Adenylatcyclase ist ein Enzym, das cAMP synthetisiert, und durch extra- und intrazelluläre Stimuli reguliert wird (Hurley, 1999).

Neben der Adenylatcyclase als bekanntestes Second Messenger-System stellt für eine Vielzahl rekombinanter GPCR auch der Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels einen universellen intrazellulären Botenstoff dar. Bei  $G_s$ -gekoppelten Rezeptoren wird die Adenylatcyclase aktiviert, was zu einem cAMP-Anstieg in der Zelle führt. cAMP aktiviert die PKA, welche anschließend verschiedene Zielmoleküle („Targets“) phosphoryliert. Dieser Signalweg kann zu einer Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration entweder infolge der Calciumausschüttung aus intrazellulären Calciumspeichern oder aus dem extrazellulären Medium führen. Eine direkte Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkanälen durch  $G_{\alpha_s}$  ist ebenso möglich. Der

---

<sup>8</sup> Auch der  $\beta\gamma$ -Komplex kann an der Signalübertragung an nachgeschaltete Effektorproteine beteiligt sein.

<sup>9</sup> Diffusible Signalmoleküle sind intrazelluläre Botenstoffe, die ihr Zielprotein vorwiegend auf dem Weg der Diffusion erreichen.

Signalweg für  $G_q$ -gekoppelte Rezeptoren über die Stimulierung der PLC führt zu einem Anstieg von  $IP_3$ . Dieses stimuliert den  $IP_3$ -Rezeptor an der Membran des endoplasmatischen Reticulums, wodurch intrazelluläres  $Ca^{2+}$  ansteigt (Hinterding et al., 1998). Dagegen haben einige  $G_i$ -gekoppelte Rezeptoren keinen Einfluß auf intrazelluläres  $Ca^{2+}$ . Dem ist jedoch entgegenzustellen, daß die Situation in rekombinanten Zellsystemen ganz unterschiedlich sein kann. Bspw. wurde beschrieben, daß die  $Ca^{2+}$ -Mobilisation durch Opioide in Zellen, die durch  $G_i$ -gekoppelte  $\mu$ -Opioidrezeptoren verfügen, vermittelt wurde (Jin et al., 1994).

Untersuchungen zur CRF-induzierten Signaltransduktion erfolgten in der Vergangenheit vorrangig am  $CRF_1$ -Rezeptor. Die Bindung von Liganden der CRF/Urocortin Peptidfamilie (insbesondere von CRF und Urocortin I) durch  $CRF_1$ -Rezeptoren führt über die Kopplung an  $G_s$ -Proteine zur Aktivierung der Adenylatcyclase und zu einer erhöhten PKA-Aktivität in zellspezifischer Art und Weise (z. B. in nativem Gewebe, in peripheren und vom Gehirn abstammenden Zelllinien, in heterolog exprimierenden Zellen). Neben der  $G_s$ -Kopplung werden  $G_i$ - und  $G_q$ -Proteine von heterolog exprimierten  $CRF_1$ -Rezeptoren in HEK 293- bzw. CHO-Zellen (Grammatopoulos et al., 1999; Grammatopoulos et al., 2000) als auch im Ratten-cerebralen Cortex (Grammatopoulos et al., 2001) aktiviert. Blank et al. (2003) beschreiben zwei Signalkaskaden im Maus-Hippokampus nach Aktivierung durch r/hCRF: über Interaktion mit  $G_{q,11}$  den PLC/PKC-Signalweg und über Interaktion mit  $G_s$ ,  $G_{q,11}$ ,  $G_i$  den Adenylatcyclase/cAMP/PKA-Signalweg (Blank et al., 2003). Außerdem wurde gezeigt, daß Urocortin I die Signalkette über  $G_q$ /PLC/ $IP_3$ /PKC in HEK 293-Zellen, die h $CRF_1$ -Rezeptoren exprimieren, auslöst (Grammatopoulos et al., 2000).

## **1.8 Screening als Hochdurchsatzverfahren – ein wichtiges Werkzeug in der Wirkstoffentwicklung**

Wie können pharmakologisch interessante Verbindungen ermittelt werden, um neue rezeptorsubtypselektive Agonisten und Antagonisten zu erhalten?

Zwei Aspekte sind für die Identifizierung pharmakologisch wertvoller Substanzen hinsichtlich eines Targets zu beachten: zum einen müssen Testverbindungen in großer Anzahl zur Verfügung stehen, die über kombinatorische Chemie als (Substanz-)Bibliotheken enormer Größe schneller und kostengünstiger hergestellt werden können, im Vergleich zu Methoden der Extraktion von Naturstoffen (Petsko, 1996); zum anderen sind Assay Methoden erforderlich, mit denen diese Bibliotheken effizient und rationell getestet werden können. Moderne Wirkstoffentwicklung ist ohne Anwendung von Hochdurchsatzverfahren (high

throughput screening, HTS) in der pharmazeutischen Forschung nicht mehr wegzudenken. Unter dem Begriff Hochdurchsatzverfahren/-screening sind Technologien zusammengefaßt, mit Hilfe derer – im günstigsten Fall in einem vollautomatisierten Prozeß – ein effektives und schnelles Testen einer großen Anzahl von Verbindungen möglich ist, um pharmakologisch interessante Leadstrukturen zu erhalten und zu entwickeln (Dove, 1999). Die klassische Form des HTS ist heute zumeist ein ultra-HTS, bei dem pro Tag mehr als 100000 Verbindungen im jeweiligen biochemischen Test analysiert werden können, sofern die Kapazität der HTS-Methode es zuläßt. Eine zweite Form des Screenings untersucht kombinatorisch unterschiedliche Chemikalien (bspw. Katalysatoren) oder Reaktionsbedingungen (bspw. Druck, Temperatur), um neue Substanzen für die Pharmaforschung zu synthetisieren oder ihre Synthese zu optimieren. Erfolgreiches HTS setzt voraus, viel über die biologischen Targets, über ihre Strukturen und Funktionen zu wissen. HTS kann erste pharmakologische Informationen über Testverbindungen in einem sogenannten Primärassay liefern. Werden potentielle Leadstrukturen durch ein Screening identifiziert, sollten weitere Struktur-Wirkungs-Untersuchungen in biologischen Assays (in Sekundärassays) folgen, um diese „Treffer“-Verbindungen auf ihre biologische Wirksamkeit hin zu testen und um sie für eventuelle klinische Anwendungen chemisch weiter zu optimieren. Methoden und Technologie-Beispiele aus der jüngeren Literatur, die für eine Anwendung im HTS geeignet erscheinen, sind in Tab. 1.4 zusammengestellt. Diese Auswahl soll u. a. einen Überblick über Screening-Applikationen an Rezeptoren, insbesondere GPCR, unter Ausnutzung ihrer spezifischen Signaltransduktion geben.

**Tabelle 1.4: Assay Methoden als Hochdurchsatzverfahren.**

Bezeichnung	Detektionsmittel	Applikation	Referenz
<b>Homogene Assays</b>			
Durchflußcytometrie	Fluoreszenz	GPCR	(Waller et al., 2003)
FRET	G <sub>α</sub> -Protein und RGS-Protein	GPCR	(Kimple et al., 2003)
Immobilisierungsassay	Fluoreszenz	β <sub>2</sub> -adrenerger Rezeptor	(Neumann et al., 2002)
SPA-Assay	[methyl- <sup>3</sup> H]-Rauwolscine	α <sub>2B</sub> -adrenerger Rezeptor	(Sen et al., 2002)
	[ <sup>3</sup> H]-Hexadekan	HeLa-Zellen	(Culliford et al., 2002)
	[ <sup>3</sup> H]-BRL49653	PPAR <sub>γ</sub> -Modulator	(Wu et al., 2005)
	GDP-[ <sup>3</sup> H]-Fucose	Fucosyltransferase-VII-Inhibitor	(Miyashiro et al., 2005)

Fortsetzung Tabelle 1.4:

Bezeichnung	Detektionsmittel	Applikation	Referenz
<b>Separationsassays</b>			
Filter-Bindungsassay	[ <sup>125</sup> I]-Somatostatin-14	Somatostatin <sub>2</sub> -Rezeptor	(Birzin und Rohrer, 2002)
<b>Reportergen Assays</b>			
Alkalische Phosphatase	CRE-SEAP-Assay in Suspensionskultur	GPCR (G <sub>αs</sub> , G <sub>αq</sub> )	(Durocher et al., 2000)
β-Galaktosidase	CRE-Element	GPCR (G <sub>s</sub> , G <sub>q</sub> )	(Chen et al., 1995)
β-Laktamase	NFAT-Response-Element	Bradykinin <sub>B1</sub> -Rezeptor (G <sub>q</sub> )	(Kunapuli et al., 2003)
GFP	EGFP-Induktion	Biotin, Cortisol	(Deo und Daunert, 2001)
	Dioxin-responsive EGFP-Induktion	Arylhydrocarbon-rezeptor	(Nagy et al., 2002)
Luciferase	c-fos und fos-Luc Fusionsgen	Gn-RH Rezeptor	(Beckers et al., 1997)
	VIP-Promoter CRE	GPCR (G <sub>i</sub> , G <sub>s</sub> , G <sub>q</sub> )	(Fitzgerald et al., 1999)
	cAMP-sensitive Luciferase	Opioid-artiger Rezeptor	(Wnendt et al., 1999)

Viele Arten von *in vitro* Assays sind als HTS anwendbar. Durch biochemische Assays, die in homogene Assays und Separationsassays unterteilt werden, kann eine Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung unter Verwendung von bspw. SPA- und Filter-Bindungsassays oder FRET-basierten Assays (fluorescence resonance energy transfer) untersucht werden (Walters und Namchuk, 2003).

Zell-basierte funktionelle Screening-Assays bieten wesentliche Vorteile für ein Rezeptor-screening, da eindeutige Informationen über die Natur der pharmakologischen Eigenschaften einer Verbindung an einem spezifischen Rezeptor, Ionenkanal oder intrazellulären Target erhalten werden. Rezeptorbindungsassays können nicht ohne weiteres zwischen Agonisten und Antagonisten differenzieren. Dagegen wird im funktionellen Screening-Assay vorteilhaft zwischen agonistischer, allosterischer oder antagonistischer Aktivität am entsprechend untersuchten Rezeptor unterschieden (Chambers et al., 2003; Johnston und Johnston, 2002). Ferner lassen sich GPCR auch über ihre Signaltransduktionswege mit Hilfe von Reportergenen (z. B. GFP, β-Galaktosidase, Luciferase) in Zell-basierten HTS-Anwendungen untersuchen (Broach und Thorner, 1996).

## 1.9 Zielsetzung

Um die komplexe biologische Aktivität der CRF/Urocortin Peptidfamilie mit ihren Rezeptorsubtypen und deren Bedeutung für eine Vielzahl biologischer Prozesse in Säugetieren untersuchen zu können, ist der Einsatz von CRF-rezeptorsubtypeselektiven Liganden erforderlich, die aber zu Beginn dieser Arbeit nicht vorlagen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher, selektive Agonisten für die beiden CRF-Rezeptorsubtypen zu entwickeln. Im Vordergrund steht die Etablierung zellulärer CRF-rezeptorsubtypspezifischer Testsysteme. Dafür sollen CRF<sub>1</sub>- und CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren jeweils heterolog in eukaryontischen Zellen exprimiert werden. Zur Realisierung dieser Zielsetzung ist es erforderlich, die vollständige cDNA der CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren (CRF<sub>2a</sub>, CRF<sub>2b</sub>) aus Ratte zu klonieren. Mit den heterolog exprimierten CRF-Rezeptoren sollen sowohl ein Bindungsassay als auch ein funktioneller Adenylatcyclase Assay etabliert und anhand ausgewählter Peptide der CRF/Urocortin Peptidfamilie charakterisiert und schließlich mit entsprechenden Daten, die an endogenen CRF-Rezeptorsystemen vorlagen (Rattenhirn, Mausherz), verglichen werden. Für ein Hochdurchsatzscreening soll in Kooperation (AG „Zelluläre Signalverarbeitung“, IBI 1, Forschungszentrum Jülich) ein funktioneller Bioassay auf der Basis der Bestimmung von Agonist-induziertem intrazellulären Calciumanstieg etabliert und mit den obigen Systemen verglichen werden.

Durch einen systematischen Austausch von Aminosäuren bzw. Peptidsequenzen in einzelnen Vertretern der CRF/Urocortin Peptidfamilie soll im zweiten Teil der Arbeit durch Struktur-Wirkungs-Untersuchungen ermittelt werden, ob sich die relativ geringe Selektivität der natürlich vorkommenden Agonisten für CRF-Rezeptorsubtypen auf bestimmte Domänen oder Aminosäureseitenketten zurückführen läßt. Mit der Entdeckung des CRF<sub>2</sub>-rezeptorselektiven Urocortin II sollen sich die Untersuchungen insbesondere auf den Vergleich von diesem Urocortin II mit dem nicht selektiven Urocortin I konzentrieren. Dabei soll ein wesentlicher methodischer Aspekt auch darin bestehen, zu prüfen, ob Qualität und Quantität (~ 50 nmol) von Peptiden mit einer Länge von 40 Aminosäuren, die als Peptidbibliotheken mittels Spot-Technologie synthetisiert werden, zuverlässige Ergebnisse in dem funktionellen HTS-Bioassay liefern.

Der Nachweis, daß individuelle Aminosäurereste in einem Peptidliganden zur Erzielung von Rezeptorsubtypeselektivität führen können, wäre auch von Bedeutung für das Design rezeptorsubtypeselektiver Agonisten bzw. Antagonisten für andere GPCR.