

5 Selektive Liganden für CRF₂-Rezeptoren

5.1 Einführung

Der dieser Arbeit zugrunde liegende Ansatz zur Entwicklung von CRF-rezeptorsubtyp-selektiven Liganden geht von einem 2-Domänen-Bindungsmodell aus (Kap. 1.5.3). Danach wird der C-Terminus langkettiger Peptidhormone, wie z. B. die Liganden der CRF/Urocortin Peptidfamilie, vom N-terminalen Teil des CRF-Rezeptors gebunden, während der N-Terminus des Liganden von anderen extrazellulären Domänen des Rezeptors gebunden wird. Struktur-Wirkungs-Untersuchungen an Peptiden der CRF/Urocortin Peptidfamilie sind dadurch erschwert, daß die Peptide in wäßriger Lösung keine stabile Konformation aufweisen. Durch helixstabilisierende Substitutionen innerhalb des Urocortin I wurde ein hoch affines und potentes Analogon entwickelt, dessen Struktur in wäßriger Lösung weitgehend bestimmt werden konnte und zur Ableitung dieses Bindungsmodells diente.

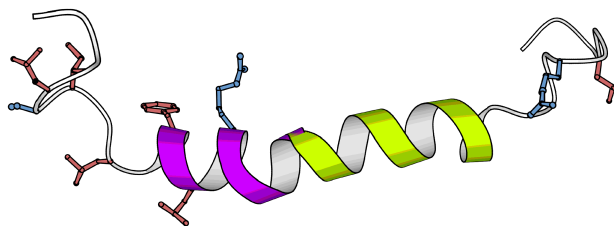


Abbildung 5.1: Struktur des Modellpeptids UEK(1-40) mit einer N- und C-terminalen Rezeptorbindungsdomäne, die durch eine helikale Linkersequenz miteinander verbunden sind. [aus Beyermann et al., 2000].

Die durch zweidimensionale ¹H-NMR-Spektroskopie und durch molekulare Modellierung (molecular modeling) ermittelte Struktur des α -helikalen Modellpeptids UEK(1-40) (DDPPLSIDLTFHLLRTLLEIEKEEKEKKRKEQNRKLLDEV-NH₂) unterteilt sich in eine N-terminale, die Signaltransduktion auslösende Domäne, eine C-terminale bindende Peptiddomäne sowie eine mittelständige Linkersequenz. Für die Signalübertragung ist die Verbindung der beiden Rezeptorbindungsdomänen des Liganden durch den Linker und eine helikale Struktur des Linkers von besonderer Bedeutung (Abb. 5.1) (Beyermann et al., 2000).

N- und C-terminale Verkürzungen des Peptids zum Design selektiver Agonisten sind wegen des damit verbundenen Potenzverlustes nicht möglich. Es sollte deshalb versucht werden, durch Variation der Linkersequenz, der N- und C-Termini sowie die Konstruktion von Peptidchimären, bestehend aus Peptiden der CRF/Urocortin Peptidfamilie, rezeptor-subtypselektive Liganden zu entwickeln. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, anhand zweier peptidischer Ligandbibliotheken des unselektiven Urocortin I und des selektiven Urocortin II den Einfluß einer Tetrapeptidsequenz im N-Terminus auf die Ligand-Rezeptor-subtypselektivität zu untersuchen.

Für die Auswahl eines geeigneten Screeningverfahrens war entscheidend, welche Anzahl an Peptiden möglichst rationell synthetisiert und getestet werden können. Die Peptide der Ligandbibliotheken wurden durch Parallelsynthese mittels Spot-Technologie an Cellulosemembranen hergestellt (Kap. 2.1.1). Die dabei erhaltene Probenmenge ist auf ca. 50 nmol/Probe limitiert. Um eine schnelle und effektive Testung zweier Peptidbibliotheken mit 80 Peptiden pro Bibliothek an den drei rCRF-Rezeptoren zu ermöglichen, wurde als Primärassay der HTS-Bioassay (Kap. 2.4.3.1, 4.3.2) eingesetzt. Diese Methode eignet sich aufgrund ihrer hohen Probendurchsatzrate. Durch Anwendung von Zellkulturplatten im 96-Well-Format sowie einer schnellen Detektion mit dem FLIPR ist ein zeitgleiches Screening an allen CRF-Rezeptoren möglich. Die Messung im 96- oder sogar im 384-Wellplatten-Modus ist schnell und einfach – ein großer Vorteil gegenüber anderen funktionellen Assays. Auch der finanzielle Vorteil bezüglich des Verzichts auf Radioaktivität im Fluoreszenz-basierten Verfahren ist für ein Screening von vielen Substanzen nicht zu unterschätzen. Außerdem konnte bei der Messung von intrazellulärem Calcium durch Automatisierung der Pipettierschritte mit einem Pipettierroboter der Durchsatz an Zellkulturplatten im 96-Well-Format weiter erhöht werden.

Unter Berücksichtigung der verschiedenen Assaybedingungen müssen jedoch die Ergebnisse aus dem Screening-Assay durch zusätzliche pharmakologische Untersuchungen abgesichert werden. Deshalb wurden die aus diesen Screeninguntersuchungen resultierenden pharmakologisch interessanten Peptide hinsichtlich selektiver Eigenschaften in Sekundärassays (Bindungsassay, Adenylatcyclase Assay) eingehender untersucht.

5.2 Der Einfluß ausgewählter Peptiddomänen und Aminosäuren auf die CRF-Rezeptorsubtypselektivität

5.2.1 Die Variation der Linkerlänge eines Modellpeptids durch helikale Linkersequenzen

Daß die N- und C-terminalen Bindungsdomänen im CRF vorteilhaft durch eine α -helikale Struktur verbunden sein könnten, wurde aus CD-Studien abgeleitet, die am potenten Polyalanin-substituierten r/hCRF-Agonisten in wäßriger Lösung erfolgten. Diese Untersuchungen zeigten eine starke Helixinduktion durch den Alanin-Einbau. Das Modellpeptid UEK(1-40) wurde in der Form synthetisiert, daß beide Bindungsdomänen durch eine Linkersequenz mit ausschließlich geladenen Aminosäuren (Glutaminsäure, Lysin) verbunden wurden. Dieses Peptid UEK(1-40) wurde im folgenden schrittweise verkürzt, durch z. B. zwei Aminosäurereste in Des(23-24)-UEK oder durch sechs Aminosäurereste in Des(23-28)-UEK (Abb. 5.2).

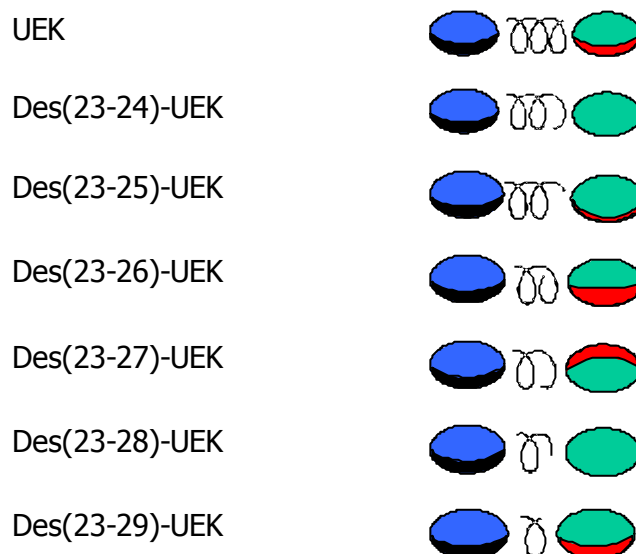


Abbildung 5.2: Schematische Präsentation verschiedener α -helikaler Linkerlängen zwischen den N- und C-terminalen Rezeptorbindungsdomänen des Modellpeptids UEK(1-40) und seiner Analoga.

In vorangegangenen Untersuchungen war gezeigt worden, daß Analoga des UEK(1-40) mit einem helikalen Linker unterschiedlicher Länge zwischen N- und C-Terminus eine abgestufte Potenz am CRF₁-Rezeptor zeigen, aber alle Analoga potente Agonisten waren (Beyermann et al., 2000). Es sollte nun untersucht werden, ob die Länge des helikalen Linkers und damit eine unterschiedliche Orientierung von N- und C-Termini zueinander an den Rezeptorsubtypen möglicherweise differenzierte biologische Aktivitäten bewirken.

Struktur-Wirkungs-Untersuchungen am Modellpeptid UEK(1-40) und seiner strukturell modifizierten Analoga (Abb. 5.2, Kap. 8.5) erfolgten im Konzentrationsbereich von 10⁻⁹ bis 10⁻⁶ M im HTS-Bioassay (Kap. 2.4.3.1).

Keines der UEK-Analoga zeigte eine Differenzierung zwischen den CRF-Rezeptorsubtypen. Sowohl der rCRF₁-Rezeptor als auch die rCRF₂-Rezeptoren (rCRF_{2a}, rCRF_{2b}) wurden äquipotent (EC₅₀ 1 - 5 nM) im HTS-Bioassay aktiviert. Damit konnte gezeigt werden, daß die mit helikalen Linkern synthetisierten Peptidverbindungen unabhängig von ihrer Linkerlänge starke agonistische Eigenschaften aufweisen, ohne aber eine CRF-Rezeptorsubtypselektivität zu zeigen.

Um zu überprüfen, ob die Agonist-induzierte Änderung von intrazellulärem Calcium auf eine Aktivierung des CRF-Rezeptors beruht, wurden Kontrollexperimente mit HEK 293 Wildtyp-Zellen, die nur den Ionenkanal exprimierten (Kap. 2.4.3.1, Tab. 2.3), durchgeführt. Die Peptidzugaben lösten keine Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels aus. Somit kann davon ausgegangen werden, daß die Änderung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, die durch ein verändertes Fluoreszenz-Signal angezeigt wird, tatsächlich auf eine spezifische CRF-Rezeptoraktivierung beruht¹. Außerdem führte die Zugabe des Assaypuffers ohne Peptid zu keiner Änderung der Fluoreszenz-Intensität, so daß auch Artefakte in diesem System ausgeschlossen werden konnten².

5.2.2 Die Variation der Linkerlänge eines Modellpeptids durch ε-Aminocapronsäure

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Linkersequenz essentiell für die Rezeptoraktivierung ist. Dazu wurden Analoga designt, in denen der Urocortin I-N-Terminus über Isoleucin und Glutaminsäure sowie ε-Amino-capronsäurereste (acp) mit einem C-Terminus kombiniert wurde (Kap. 8.5). Dieser C-Terminus setzte sich zusammen aus Aminosäuren aus der CRF/Urocortin Peptidfamilie. Die Bestimmung der Rezeptoraktivierung über den Peptid-induzierten Ca²⁺-Einstrom erfolgte wie unter Kap. 2.4.3.1 beschrieben. Es wurden UEK-Analoga mit nicht-helikalen, variierten Linkerlängen getestet (Abb. 5.3, Kap. 8.5).

¹ Alle, in Kap. 5 getesteten Peptide zeigten in Kontrollexperimenten mit HEK 293 Wildtyp-Zellen, die keinen CRF-Rezeptor sondern nur den Ionenkanal exprimierten, keine Signale, so daß die Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration tatsächlich auf eine spezifische Rezeptoraktivierung beruht.

² Die Injektion des Assaypuffers ohne Peptid induzierte bei allen, in Kap. 5 getesteten Peptidverbindungen kein Fluoreszenz-Signal. Damit konnten Artefakte ausgeschlossen werden.

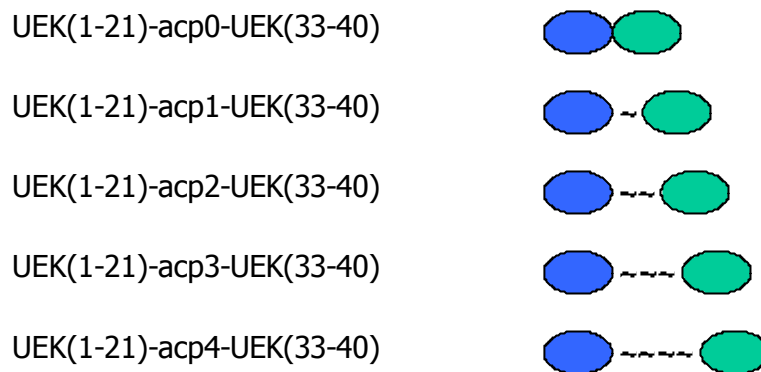


Abbildung 5.3: Schematische Präsentation verschiedener Linkerlängen durch ϵ -Amino-capronsäurereste (mit acp 0 – 4) zwischen den N- und C-terminalen Rezeptorbindungsdomänen des Modellpeptids UEK(1-40).

ϵ -Amino-capronsäure ist aufgrund seiner chemischen Struktur ($\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_5\text{-COOH}$) ein hoch flexibler Aminocarbonsäurerest. Die Verbindung der N-terminalen mit der C-terminalen Bindungsdomäne über 0 bis 4 ϵ -Amino-capronsäurereste ergab nur eine geringe Differenzierung der rCRF-Rezeptoren in der biologischen Potenz. Für den rCRF₁-Rezeptor wurden EC₅₀-Werte um 100 nM erhalten. Für beide rCRF₂-Rezeptor-Spleißvarianten lagen die Potenzen bei 100 – 300 nM. Alle Peptide waren unabhängig von ihrer Linkerlänge nur Agonisten mit geringfügiger Potenz. Damit wurde gezeigt, daß die Linkerlänge mit einer flexiblen Struktur ohne Einfluß auf die Selektivität bezüglich des rCRF₁- bzw. rCRF₂-Rezeptors ist. Jedoch ist die helikale Struktur essentiell für eine Rezeptoraktivierung mit hoher Potenz (Vgl. Kap. 5.2.1).

5.2.3 Peptidchimäre aus oCRF, Urotensin I und Sauvagin und deren Einfluß auf die CRF-Rezeptorselektivität

Intramolekulare Wechselwirkungen zwischen den N- und C-Termini langkettiger Peptidhormone können an einer stabilen biologisch potenten Konformation beteiligt sein (Gulyas et al., 1995). Variationen von nicht konservierten Aminosäuren im N- bzw. C-terminalen Teil von Peptidliganden könnten darum bei solchen Interaktionen voneinander abhängig sein (Beyermann et al., 2000).

Sauvagin und Urotensin I aktivieren wenig selektiv beide CRF-Rezeptorsubtypen, während oCRF im Vergleich zu Sauvagin und Urotensin I eine signifikante Selektivität für den CRF₁-Rezeptor besitzt (Kap. 1.6.1). Diese Charakteristik zwischen den drei nativen CRF-Liganden spiegelt sich auch im Adenylatcyclase Assay (Tab. 4.5) und im HTS-Bioassay (Tab. 4.6) wieder. Es stellt sich die Frage, welchen Einfluß nicht konservierte Aminosäuren

innerhalb von oCRF, Sauvagin und Urotensin I auf die Selektivitätsunterschiede dieser Liganden haben. Oder anders formuliert, kann eine CRF-Rezeptorsubtypselektivität durch einzelne sequenzielle Domänen innerhalb der nativen Liganden erzeugt werden?

Tabelle 5.1: Primärstruktur von oCRF, Sauvagin und Urotensin I für ein Chimären-Design. Aminosäurepositionen, die sich von oCRF unterscheiden und somit nicht konserviert sind, sind fett gedruckt.

Peptid	Sequenz
Native Liganden	
oCRF	SQ EPPISLDLTFHLLR EV LEMTKADQLAQQAH SNR KLLD IA -NH ₂
Sauvagin	ZG PPISIDL SLE LLLR KMI E IEK Q Q EA ANN RL LLD TI-NH ₂
Urotensin I	NDD PPISIDLTFHLLR NMI EMARNEN QRE QA GL NRK YL DEV-NH ₂
Chimäre Liganden	
NDD(1-3)-oCRF	NDD PPISLDLTFHLLR EV LEMTKADQLAQQAH SNR KLLD IA -NH ₂
NMI(17-19)-oCRF	SQ EPP ISLDLTFHLLR NMI EMTKADQLAQQAH SNR KLLD IA -NH ₂
YLDEV(37-41)-oCRF	SQ EPP ISLDLTFHLLR EV LEMTKADQLAQQAH SNR K YL DEV-NH ₂
SLE(11-13)-KMI(17-19)-oCRF	SQ EPP ISLDL SLE LLLR KMI EMTKADQLAQQAH SNR KLLD IA -NH ₂

Um diese Fragestellung zu klären, wurden Chimäre aus oCRF, Sauvagin und Urotensin I untersucht, die so konstruiert waren, daß jeweils nicht konservierte Aminosäurereste des Sauvagins und des Urotensin I in das oCRF eingefügt wurden (Tab. 5.1). Die Bestimmung der Rezeptoraktivierung über den Peptid-induzierten Ca²⁺-Einstrom in HEK 293-Zellen erfolgte an allen drei rCRF-Rezeptoren wie unter Kap. 2.4.3.1 beschrieben.

Alle untersuchten Chimärenpaare zeigten im HTS-Bioassay hoch potente agonistische Eigenschaften an allen drei rCRF-Rezeptoren (EC₅₀ 0,4 – 7 nM). Aminosäurevariationen in Chimären aus Urotensin I/oCRF (Tab. 5.1, z. B. NDD(1-3)-oCRF; NMI(17-19)-oCRF; YLDEV(37-41)-oCRF) zeigten keine Rezeptorsubtypselektivität. Mit der Peptiddomäne SLE im Chimärenpaar aus Sauvagin/oCRF (SLE(11-13)-oCRF) wurde zwar zwischen rCRF₁- und rCRF₂-Rezeptoren differenziert, jedoch nicht in höherer Weise als bei dem nativen oCRF. Der Einbau von SLE und KMI in oCRF führte zu einem Verlust an Differenzierung zwischen den Rezeptorsubtypen (EC₅₀ 34 nM für den rCRF₁-; EC₅₀ 36 nM für den rCRF_{2b}-Rezeptor).

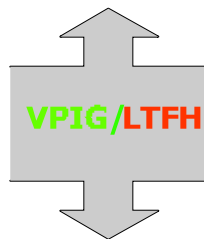
Anhand dieser Variationen einzelner nicht konservierter Aminosäuren bzw. kurzer Peptidsequenzen konnte gezeigt werden, daß die Rezeptorsubtypselektivität durch keine

sequenziellen Domänen bestimmt wurde. Die Differenzierung von oCRF am rCRF₁- und rCRF₂-Rezeptor ergibt sich folglich nicht aus der Funktion einer einzelnen sequenziellen Peptidomäne, sondern ist offensichtlich das Resultat aller sequenziellen Unterschiede zu den Primärstrukturen der nicht selektiven Liganden der CRF/Urocortin Peptidfamilie.

5.2.4 Die Rolle des VPIG-Motivs für die CRF-Rezeptorselektivität des Urocortin I, Sauvagin, Urotensin I und r/hCRF

Ein neuer Ansatz bezüglich CRF-Rezeptorsubtypselektivität war die Entdeckung der beiden CRF₂-rezeptorselektiven Agonisten Urocortin II und Urocortin III (Kap. 1.6.1). Ausgehend vom Urocortin II sollte untersucht werden, ob das VPIG-Motiv im N-Terminus des selektiven Urocortin II ein Selektivitätsmerkmal darstellt und durch Einbau in die korrespondierenden Positionen anstelle des LTFH-Motivs in das nicht selektive Urocortin I zu einer Selektivität führt (Abb. 5.4). Schlüsselexperiment dafür war die Bestimmung der Rezeptoraktivierung an allen drei rCRF-Rezeptoren im HTS-Bioassay (Kap. 2.4.3.1), wobei VPIG(9-12)-Urocortin I im Vergleich zu Urocortin I getestet wurde.

Urocortin I DDPPLSIDLTFHLLRTLLELARTQSQRERAEQNRIIFDSV-NH₂



VPIG(9-12)-Urocortin I DDPPLSIDVPIGLLRTLLELARTQSQRERAEQNRIIFDSV-NH₂

Abbildung 5.4: Das VPIG/LTFH-Motiv in der Primärstruktur von Urocortin I.

Während sich Urocortin I im HTS-Bioassay äquipotent an allen drei rCRF-Rezeptoren verhielt (Tab. 4.6, EC₅₀ 2 – 5 nM), führte der Einbau von VPIG in Urocortin I zu einem selektiven Agonisten für die rCRF₂-Rezeptoren. Wie aus der Konzentrations-Wirkungskurve ersichtlich (Abb. 5.5), zeigte das resultierende VPIG(9-12)-Urocortin I keine agonistische Aktivität am rCRF₁-Rezeptor mehr. Die Bindung dieses Agonisten verursachte dagegen eine Rezeptoraktivierung am rCRF_{2a}- (EC₅₀ 47 nM) und am rCRF_{2b}-Rezeptor (EC₅₀ 15 nM) (Tab. 5.2).

Da das VPIG-Motiv im Urocortin I zu einer eindeutigen Differenzierung zwischen den beiden rCRF-Rezeptorsubtypen führte, schloß sich die Fragestellung an, in welcher Weise

sich dieses Motiv in den anderen Liganden der CRF/Urocortin Peptidfamilie verhält. Dazu wurde es in die jeweils korrespondierenden Positionen in den N-Terminus der Peptide Sauvagin, Urotensin I und r/hCRF eingeführt.

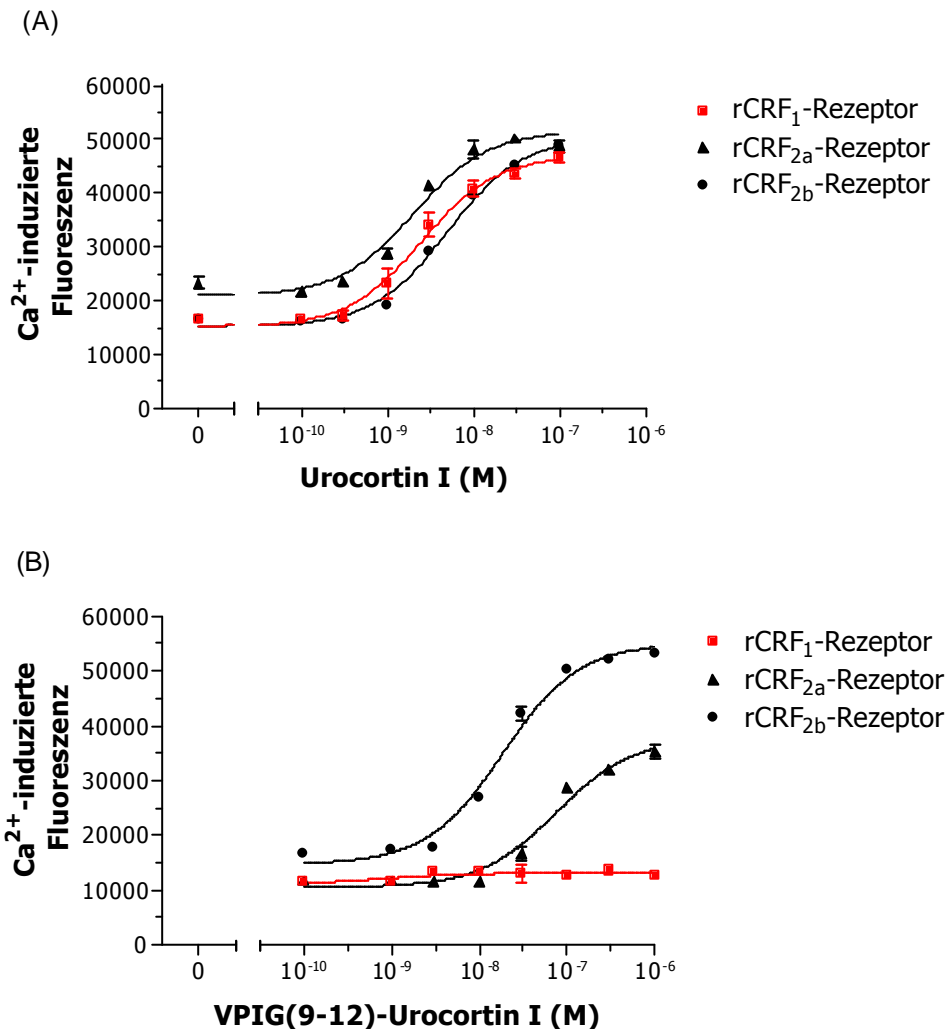


Abbildung 5.5: Konzentrations-Wirkungskurven von Urocortin I (A) und VPIG(9-12)-Urocortin I (B) im HTS-Bioassay. Die Fluoreszenz-Änderung infolge des Ca²⁺-Einstroms wurde an HEK 293-Zellen mit stabil koexprimierten rCRF-Rezeptoren und Ca²⁺-sensitiven Ionenkanal untersucht und mittels FLIPR erfaßt. Jedes Peptid wurde zweifachbestimmt.

Eine Differenzierung hinsichtlich Rezeptorsubtypselektivität zwischen dem rCRF₁-Rezeptor und den rCRF₂-Rezeptoren wurde für alle getesteten Peptidanaloga erhalten (Tab. 5.2). Alle Peptidanaloga verlieren bei Einbau des VPIG-Motivs nahezu vollständig ihre Aktivität am rCRF₁-Rezeptor. Während der Einbau des VPIG-Motivs in Sauvagin an beiden rCRF₂-Spleißvarianten äquipotente Werte lieferte, wie auch beim nativen Sauvagin (Vgl. Tab. 4.6), wurde bei VPIG(10-13)-Urotensin I, VPIG(10-13)-r/hCRF und VPIG(9-12)-Urocortin I

eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve erhalten, die zu weniger potenten Peptiden im HTS-Bioassay führte.

Tabelle 5.2: Potenzen von Peptidanaloga der CRF/Urocortin Peptidfamilie für die Stimulierung der Ca²⁺-induzierten Fluoreszenz an HEK 293-Zellen mit stabil koexprimierten rCRF-Rezeptoren und Ca²⁺-sensitiven Ionenkanal. Die Daten geben den Mittelwert aus den pEC₅₀-Werten ± SEM mit (n) als die Anzahl unabhängiger Experimente und die daraus resultierenden EC₅₀-Werte, in Zweifachbestimmungen ermittelt, wieder.

Peptid	rCRF ₁ -Rezeptor EC ₅₀ (nM)	rCRF _{2a} -Rezeptor EC ₅₀ (nM)	rCRF _{2b} -Rezeptor EC ₅₀ (nM)
VPIG(9-12)-Sauvagin	136 6,87 ± 0,01 (2)	0,39 9,41 ± 0,03 (2)	0,27 9,59 ± 0,15 (2)
VPIG(10-13)-Urotensin I	> 300 (2)	100,6 7,00 ± 0,03 (2)	51,31 7,33 ± 0,28 (2)
VPIG(10-13)-r/hCRF	> 1000 (2)	109,5 6,96 ± 0,02 (2)	105,2 6,98 ± 0,01 (2)
VPIG(9-12)-Urocortin I	> 1000 (2)	47,2 7,42 ± 0,41 (2)	15,3 7,82 ± 0,13 (2)

Die Veränderung der Primärstruktur im Sauvagin wirkte sich im Vergleich zu den anderen Peptidanaloga am stärksten auf die CRF-Rezeptorselektivität aus: während VPIG(9-12)-Sauvagin am rCRF₂-Rezeptor ein Agonist mit hoher Potenz war, und daher auch eine hohe rCRF₂-Rezeptorselektivität zeigte, wurde für VPIG(10-13)-Urotensin I, VPIG(10-13)-r/hCRF und VPIG(9-12)-Urocortin I eine geringere Potenz am rCRF₂-Rezeptor und damit eine schwächere rCRF₂-Rezeptorselektivität erhalten. Dies deutet darauf hin, daß die untersuchten Peptide ein unterschiedliches Bindungsverhalten zur Bindungsseite an den CRF-Rezeptoren zeigen und die Selektivität auch von anderen Peptidsequenzen innerhalb der CRF/Urocortin Peptidfamilie bestimmt wird.

5.2.5 Die Rolle des VPIG-Motivs für die CRF-Rezeptorselektivität des Urocortin I

Da der Einbau des VPIG-Motivs in den Positionen 9 – 12 des Urocortin I von einem nicht selektiven zu einem selektiven Ligand für die rCRF₂-Rezeptoren führte (Kap. 5.2.4), sollten nun auf der Basis dieses Peptids anhand einer Peptidbibliothek B Strukturmerkmale individueller Aminosäureseitenketten dieser Tetrapeptidsequenz ermittelt und ihre Rolle für die CRF-Rezeptorsubtypselektivität untersucht werden. Darüber hinaus war es das Ziel dieser Struktur-Wirkungs-Untersuchungen, die Rezeptorselektivität weiter zu steigern. Alle 80 Peptide, über Spot-Synthese hergestellt (Kap. 2.1.1, 8.7), wurden im HTS-Bioassay an allen drei rCRF-Rezeptoren bei drei Konzentrationen (2 µM, 100 nM, 10 nM) getestet.

Das Ausgangspeptid der Bibliothek VPIG(9-12)-Urocortin I diente als interner Standard des Screenings, da es viermal unter den 80 zu testenden Peptiden vorkam (P18, P33, P48, P66). Alle vier Peptide lieferten identische und reproduzierbare Fluoreszenz-Signale. Um eine Aussage darüber zu erhalten, ob Liganden mit antagonistischer Wirkung vorliegen, wurde am Ende der Testung bei jedem Peptid Sauvagin in der Endkonzentration zugegeben, in der auch das Peptid getestet wurde. An allen drei rCRF-Rezeptoren erfolgte mit Sauvagin in Gegenwart der Peptide eine Stimulierung der Zellen. Somit handelte es sich bei allen 80 Peptiden um keinen Antagonisten. Der rCRF₁-Rezeptorsubtyp wurde durch diese Peptide nicht aktiviert. Nur 5 von 80 Analoga zeigten bei 10 nM Peptidkonzentration eine hohe Aktivität, die selektiv gegenüber den rCRF₂-Rezeptoren wirksam waren (Tab. 5.3, 5.4): dabei handelt es sich um die Struktur motive VPFG, VPLG, VPIF, VPII und VPIL. Somit konnte für Urocortin I ein wesentliches Motiv für eine CRF₂-Rezeptorselektivität von VPXX in den Positionen 9 – 12 erhalten werden, wobei P essentiell und mindestens ein X eine hydrophobe Aminosäureseitenkette ist.

Tabelle 5.3: Ca²⁺-induzierte Fluoreszenz-Signalintensitäten der Peptide P1 – P40 der VPIG(9-12)-Urocortin I-Peptidbibliothek an HEK 293-Zellen mit stabil koexprimierten rCRF-Rezeptoren und Ca²⁺-sensitiven Ionenkanal. Die Zellen wurden mit Peptidkonzentrationen von 2 µM, 100 und 10 nM stimuliert. +++, Signal großer Intensität ³, ++, Signal mittlerer Intensität ⁴, +, Signal kleiner Intensität ⁵, -, kein Fluoreszenz-Signal, jeweils zweifachbestimmt.

Peptid P	CRF ₁	CRF _{2a}	CRF _{2b}	CRF ₁	CRF _{2a}	CRF _{2b}	CRF ₁	CRF _{2a}	CRF _{2b}	Substitution			
	2 µM	2 µM	2 µM	100 nM	100 nM	100 nM	10 nM	10 nM	10 nM	V	P	I	G
1	-	++	+++	-	-	-	-	-	-	A			
2	-	+	+++	-	-	-	-	-	-	C			
3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	D			
4	-	-	+	-	-	-	-	-	-	E			
5	-	+	+++	-	+	++	-	-	-	F			
6	-	-	+	-	-	-	-	-	-	G			
7	-	-	+	-	-	-	-	-	-	H			
8	-	++	+++	-	-	+	-	-	-	I			
9	-	-	+	-	-	-	-	-	-	K			
10	-	++	+++	-	-	++	-	-	-	L			
11	-	+	++	-	-	-	-	-	-	M			
12	-	-	+	-	-	-	-	-	-	N			
13	-	-	+	-	-	-	-	-	-	P			
14	-	-	+	-	-	-	-	-	-	Q			
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R			
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S			
17	-	-	++	-	-	-	-	-	-	T			
18	-	++	+++	-	+	++	-	++	+++	V			
19	-	-	++	-	-	-	-	-	-	W			
20	-	+	+++	-	-	-	-	-	-	Y			

³ Signal großer Intensität: 40000 – 60000 RFE

⁴ Signal mittlerer Intensität: 20000 – 39999 RFE

⁵ Signal kleiner Intensität: < 19999 RFE

Fortsetzung Tabelle 5.3:

Peptid P	CRF ₁	CRF _{2a}	CRF _{2b}	CRF ₁	CRF _{2a}	CRF _{2b}	CRF ₁	CRF _{2a}	CRF _{2b}	Substitution			
	2 μM	2 μM	2 μM	100 nM	100 nM	100 nM	10 nM	10 nM	10 nM	V	P	I	G
21	-	+	+++	-	-	-	-	-	-				A
22	-	+	+++	-	-	-	-	-	-				C
23	-	++	+++	-	-	-	-	-	-				D
24	-	++	+++	-	-	+	-	-	-				E
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-				F
26	-	+	+++	-	-	-	-	-	-				G
27	-	+	+++	-	-	-	-	-	-				H
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-				I
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-				K
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-				L
31	-	+	+++	-	-	-	-	-	-				M
32	-	+	+++	-	-	-	-	-	-				N
33	-	++	+++	-	+	++	-	++	+++				P
34	++	+++	+++	-	-	+	-	-	-				Q
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-				R
36	-	+	+++	-	-	-	-	-	-				S
37	-	+	+++	-	-	-	-	-	-				T
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-				V
39	-	-	-	-	-	-	-	-	-				W
40	-	-	+	-	-	-	-	-	-				Y

Tabelle 5.4: Ca²⁺-induzierte Fluoreszenz-Signalintensitäten der Peptide P41 – P80 der VPIG(9-12)-Urocortin I-Peptidbibliothek an HEK 293-Zellen mit stabil koexprimierten rCRF-Rezeptoren und Ca²⁺-sensitiven Ionenkanal. Die Zellen wurden mit Peptidkonzentrationen von 2 μM, 100 und 10 nM stimuliert. +++, Signal großer Intensität, ++, Signal mittlerer Intensität, +, Signal kleiner Intensität, -, kein Fluoreszenz-Signal, jeweils zweifachbestimmt.

Peptid P	CRF ₁	CRF _{2a}	CRF _{2b}	CRF ₁	CRF _{2a}	CRF _{2b}	CRF ₁	CRF _{2a}	CRF _{2b}	Substitution			
	2 μM	2 μM	2 μM	100 nM	100 nM	100 nM	10 nM	10 nM	10 nM	V	P	I	G
41	-	++	+++	-	-	+	-	-	-				A
42	-	+	+++	-	-	-	-	-	-				C
43	-	-	++	-	-	-	-	-	-				D
44	-	-	+	-	-	-	-	-	-				E
45	-	++	+++	-	++	+++	-	++	+++				F
46	-	++	+++	-	-	-	-	-	-				G
47	-	++	+++	-	-	+	-	-	-				H
48	-	++	+++	-	+	++	-	++	+++				I
49	-	+++	+++	-	-	++	-	-	-				K
50	-	+++	+++	-	++	+++	-	++	+++				L
51	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-				M
52	-	++	+++	-	-	-	-	-	-				N
53	-	-	-	-	-	-	-	-	-				P
54	-	+++	+++	-	-	+	-	-	-				Q
55	-	-	-	-	-	-	-	-	-				R
56	-	++	+++	-	-	-	-	-	-				S
57	-	++	+++	-	+	++	-	-	-				T
58	-	++	+++	-	-	+	-	-	-				V
59	+	++	+++	-	+	+++	-	-	-				W
60	-	++	+++	-	+	+++	-	-	-				Y
61	-	++	+++	-	+	++	-	-	-				A
62	-	++	+++	-	-	++	-	-	-				C
63	-	++	+++	-	+	+	-	-	-				D
64	-	++	+++	-	+	+	-	-	-				E
65	-	++	+++	-	+	+	-	++	+++				F
66	-	++	+++	-	+	++	-	++	+++				G
67	-	++	+++	-	+	+	-	-	-				H
68	-	++	+++	-	+	+	-	++	+++				I
69	-	++	+++	-	+	+	-	-	-				K
70	-	++	+++	-	+	+	-	++	+++				L

Fortsetzung Tabelle 5.4:

Peptid P	CRF ₁	CRF _{2a}	CRF _{2b}	CRF ₁	CRF _{2a}	CRF _{2b}	CRF ₁	CRF _{2a}	CRF _{2b}	Substitution			
	2 μM	2 μM	2 μM	100 nM	100 nM	100 nM	10 nM	10 nM	10 nM	V	P	I	G
71	-	++	+++	-	+	+	-	-	-				M
72	-	++	+++	-	+	+	-	-	-				N
73	-	-	-	-	-	-	-	-	-				P
74	-	++	+++	-	+	+	-	+	++				Q
75	-	++	+++	-	+	+	-	-	-				R
76	-	++	+++	-	+	+	-	-	-				S
77	-	++	+++	-	+	+	-	-	-				T
78	-	++	+++	-	+	+	-	-	-				V
79	-	++	+++	-	+	+	-	-	+				W
80	-	++	+++	-	+	+	-	-	+				Y

Diese 5 Analoga wurden individuell durch SPPS hergestellt (Kap. 2.1.1) und nochmals im HTS-Bioassay durch Konzentrations-Wirkungskurven charakterisiert. Abb. 5.6 zeigt exemplarisch die Konzentrations-Wirkungskurven des Peptidliganden VPIF(9-12)-Urocortin I (P65) an allen drei rCRF-Rezeptoren. Es wurde eine klare Differenzierung zwischen den rCRF-Rezeptorsubtypen erzielt. Dieser Ligand agierte im funktionellen HTS-Bioassay hoch potent am rCRF_{2b}- (EC₅₀ 0,15 nM) und am rCRF_{2a}-Rezeptor (EC₅₀ 0,27 nM). Im Vergleich zum Stammpeptid VPIG(9-12)-Urocortin I (Tab. 5.2) war VPIF(9-12)-Urocortin I potenter und selektiver an beiden rCRF₂-Rezeptor-Spleißvarianten, obwohl eine geringe Potenz am rCRF₁-Rezeptor (EC₅₀ 20 nM) erhalten wurde. Dagegen zeigte VPIF(9-12)-Urocortin I eine mit VPIG(9-12)-Sauvagin vergleichbare Potenz an beiden rCRF₂-Rezeptoren, jedoch durch eine geringere Potenz am rCRF₁-Rezeptor (als VPIG(9-12)-Sauvagin) auch eine geringere rCRF₂-Rezeptorselektivität.

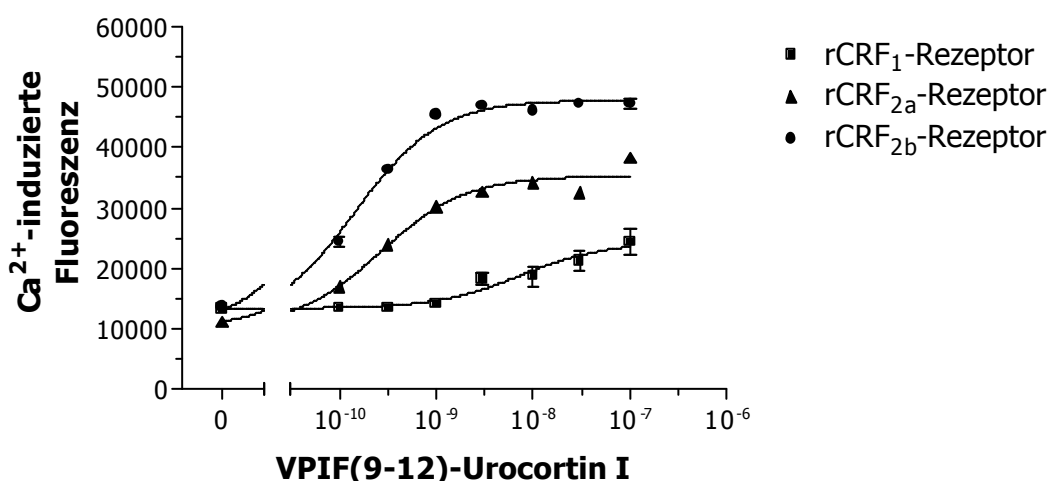


Abbildung 5.6: Konzentrations-Wirkungskurven von VPIF(9-12)-Urocortin I im HTS-Bioassay. Die Fluoreszenz-Änderung infolge des Ca²⁺-Einstroms wurde an HEK 293-Zellen mit stabil koexprimierten rCRF-Rezeptoren und Ca²⁺-sensitiven Ionenkanal untersucht und mittels FLIPR erfaßt. Jedes Peptid wurde zweifach bestimmt.

Die Konzentrations-Wirkungskurven des VPIF(9-12)-Urocortin I bestätigen für Urocortin I auch das VPIF als Selektivitätsmotiv für den rCRF₂-Rezeptor und damit auch die Richtigkeit des Screeningergebnisses der Peptidbibliothek. Aus dem Vergleich von VPIF(9-12)-Urocortin I, VPIG(9-12)-Urocortin I sowie VPIG(9-12)-Sauvagin kann geschlußfolgert werden, daß das Ursprungspeptid und damit auch andere Peptidomänen in der Sequenz die Tendenz für eine rCRF₂-Rezeptorselektivität mitbestimmen: VPIF in Urocortin I führt zu einem potenteren und rCRF₂-rezeptorselektiveren Agonisten im Vergleich zu VPIG in Urocortin I. Damit konnte mit VPIF(9-12)-Urocortin I die Rezeptorselektivität zum rCRF₂-Rezeptorsubtyp gesteigert werden. Jedoch war VPIF in Urocortin I nicht potenter, sondern äquipotent, zum potentesten und weniger selektiv, als der selektivste rCRF₂-Rezeptor-Agonist VPIG(9-12)-Sauvagin.

5.2.6 Die Rolle des VPIG-Motivs für die CRF-Rezeptorselektivität des Urocortin II

Ist das VPIG-Motiv im selektiven Urocortin II das entscheidende Selektivitätsmerkmal für die CRF₂-Rezeptorselektivität? Um diese Frage zu beantworten, wurde ausgehend vom Urocortin II eine Peptidbibliothek A hergestellt, wie unter Kap. 2.1.1 und 8.6 dargestellt, und unter identischen Bedingungen (Kap. 4.2.5) im HTS-Bioassay an allen drei rCRF-Rezeptoren getestet.

Abb. 5.7 stellt exemplarisch für die 8 Peptide P49 bis P56 der Urocortin II-Bibliothek den Kurvenverlauf während der Messung dar. Bei diesen Peptiden handelte es sich um die Peptide mit den Substitutionen in der 3. Position des VPIG-Motivs (Vgl. auch Tab. 5.6). Kommt es bei einer Konzentration von bspw. 10 nM Peptid zu einer Rezeptoraktivierung, öffnen sich die Ionenkanäle und Ca²⁺-Ionen aus dem extrazellulären Medium strömen in die Zellen ein. Die Änderung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration wird bei Anwesenheit eines Ca²⁺-sensitiven Fluorophors über die Zunahme der Fluoreszenz⁶ verfolgt. Dies ist besonders gut anhand der Spalten 5 und 6 am rCRF_{2b}-Rezeptor zu erkennen (Abb. 5.7).

Es konnten bei allen 8 getesteten Peptiden, die zweifachbestimmt wurden, stabile Fluoreszenz-Signale an allen drei rCRF-Rezeptoren erhalten werden. Keines der Peptide zeigte am

⁶ Die Zelllinien werden vor Beginn der Messung mit dem membranpermeablen Ca²⁺-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 AM inkubiert, der über die Zellmembran in das Cytoplasma diffundiert. In den Zellen hydrolysieren unspezifische Esterasen eine Estergruppe, so daß ohne AM-Ester der Farbstoff nicht mehr membranpermeabel ist und in den Zellen verbleibt.

rCRF₁-Rezeptor eine Aktivität (Spalte 1, 2). Während am rCRF_{2a}-Rezeptor für die Peptide P49, P50, P51, P54 und P56 flache Kurvenverläufe mit geringen Aktivitäten bestimmt wurden (Spalte 3, 4), konnten am rCRF_{2b}-Rezeptor für diese Peptide hohe Aktivitäten ermittelt werden (Spalte 5, 6). P52, P53 und P55 waren an beiden rCRF₂-Rezeptoren bei einer Konzentration von 10 nM Peptid nicht aktiv, während sie bei 100 nM noch Aktivität zeigten (Tab. 5.6).

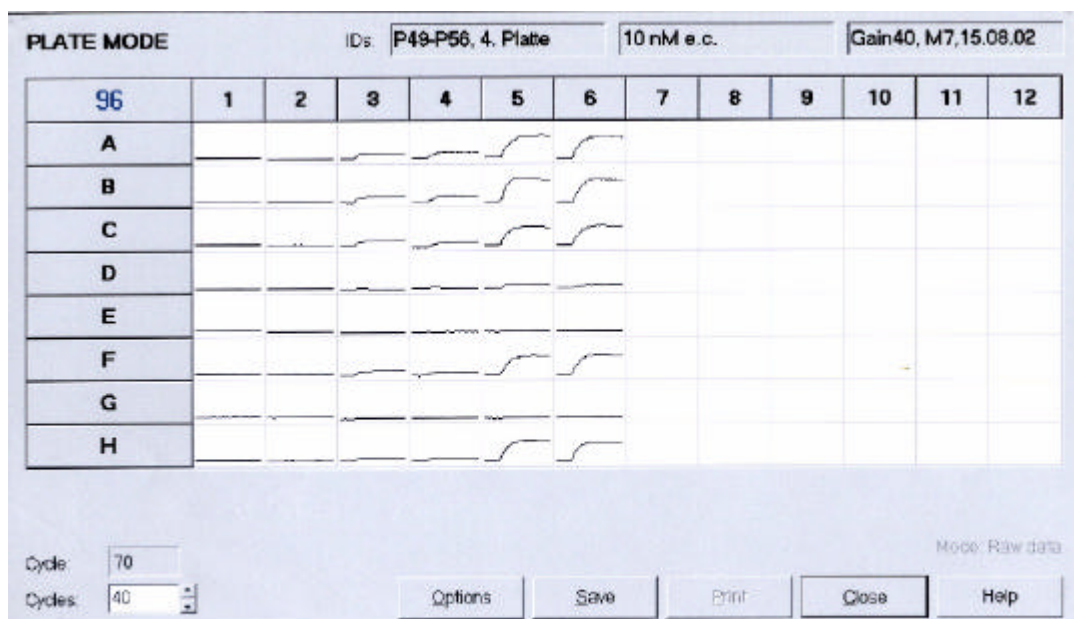


Abbildung 5.7: Kinetik des intrazellulären Ca²⁺-Einstroms unter Einwirkung von Peptiden der Urocortin II-Peptidbibliothek auf HEK 293-Zellen mit stabil koexprimierten rCRF-Rezeptoren und Ca²⁺-sensitiven Ionenkanal. Spalte 1, 2: rCRF₁-Rezeptor, Spalte 3, 4: rCRF_{2a}-Rezeptor, Spalte 5,6: rCRF_{2b}-Rezeptor; Reihe A-H: P49 – P56. Die Peptidliganden wurden in einer Zweifachbestimmung bei 10 nM getestet.

Mit Urocortin II als internem Standard des Screenings (P18, P33, P48, P66) wurden reproduzierbare Signale erzielt (Tab. 5.5, 5.6), wobei in Übereinstimmung mit der Literatur (Reyes et al., 2001) eine hohe Aktivität insbesondere am rCRF_{2b}-Rezeptor erzielt wurde, während am CRF₁-Rezeptorsubtyp keine Fluoreszenz-Änderung in den Zellen zu beobachten war. Da die abschließende Stimulierung der Zellen mit Sauvagin in Gegenwart der Peptide zu größer werdenden Fluoreszenz-Signalen führte, konnte eine antagonistische Wirkung dieser 80 Peptide ausgeschlossen werden. Obwohl das Ursprungspeptid Urocortin II CRF₂-selektiv ist, wurden für einige Peptide bei 2 µM Konzentration auch am rCRF₁-Rezeptor Fluoreszenz-Signale kleiner Intensität ermittelt.

Beim Screening wurden Fluoreszenz-Änderungen mittlerer und großer Intensität an beiden rCRF₂-Rezeptor-Spleißvarianten bei allen drei getesteten Peptidkonzentrationen (2 µM, 100 nM, 10 nM) erhalten. 57 von 80 Analoga zeigten bei einer Konzentration von 10 nM am rCRF₂-Rezeptor eine hohe Aktivität (insbesondere am rCRF_{2b}-Rezeptor), während bei 10 nM Peptid am rCRF₁-Rezeptor keine Aktivität erhalten wurde.

Tabelle 5.5: Ca²⁺-induzierte Fluoreszenz-Signalintensitäten⁷ der Peptide P1 – P40 der Urocortin II-Peptidbibliothek an HEK 293-Zellen mit stabil koexprimierten rCRF-Rezeptoren und Ca²⁺-sensitiven Ionenkanal. Die Zellen wurden mit Peptidkonzentrationen von 2 µM, 100 und 10 nM stimuliert. +++, Signal großer Intensität, ++, Signal mittlerer Intensität, +, Signal kleiner Intensität, -, kein Fluoreszenz-Signal, jeweils zweifachbestimmt.

Peptid P	CRF ₁	CRF _{2a}	CRF _{2b}	CRF ₁	CRF _{2a}	CRF _{2b}	CRF ₁	CRF _{2a}	CRF _{2b}	Substitution			
	2 µM	2 µM	2 µM	100 nM	100 nM	100 nM	10 nM	10 nM	10 nM	V	P	I	G
1	-	++	+++	-	++	+++	-	+	++	A			
2	-	++	++	-	+	+	-	-	+	C			
3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	D			
4	-	+	+	-	-	-	-	-	-	E			
5	-	++	+++	-	++	+++	-	+	++	F			
6	-	+	++	-	-	-	-	-	-	G			
7	-	+	++	-	-	+	-	-	-	H			
8	-	++	+++	-	++	+++	-	+	+++	I			
9	-	+	++	-	-	-	-	-	-	K			
10	+	++	+++	-	++	+++	-	+	+++	L			
11	+	++	+++	-	++	+++	-	+	++	M			
12	-	+	++	-	+	++	-	-	+	N			
13	-	+	+	-	-	-	-	-	-	P			
14	-	+	++	-	-	+	-	-	-	Q			
15	-	+	+	-	-	-	-	-	-	R			
16	-	+	++	-	-	+	-	-	-	S			
17	-	++	+++	-	++	+++	-	-	+	T			
18	-	++	+++	-	+++	+++	-	+	+++	V			
19	-	++	+++	-	++	+++	-	-	++	W			
20	-	++	+++	-	++	+++	-	-	++	Y			
21	-	++	+++	-	+++	+++	-	+	+++	A			
22	-	+	++	-	+	+	-	-	-	C			
23	-	++	+++	-	++	+++	-	-	+	D			
24	-	++	+++	-	++	+++	-	+	++	E			
25	-	+	++	-	+	+	-	-	-	F			
26	+	+	++	-	+	+	-	-	++	G			
27	-	+	++	-	+	+	-	-	+	H			
28	-	+	++	-	-	-	-	-	-	I			
29	-	+	++	-	-	-	-	-	-	K			
30	-	+	++	-	+	+	-	-	+	L			
31	-	+	++	-	+	+	-	-	++	M			
32	-	+	++	-	+	+	-	-	++	N			
33	-	++	+++	-	+++	+++	-	+	+++	P			
34	+	++	+++	-	+++	+++	-	+	++	Q			
35	-	++	+++	-	-	-	-	-	-	R			
36	+	++	+++	-	++	+++	-	+	++	S			
37	-	++	+++	-	++	+++	-	+	++	T			
38	-	+	+++	-	+	+++	-	-	+	V			
39	-	+	+++	-	-	+	-	-	-	W			
40	-	+	++	-	+	++	-	-	-	Y			

⁷ Vergleich Definition der Signalintensitäten Seite 94

Tabelle 5.6: Ca²⁺-induzierte Fluoreszenz-Signalintensitäten der Peptide P41 – P80 der Urocortin II-Peptidbibliothek an HEK 293-Zellen mit stabil koexprimierten rCRF-Rezeptoren und Ca²⁺-sensitiven Ionenkanal. Die Zellen wurden mit Peptidkonzentrationen von 2 µM, 100 und 10 nM stimuliert. +++, Signal großer Intensität, ++, Signal mittlerer Intensität, +, Signal kleiner Intensität, -, kein Fluoreszenz-Signal, jeweils zweifachbestimmt.

Peptid P	CRF ₁	CRF _{2a}	CRF _{2b}	CRF ₁	CRF _{2a}	CRF _{2b}	CRF ₁	CRF _{2a}	CRF _{2b}	Substitution			
	2 µM	2 µM	2 µM	100 nM	100 nM	100 nM	10 nM	10 nM	10 nM	V	P	I	G
41	-	++	+++	-	++	+++	-	+	+++			A	
42	-	++	+++	-	+	++	-	-	-			C	
43	-	++	+++	-	-	+	-	-	-			D	
44	-	++	+++	-	+	++	-	-	-			E	
45	+	++	+++	-	++	+++	-	+	+++			F	
46	-	++	+++	-	+++	+++	-	-	++			G	
47	-	++	+++	-	++	+++	-	+	+++			H	
48	-	++	+++	-	++	+++	-	+	+++			I	
49	-	++	+++	-	+++	+++	-	+	+++			K	
50	++	++	+++	-	+++	+++	-	+	+++			L	
51	+	++	+++	-	+++	+++	-	+	++			M	
52	-	++	+++	-	++	+++	-	-	-			N	
53	-	++	+++	-	+	++	-	-	-			P	
54	-	++	+++	-	+++	+++	-	+	++			Q	
55	-	++	+++	-	-	+	-	-	-			R	
56	-	++	+++	-	++	+++	-	+	++			S	
57	-	++	+++	-	+++	+++	-	+	+++			T	
58	-	++	+++	-	+++	+++	-	+	+++			V	
59	+	++	+++	-	+++	+++	-	-	++			W	
60	-	++	+++	-	+++	+++	-	+	+++			Y	
61	+	++	+++	-	+++	+++	-	+	+++			A	
62	-	++	+++	-	++	+++	-	-	++			C	
63	-	++	+++	-	++	+++	-	-	++			D	
64	+	++	+++	-	++	+++	-	+	+++			E	
65	+	++	+++	-	+++	+++	-	+	+++			F	
66	-	++	+++	-	++	+++	-	+	+++			G	
67	+	++	+++	-	+++	+++	-	+	+++			H	
68	+	++	+++	-	++	+++	-	+	+++			I	
69	-	++	+++	-	+++	+++	-	+	+++			K	
70	+	++	+++	-	+++	+++	-	+	+++			L	
71	+	++	+++	-	++	+++	-	+	+++			M	
72	-	++	+++	-	++	+++	-	+	++			N	
73	-	++	+++	-	++	+++	-	-	-			P	
74	+	++	+++	-	+++	+++	-	+	+++			Q	
75	-	++	+++	-	++	+++	-	+	+++			R	
76	-	++	+++	-	++	+++	-	+	+++			S	
77	+	++	+++	-	++	+++	-	+	+++			T	
78	+	++	+++	-	++	+++	-	+	+++			V	
79	-	++	+++	-	++	+++	-	+	+++			W	
80	+	++	+++	-	u	+++	-	+	+++			Y	

Da die Aktivitäten am CRF₂-Rezeptor bei 10 nM Peptidkonzentration nicht verloren gingen, führen demnach Einzelsubstitutionen im Urocortin II innerhalb der Tetrapeptidsequenz VPIG zu keinem Selektivitätsverlust am CRF₂-Rezeptor. Daraus kann außerdem geschlossen werden, daß VPIG im N-Terminus des Urocortin II kein spezifisches Erkennungsmotiv für die Selektivität am CRF₂-Rezeptor ist und demnach die CRF₂-Rezeptor-subtypselektivität durch andere Peptidomänen innerhalb des Peptids bestimmt sein muß. Die Peptide, die bei 2 µM eine Aktivität am rCRF₁-Rezeptor hatten, waren auch an den

rCRF₂-Rezeptoren aktiv, so daß hierbei keine Differenzierung zwischen den rCRF-Rezeptorsubtypen gewährleistet war.

Während vorrangig Einzelsubstitutionen in der ersten und zweiten Position des VPIG-Motivs im Urocortin II zu Agonisten mit geringerer Aktivität am rCRF_{2b}-Rezeptor führten (Tab. 5.5), ließen Substitutionen in der dritten und vierten Position die Aktivität am rCRF_{2b}-Rezeptor fast unberührt und damit auch die Selektivitätseigenschaften (Tab. 5.6). D. h. insbesondere polare Substitutionen in der V-Position, aber auch verschiedene Substitutionen in der PIG-Sequenz, führen zwar zu einem Wirkungsverlust an den rCRF₂-Rezeptoren, es wird aber keine Aktivität am rCRF₁-Rezeptor erzielt, so daß die Selektivität dieser modifizierten Urocortin II-Analoga durch Substitutionen im VPIG-Motiv nicht beeinflusst wird.

Um das Ergebnis aus dem Screening dieser Peptidbibliothek zu bekräftigen, daß die Tetrapeptidsequenz VPIG im Urocortin II nicht das prinzipielle Selektivitätsmotiv für die CRF₂-Rezeptorselektivität ist, wurden anhand der Peptidbibliothek drei Beispielpeptide ausgewählt, mittels SPPS synthetisiert (Kap. 2.1.1) und nochmals durch Konzentrations-Wirkungskurven im HTS-Bioassay (Kap. 2.4.3.1) eingehender untersucht. Weiterhin erfolgte auch ihre Charakterisierung im Adenylatcyclase Assay (Kap. 2.4.3.2) sowie im Bindungsassay (Kap. 2.4.2.2). Von den Peptiden mit hoher Aktivität am rCRF₂-Rezeptor wurden A(8)-Urocortin II (P21), H(9)-Urocortin II (P47) und D(10)-Urocortin II (P63) ausgewählt, so daß verschiedene Aminosäureseitenketten in unterschiedlichen Positionen innerhalb der Tetrapeptidsequenz VPIG(7-10) vorlagen.

Im HTS-Bioassay konnte gezeigt werden, daß der Ca²⁺-Einstrom in den Ionenkanal infolge Ligandbindung und Aktivierung beider rCRF₂-Rezeptoren gleichartig von allen drei Agonisten vermittelt wurde, während keines der drei Peptide am rCRF₁-Rezeptor eine spezifische Potenz zeigte (Abb. 5.8). Dies bestätigt das Screeningergebnis, nachdem große Signal-Intensitäten vor allem für den rCRF_{2b}-Rezeptor erhalten wurden. Dabei korreliert vermutlich die Höhe des Fluoreszenz-Signals mit der Rezeptorkapazität. Die Gleichförmigkeit der Konzentrations-Wirkungskurven von A(8)-Urocortin II, H(9)-Urocortin II und D(10)-Urocortin II zeigen demnach, daß die Art der Aminosäureseitenkette (hydrophob, A; basisch, H; sauer, D) in den Positionen 7 – 10 das Selektivitätsmotiv im Urocortin II nicht bestimmen. Keine der individuellen Aminosäureseitenkette innerhalb dieser Positionen im N-Terminus war essentiell für die hohe rCRF_{2(b)}-Rezeptorselektivität und -aktivität des Urocortin II.

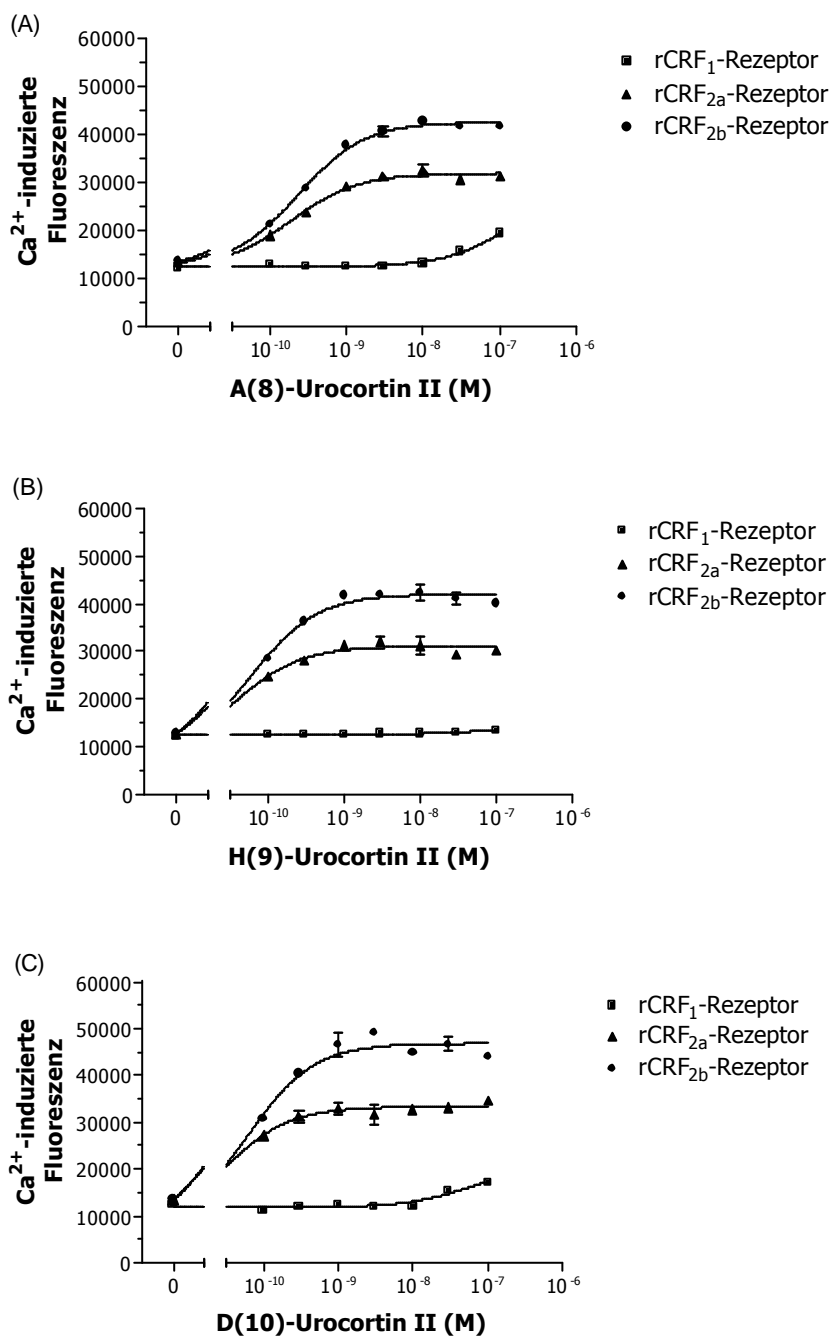


Abbildung 5.8: Konzentrations-Wirkungskurven von A(8)-Urocortin II (A), H(9)-Urocortin II (B) und D(10)-Urocortin II (C) im HTS-Bioassay. Die Fluoreszenz-Änderung infolge des Ca²⁺-Einstroms wurde an HEK 293-Zellen mit stabil koexprimierten rCRF-Rezeptoren und Ca²⁺-sensitiven Ionenkanal untersucht und mittels FLIPR erfaßt. Jedes Peptid wurde zweifachbestimmt.

Folgende Ergebnisse lassen sich aus den beiden funktionellen Assays in Kombination mit den Bindungsstudien für die drei rCRF₂-selektiven Peptide zusammenfassen (Tab. 5.7):

1. Eine Differenzierung zwischen dem rCRF₁-Rezeptor (keine Rezeptoraktivierung) im Vergleich zu den rCRF₂-Rezeptoren (hohe Rezeptoraktivierung) wurde realisiert.

2. Alle drei Peptidliganden lieferten in allen drei biochemischen Methoden, insbesondere in den Adenylatcyclase Assays und Bindungsassays, äquipotente Ergebnisse innerhalb einer rCRF₂-Rezeptor-Spleißvariante.
3. In Abhängigkeit von der Rezeptorkapazität wurden Bindungsaffinitäten sowie Potenzen erhalten, wobei an beiden rCRF₂-Rezeptoren das Verhältnis der Peptide zueinander vor allem hinsichtlich Bindungsverhalten und Adenylatcyclase-Bestimmung identisch wiedergegeben wurde.
4. Die Potenzen aus dem HTS-Bioassay konnten durch beide Sekundärassays bestätigt werden. Somit wurde einerseits nachgewiesen, daß die hohe Selektivität unabhängig von einer Aminosäureseitenkette im VPIG-Motiv im N-Terminus des Urocortin II ist. Andererseits bestätigten sie auch die Screeningergebnisse.

Tabelle 5.7: Potenzen und Affinitäten von A(8)-Urocortin II, H(9)-Urocortin II und D(10)-Urocortin II an den rCRF-Rezeptoren. Die Daten geben den Mittelwert aus den pEC₅₀- bzw. pK_d-Werten ± SEM mit (n) als die Anzahl unabhängiger Experimente und die daraus resultierenden EC₅₀- bzw. K_d-Werte, in Zweifachbestimmungen ermittelt, wieder.

Peptid HTS-Bioassay	rCRF ₁ -Rezeptor EC ₅₀ (nM)	rCRF _{2a} -Rezeptor EC ₅₀ (nM)	rCRF _{2b} -Rezeptor EC ₅₀ (nM)
A(8)-Urocortin II	> 1000 (2)	0,19 9,72 ± 0,01 (2)	0,24 9,63 ± 0,02 (2)
H(9)-Urocortin II	> 1000 (2)	0,04 10,44 ± 0,03 (2)	0,06 10,21 ± 0,02 (2)
D(10)-Urocortin II	> 1000 (2)	0,03 10,54 ± 0,02 (2)	0,06 10,19 ± 0,01 (2)
Peptid Adenylatcyclase Assay	rCRF ₁ -Rezeptor EC ₅₀ (nM)	rCRF _{2a} -Rezeptor EC ₅₀ (nM)	rCRF _{2b} -Rezeptor EC ₅₀ (nM)
A(8)-Urocortin II	> 345 (2)	14,62 7,97 ± 0,30 (2)	4,38 8,36 ± 0,00 (2)
H(9)-Urocortin II	> 607 (2)	6,73 8,17 ± 0,02 (2)	2,06 8,71 ± 0,11 (2)
D(10)-Urocortin II	> 460 (2)	19,4 7,98 ± 0,44 (2)	6,97 8,23 ± 0,27 (2)
Peptid Bindungsassay	rCRF ₁ -Rezeptor K _d (nM)	rCRF _{2a} -Rezeptor K _d (nM)	rCRF _{2b} -Rezeptor K _d (nM)
A(8)-Urocortin II	> 200 (2)	2,48 8,61 ± 0,04 (2)	11,88 7,93 ± 0,15 (2)
H(9)-Urocortin II	> 500 (2)	2,03 8,69 ± 0,01 (2)	10,27 7,99 ± 0,07 (2)
D(10)-Urocortin II	> 109 (2)	4,84 8,32 ± 0,03 (2)	25,92 7,59 ± 0,04 (2)

5.3 Schlußfolgerungen – Die CRF-Rezeptorsubtypselektivität der Liganden der CRF/Urocortin Peptidfamilie und selektive Agonisten für die CRF₂-Rezeptoren

Aussagen über die CRF-Rezeptorsubtypselektivität der CRF/Urocortin Peptidfamilie konnten mit Hilfe des Screening-Verfahrens zur Bestimmung der Rezeptoraktivierung über die Messung des Agonist-induzierten intrazellulären Calciumanstiegs gewonnen werden. Die entscheidende, in Kap. 4.3 ermittelte Differenzierung zwischen dem selektiven Urocortin II und dem nicht selektiven Urocortin I an beiden rCRF-Rezeptorsubtypen war eine Grundvoraussetzung für die weiteren Struktur-Wirkungs-Untersuchungen, insbesondere an den Peptidbibliotheken des VPIG(9-12)-Urocortin I sowie des Urocortin II.

Der Einbau des VPIG-Motivs aus dem N-Terminus des CRF₂-rezeptorselektiven Urocortin II in das nicht selektive Urocortin I führte zu dem potenten und selektiven Liganden VPIG(9-12)-Urocortin I (Kap. 5.2.4). Auch bei den nativen Liganden Urotensin I sowie r/hCRF ging die Potenz am rCRF₁-Rezeptor durch Einbau des VPIG-Motivs im N-Terminus verloren (Tab. 5.2).

Tabelle 5.8: Selektivitätsfaktoren (SF) von Peptidanaloga der CRF/Urocortin Peptidfamilie im HTS-Bioassay. Die Fluoreszenz-Änderung infolge des Ca²⁺-Einstroms wurde an HEK 293-Zellen mit stabil koexprimierten rCRF-Rezeptoren und Ca²⁺-sensitiven Ionenkanal untersucht und mittels FLIPR erfaßt.

Peptid	rCRF ₁ -/rCRF _{2a} -Rezeptor SF	rCRF ₁ -/rCRF _{2b} -Rezeptor SF
VPIG(9-12)-Savagin	349	503
VPIG(10-13)-Urotensin I	> 3	> 6
VPIG(10-13)-r/hCRF	> 9	> 65
VPIG(9-12)-Urocortin I	> 21	> 65
VPIF(9-12)-Urocortin I	74	133

Die veränderte Primärstruktur im Savagin (Vgl. Tab. 4.6, 5.2) hatte zur Folge, daß ein hoch potenter rCRF₂-rezeptorselektiver Agonist entwickelt wurde, bei dem die Differenzierung zwischen dem rCRF₁- und den CRF₂-Rezeptoren durch sehr hohe Selektivitätsfaktoren beschrieben werden konnte (Tab. 5.8): VPIG(9-12)-Savagin zeigt eine 350fache bzw. 503fache Selektivität für den rCRF₂-Rezeptor.

Die Auswertung der Urocortin II-Peptidbibliothek ergab, daß VPIG im selektiven Urocortin II kein spezifisches Erkennungsmotiv ist (Kap. 5.2.6). 71% der peptidischen

Liganden zeigten an beiden rCRF₂-Rezeptoren bei einer Konzentration von 10 nM Peptid hohe Aktivitäten. Dagegen konnte anhand der VPIG(9-12)-Urocortin I-Peptidbibliothek (Kap. 5.2.5) ein Selektivitätsmerkmal von VPXX in den Positionen 9 – 12 ermittelt werden, wobei Prolin essentiell war und es sich bei X um mindestens einen hydrophoben Aminosäureseitenkettenrest handelte. Exemplarisch für dieses essentielle Motiv war die Synthese mittels SPPS und Testung von VPIF(9-12)-Urocortin I, bei dem mit einem Selektivitätsfaktor von 74 bzw. 133 eine große Differenzierung zwischen den einzelnen rCRF-Rezeptorsubtypen erhalten wurde (Tab. 5.8).

Jahn et al. (2004) untersuchten den Einfluß des PIG-Motivs aus dem Urocortin II auf die Helizität sowie auf das Bindungsverhalten von Urocortin I und r/hCRF. Die Eigenschaft des Prolins, helikale Strukturen zu stören, wurde sowohl im Urocortin I als auch im r/hCRF gezeigt. Eine abnehmende α -Helizität, in CD-Studien ermittelt, ging bei beiden Peptiden mit einer abnehmenden Bindungsaffinität am rCRF₁-Rezeptor einher (Jahn et al., 2004). Um diesen helixstörenden Effekt des Prolins in dieser Arbeit zu untersuchen und ob eine einzelne Aminosäure in der Tetrapeptidsequenz das Selektivitätsmerkmal im Urocortin II bestimmt, wurde u. a. im Urocortin II in Position 8 Prolin gegen Alanin ausgetauscht. Die hohe Potenz und Selektivität (Tab. 5.7) des resultierenden A(8)-Urocortin II für die CRF₂-Rezeptoren zeigt eindeutig, daß der helixbrechende Effekt des Prolins für die Selektivität des Urocortin II nicht verantwortlich sein kann. Demzufolge müssen andere Wechselwirkungen mit dem CRF₂-Rezeptor für die Selektivität des Urocortin II verantwortlich sein.

Neben der Bedeutung des Prolins im N-Terminus wurde auch der Einfluß des Alanins im C-Terminus von Liganden der CRF/Urocortin Peptidfamilie auf die Selektivität beschrieben (Mazur et al., 2004). Das Prolin in Position 11 und das Alanin in Position 35 und 39 (ausgehend vom r/hCRF) führte bei den Peptiden CRF, Urocortin I und Sauvagin zu einer verringerten CRF₁-Rezeptor-Aktivität und zu einer gesteigerten Aktivität am CRF₂-Rezeptor (Mazur et al., 2004). Weiterhin wurde an Sauvagin-Analoga gezeigt, daß die Selektivität zum CRF₂-Rezeptor durch Phenylalanin, Leucin, Isoleucin, Threonin, Glutamin, Histidin und Tyrosin in der Position 12 verstärkt wurde, während Phenylalanin, Glutamin, Tryptophan, Tyrosin, Valin, Isoleucin, Leucin und 2-Naphthylalanin in Position 13 präferiert war (Isfort et al., 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem gezeigt, daß auch ein sequenzieller Austausch von nicht konservierten Sequenzen zwischen Urotensin I, einem äquipotenten Agonisten am CRF₁- und CRF₂-Rezeptor (Tab. 4.5, 4.6), und oCRF, das eine wesentlich geringere

Potenz am CRF₂-Rezeptor im Vergleich zum CRF₁-Rezeptor besitzt (Tab. 4.5, 4.6), keine selektiven Urotensin I-Analoga hervorbringt. Letztlich zeigt auch der Einbau des VPIG-Motivs in die Liganden der CRF/Urocortin Peptidfamilie einen sehr unterschiedlichen Effekt auf die Rezeptorselektivität: während im Urocortin II kein Effekt erhalten wurde, erfolgte eine starke Zunahme der Selektivität für Sauvagin, aber für Urotensin I, r/hCRF sowie Urocortin I ergab sich eine nur geringe Differenzierung verbunden mit einem großen Verlust an Potenz für beide CRF-Rezeptorsubtypen (Tab. 5.2., 5.8).

All diese Struktur-Wirkungs-Untersuchungen zeigen, daß die CRF-Rezeptorselektivität innerhalb der Liganden der CRF/Urocortin Peptidfamilie nicht einheitlich durch ein spezifisches Selektivitätsmerkmal beschrieben werden kann. Vielmehr handelt es sich bei den Peptidliganden um ein „komplexes Gebilde“, in denen spezifische Erkennungssequenzen sowohl im N- als auch im C-Terminus vorhanden sein müssen, die ihrerseits charakteristische Wechselwirkungen aufweisen und damit die Selektivität bestimmen. Es gibt keine von einem Liganden dieser Peptidfamilie auf alle anderen übertragbare Erkennungssequenzen in der Form sequenzieller Domänen, was wahrscheinlich auf ein unterschiedliches Bindungsverhalten für diese Liganden an den CRF-Rezeptoren zurückzuführen ist.