

## 6 Zusammenfassung

Selektive, CRF-rezeptorsubtypspezifische Liganden sind für die Untersuchung der biologischen Aktivität der CRF/Urocortin Peptidfamilie mit ihren Rezeptorsubtypen von großer Notwendigkeit, da diese für viele biologische Prozesse bedeutsam und in einer Vielzahl von neuropsychiatrischen, neurodegenerativen sowie gastrointestinalen Störungen involviert sind. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, durch Struktur-Wirkungs-Untersuchungen den Einfluß bestimmter Aminosäureseitenketten innerhalb der Liganden der CRF/Urocortin Peptidfamilie und ihre Bedeutung für eine CRF-Rezeptorsubtypselektivität zu zeigen, um letztlich rezeptorsubtypselektive Agonisten zu entwickeln.

Entsprechend der Zielsetzung gelang es, die cDNA beider CRF<sub>2</sub>-Rezeptor-Spleißvarianten aus Ratte (*Rattus norvegicus*) zu klonieren. Der rCRF<sub>1</sub>- und die beiden rCRF<sub>2</sub>-Rezeptoren wurden heterolog in HEK 293-Zellen transient und stabil exprimiert. Mit der Etablierung von Testsystemen, insbesondere stabil exprimierter CRF-Rezeptoren, wurde eine Grundlage für detaillierte Studien zur Signaltransduktion geschaffen.

Transient und stabil exprimierte rCRF<sub>1</sub>-Rezeptoren lieferten unter Anwendung des 1-Seiten-Bindungsmodells identische Affinitäten in Sättigungsbindungsassays mit Sauvagin, obwohl unterschiedliche Rezeptorkapazitäten bestimmt worden waren.

Das Bindungsverhalten ausgewählter Liganden der CRF/Urocortin Peptidfamilie an den heterolog exprimierten rCRF<sub>1</sub>- und rCRF<sub>2b</sub>-Rezeptoren korrelierte mit den relativen Bindungsaffinitäten, die an Rattenhirn- (rCRF<sub>1</sub>-Rezeptoren) und Mausherzmembranen (rCRF<sub>2b</sub>-Rezeptoren) vorlagen. Somit spiegeln die heterolog exprimierten rCRF-Rezeptorsysteme die nativen Systeme sehr gut wider.

Die heterolog exprimierten rCRF-Rezeptoren wurden außerdem unter Verwendung von oCRF, Sauvagin, Urotensin I, r/hCRF, Urocortin I und Urocortin II im Adenylatcyclase Assay und in einem HTS-Bioassay, in dem die Agonist-induzierte Änderung von intracellulärem Calcium gemessen wird, pharmakologisch charakterisiert. Eine eindeutige Differenzierung zwischen Urocortin I und Urocortin II an beiden rCRF-Rezeptoren wurde in beiden funktionellen Assays erhalten, so daß die Basis für die Struktur-Wirkungs-Untersuchungen gewährleistet war.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde durch Struktur-Wirkungs-Untersuchungen gefunden, daß einzelne Aminosäureseitenketten innerhalb der Liganden der CRF/Urocortin Peptidfamilie einen unterschiedlichen Einfluß auf die CRF-Rezeptorsubtypselektivität haben:

Der Austausch nicht konservierter Aminosäuren oder kurzer Peptidsequenzen (3 - 4 Aminosäuren) innerhalb der CRF/Urocortin Peptidfamilie zeigte, daß keine individuelle

Aminosäure bzw. Peptidomäne für die Selektivitätsunterschiede zwischen den untersuchten Liganden Sauvagin, Urotensin I und oCRF, sondern die Peptide in ihrer Gesamtsequenz für die Rezeptorselektivität verantwortlich sind.

Auf der Grundlage des 2-Domänen-Bindungsmodells für Liganden dieser Peptidfamilie wurden N- und C-terminale Rezeptorbindungsdomänen des  $\alpha$ -helikalen Modellpeptids UEK(1-40) (DDPPLSIDLTFHLLRTLLEIEKEEKEKKRKEQNRKLLDEV-NH<sub>2</sub>) über helikale Linker variabler Länge verbunden und erbrachten hoch potente Agonisten, ohne eine Rezeptorsubtypselektivität zu zeigen. Die Verbindung von N- und C-terminaler Peptidomäne durch einen hoch flexiblen  $\epsilon$ -Amino-capronsäurerest als Linker führte dagegen zu Agonisten mit geringer Potenz unabhängig von ihrer Linkerlänge, die keine rCRF<sub>1</sub>-/rCRF<sub>2</sub>-Rezeptorselektivität zeigten.

Angeregt durch die Entdeckung des CRF<sub>2</sub>-rezeptorselektiven Urocortin II wurde das Sequenzmotiv VPIG aus dem N-Terminus des Urocortin II in die korrespondierenden Positionen des nicht selektiven Urocortin I eingefügt. Aus dem nicht selektiven Urocortin I wurde ein selektiver Agonist am rCRF<sub>2</sub>-Rezeptor im HTS-Bioassay, der am rCRF<sub>1</sub>-Rezeptor keine agonistische Aktivität mehr zeigte. Das resultierende Peptid VPIG(9-12)-Urocortin I agierte mit 15 nM hoch potent am rCRF<sub>2b</sub>-Rezeptor. Die sich daraus ergebende Fragestellung, ob einzelne Aminosäuren dieser Tetrapeptidsequenz die Selektivität sowohl von VPIG(9-12)-Urocortin I als auch von Urocortin II bestimmen, führte zum Aufbau und zur Charakterisierung von zwei Peptidbibliotheken. Beide Bibliotheken mit jeweils 80 Liganden wurden durch Spot-Synthese an Cellulosemembranen synthetisiert. Die vier Aminosäuren innerhalb dieser Tetrapeptidsequenz im N-Terminus von Urocortin I und Urocortin II wurden jeweils durch eine andere der 20 proteinogenen Aminosäuren substituiert. Alle Liganden wurden im funktionellen HTS-Bioassay an allen drei CRF-Rezeptoren getestet. Ausgewählte Peptide wurden individuell durch SPPS hergestellt und ihre biologischen Aktivitäten in Adenylatcyclase Assays sowie in Bindungsstudien verifiziert.

Die Substitutionsanalyse jeder Position im VPIG-Motiv des VPIG(9-12)-Urocortin I ergab, daß nur 5 von 80 Peptidanaloga eine hohe Aktivität bei 10 nM Peptid im HTS-Bioassay zeigten. Diese fünf Analoga waren selektiv am rCRF<sub>2</sub>-Rezeptor wirksam. Das resultierende Motiv für eine CRF<sub>2</sub>-Rezeptorselektivität für Urocortin I ist demnach VPXX in den Positionen 9 - 12, wobei P essentiell und mindestens ein X eine hydrophobe Aminosäureseitenkette ist. Dagegen zeigte die korrespondierende Substitutionsanalyse des VPIG-Motivs im N-Terminus von Urocortin II überraschend, daß 57 von 80 Analoga dieser Peptidbibliothek im HTS-Bioassay selektiv am rCRF<sub>2</sub>-Rezeptor waren und bei einer

Peptidkonzentration von 10 nM eine hohe Aktivität hatten. Keine der individuellen Aminosäureseitenketten innerhalb dieses Motivs war essentiell für die hohe Rezeptorselektivität und -aktivität des Urocortin II am rCRF<sub>2</sub>-Rezeptor. Damit liegt die Selektivität des Urocortin II nicht im VPIG-Motiv begründet, und die CRF<sub>2</sub>-Rezeptorselektivität scheint prinzipiell durch andere Domänen im Urocortin II bestimmt zu sein. Somit konnte anhand dieser peptidischen Ligandbibliotheken demonstriert werden, daß die N-terminale Tetrapeptidsequenz in Urocortin I, aber nicht im Falle des Urocortin II, für die Ligand-Rezeptorsubtypselektivität verantwortlich ist.

Hingegen führte der Einbau des VPIG-Motivs in andere Vertreter der CRF/Urocortin Peptidfamilie zu einem verschiedenartigen Einfluß auf die biologische Potenz und Rezeptorselektivität. Während im HTS-Bioassay VPIG(9-12)-Sauvagin, VPIG(10-13)-Urotensin I und VPIG(10-13)-r/hCRF am rCRF<sub>1</sub>-Rezeptor nur noch eine sehr geringe Potenz zeigten, erwies sich VPIG(9-12)-Sauvagin am rCRF<sub>2</sub>-Rezeptor als Agonist mit hoher Potenz (EC<sub>50</sub> 0,3 nM) und daher hoher rCRF<sub>2</sub>-Rezeptorselektivität. Dagegen wurde mit VPIG(10-13)-Urotensin I sowie VPIG(10-13)-r/hCRF eine geringe Potenz am rCRF<sub>2</sub>-Rezeptor und damit eine schwächere rCRF<sub>2</sub>-Rezeptorselektivität erhalten. Diese Ergebnisse zeigen, daß das VPIG-Motiv kein prinzipielles Selektivitätsmotiv für diese Ligandfamilie darstellt. Deshalb ist darüber hinaus zu erwarten, daß die Selektivität auch von anderen Domänen innerhalb dieser Peptidfamilie bestimmt wird.

Insgesamt konnte gezeigt werden, daß durch Kombination aus leistungsfähiger Simultansynthese von Peptiden über Spot-Technologie und Durchführung eines zellulären HTS-Bioassays eine große Anzahl von Peptidliganden untersucht werden kann. Die Spot-Synthese gelingt selbst für Peptide mit einer Länge von 40 Aminosäuren und liefert quantitativ ausreichende Mengen an Analoga, deren im HTS-Bioassay ermittelten biologischen Aktivitäten im Adenylatcyclase Assay bestätigt werden konnten. Desweiteren erwies sich der HTS-Bioassay als hervorragend geeignet, um rationell und effizient das Screening einer großen Anzahl von Verbindungen zeitgleich an allen drei CRF-Rezeptoren zu gewährleisten. Mit VPIG(9-12)-Urocortin I und VPIG(9-12)-Sauvagin wurden zwei hoch potente und CRF<sub>2</sub>-rezeptorselektive Liganden entwickelt. Gleichzeitig weisen die Ergebnisse der Struktur-Wirkungs-Beziehungen nicht nur auf unterschiedliche Rezeptorbindungsdomänen der beiden Agonisten Urocortin I und Urocortin II am CRF<sub>2</sub>-Rezeptor hin, sondern machen auch deutlich, daß die verschiedenen Liganden der CRF/Urocortin Peptidfamilie offensichtlich unterschiedliche Bindungsmodi an den CRF-Rezeptoren haben.