

**Differentielle Struktur-Aktivitätsrelation der  
Guanylatzyklase-C aktivierenden Peptidhormone  
Guanylin und Uroguanylin**

Vom Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation  
von

Dipl.-Chem. Axel Schulz  
geboren am 14.04.1972 in Celle

2000

**Referent:** Prof. Dr. Hans-Martin R. Hoffmann

**Koreferent:** Prof. Dr. Wolf-Georg Forssmann

**Tag der Promotion:** 04. Februar 2000

**Datum der Veröffentlichung:** Februar 2000

*Meinen Eltern*

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Peptidsynthese des Niedersächsischen Institutes für Peptid-Forschung (IPF) in Hannover angefertigt. Deshalb möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Wolf-Georg Forssmann, dem wissenschaftlichen Direktor des Institutes, für die Überlassung des Themas, die sehr guten Arbeitsbedingungen und die großzügige Unterstützung bedanken.

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Dr. Knut Adermann, den Leiter der Abteilung Peptidsynthese, für die umfassende, freundschaftliche Betreuung und Unterstützung bei der Realisierung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Hans-Martin R. Hoffmann, Fachbereich Organische Chemie der Universität Hannover, möchte ich für die Betreuung und freundliche Unterstützung dieser Arbeit danken.

Frau Dr. Ute C. Marx, Lehrstuhl für Chemie und Struktur der Biopolymere der Universität Bayreuth, möchte ich für die Durchführung der Kernresonanzspektroskopie sowie für die unkomplizierte Zusammenarbeit mit vielen fachlichen Diskussionen danken.

Herrn Dr. Yuji Hidaka, Institute for Protein Research, Osaka University, Japan, möchte ich für die Durchführung der GC-C-Bindungsassays und die vielen fachlichen Diskussionen danken.

Den Mitarbeitern der Abteilung Peptidsynthese (Sylvia Escher, Enno Klüver, Andreas Zgraja und Alexander Krause) möchte ich für das stets angenehme Betriebsklima und die zahlreichen Unterstützungen im Laboralltag danken.

Ich danke Frau Edda Kock, Frau Dr. Silke Martin, Frau Antonietta Gasperina und Herrn Urs Egner für die Hilfe bei der Durchführung der cGMP-Bioassays und der Zellkultur.

Bei den Mitarbeitern der Abteilung Analytische Peptid-Chemie möchte ich mich für die große Unterstützung bei der Durchführung der analytischen Untersuchungen bedanken.

Bei den Kollegiaten und Betreuern des Graduiertenkollegs "Charakterisierung von regulatorischen Peptiden und ihrer Zielproteine" möchte ich mich für die stets anregenden Seminarveranstaltungen und Tagungen auf Gut Sunder bedanken.

Ich möchte meiner Familie danken, ohne deren Unterstützung das Studium nicht möglich gewesen wäre.

## **Abkürzungen**

2-PrOH	Isopropanol
Acm	Acetamidomethyl
ASA	Aminosäureanalyse
CD	Circulardichroismus
cDNA	copy (komplementäre) DNA
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel
cGKII	cGMP-abhängige Proteinkinase II
cGMP	zyklisches 3',5'-Guanosinmonophosphat
COSY	correlated spectroscopy
Cys	Cystein
Cys <sub>2</sub>	Cystin
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
DIPEA	N,N'-Diisopropylethylamin
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium
DTT	Dithiothreitol
EDT	Ethandithiol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ES-MS	Elektrospray-Massenspektrometrie
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
GC	Guanylatzyklase
GnHCl	Guanidiniumhydrochlorid
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HOAc	Essigsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
Lys-C	Endoprotease Lys-C
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time-of-flight
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidinon
NMR	kernmagnetische Resonanz
NOESY	2-D Nuclear Overhauser enhanced spectroscopy

OtBu	tert-Butylester
PBS	phosphate buffered saline
PITC	Phenylisothiocyanat
PTH	Phenylthiohydantoin
QSAR	quantitative Struktur-Aktivitäts-Relation
RIA	Radioimmunoassay
RP-HPLC	reversed phase-high performance liquid chromatography
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPPS	Festphasenpeptidsynthese
ST	hitzestabiles Enterotoxin
TBME	tert-Butylmethylether
TBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat
tBu	tert-Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
TOCSY	total correlation spectroscopy
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
Trt	Tryl
WT	Wildtyp

### Aminosäuren

Alanin	Ala	A	Histidin	His	H	Serin	Ser	S
Arginin	Arg	R	Isoleucin	Ile	I	Threonin	Thr	T
Asparagin	Asn	N	Leucin	Leu	L	Tryptophan	Trp	W
Cystein	Cys	C	Lysin	Lys	K	Tyrosin	Tyr	Y
Glutaminsäure	Glu	E	Methionin	Met	M	Valin	Val	V
Glutamin	Gln	Q	Phenylalanin	Phe	F			
Glycin	Gly	G	Prolin	Pro	P			

<b>1. Abstract</b> .....	1
<b>2. Einleitung</b> .....	2
2.1 Funktion des Gastrointestinaltraktes .....	2
2.2 Bakteriell verursachte, sekretorische Diarrhöe .....	3
2.3 Hitzestabile Enterotoxine (ST).....	5
2.4 Der Rezeptor Guanylatzyklase-C (GC-C).....	6
2.5 Endogene Liganden der Guanylatzyklase-C .....	8
2.5.1 Entdeckung von Guanylin .....	8
2.5.2 Entdeckung von Uroguanylin.....	10
2.6 Die topologische Isomerie von Guanylin und Uroguanylin .....	12
2.7 Differentielle Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Peptidhormonen.....	15
<b>3. Problemstellung</b> .....	18
<b>4. Material &amp; Methoden</b> .....	19
4.1 Peptidsynthesen.....	19
4.1.1 Festphasensynthese von Guanylin- und Uroguanylin-Derivaten .....	20
4.1.2 Luftoxidation zur Bildung monozyklischer Peptide.....	21
4.1.3 Iodoxidation monozyklischer, Cys(Acm)-geschützter Peptide .....	21
4.1.4 Isolierung von Proguanylin aus Hämofiltrat .....	22
4.1.5 Essigsäurespaltung von Proguanylin.....	22
4.1.6 Reduktion und oxidative Faltung von Guanylin und Proguanylin .....	22
4.1.7 Enzymatische Darstellung von Guanylin-(53-115).....	23
4.2 Analytische Methoden .....	23
4.2.1 Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) .....	23
4.2.2 Elektrospray-Quadrupol-Massenspektrometrie.....	24
4.2.3 MALDI-TOF-Massenspektrometrie .....	24
4.2.4 Chymotrypsin-Spaltung von bizyklischen Guanylin-Disulfidisomeren.....	25
4.2.5 Kapillarzonenoelektrophorese (CZE).....	25
4.2.6 Gelelektrophorese .....	25
4.2.7 Aminosäureanalyse (ASA).....	25
4.2.8 Aminosäuresequenzanalyse.....	26
4.2.9 Größenausschluß-Chromatographie (SEC).....	26
4.2.10 Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR).....	27
4.2.11 Circular dichroismus (CD).....	27
4.2.12 cGMP-Bioassay.....	27

4.2.13 Rezeptorbindungsstudien .....	28
<b>5. Ergebnisse</b> .....	29
5.1 Peptidsynthesen.....	29
5.1.1 Synthese von Guanylin-Derivaten.....	29
5.1.2 Synthese von Uroguanylin-Derivaten .....	33
5.1.3 Synthese von chimere GC-C-Liganden.....	37
5.2 Topologische Isomerie der synthetischen Peptide .....	38
5.3 Die biologische Aktivität synthetischer Guanyline und Uroguanyline .....	46
5.3.1 Die biologische Aktivität von Guanylin-(100-115) der Ratte .....	47
5.3.2 Biologische Aktivität der L-Alaninscanderivate des Guanylins.....	48
5.3.3 Biologische Aktivität der L-Alaninscanderivate des Uroguanylins .....	50
5.3.4 Biologische Aktivität chimerer Peptide von Guanylin, Uroguanylin und STa.....	52
5.4 Untersuchungen zur Funktion der Prosequenz von Guanylin .....	55
5.4.1 Stabilität von Proguanylin .....	55
5.4.3 Strukturelle Untersuchungen von Proguanylin.....	61
<b>6. Diskussion</b> .....	65
Ist Guanylin-(101-115) ein natürliches, zirkulierendes Peptid?.....	65
Bedeutung der Prosequenz von Guanylin für die <i>in vitro</i> -Faltung.....	66
Strukturelle Charakteristika von Proguanylin .....	67
Synthesen von Guanylin- und Uroguanylin-Derivaten .....	68
Topologische Stereoisomerie von Guanylin- und Uroguanylin-Peptiden .....	69
Struktur-Aktivitäts-Relation von GC-C-aktivierenden Peptiden .....	73
<b>7. Zusammenfassung</b> .....	78
<b>8. Literaturverzeichnis</b> .....	80



## 1. Abstract

The endogenous peptide hormones guanylin and uroguanylin are ligands of the intestinal membrane-bound receptor guanylyl cyclase C (GC-C) that is involved in the regulation of epithelial water and electrolyte transport. Interaction of GC-C with bacterial enterotoxins (ST) causes acute secretory diarrhoea in humans and domestic animals. Guanylin and uroguanylin are small peptides that contain two disulfide bonds with a 1-3/2-4 connectivity, which are crucial for GC-C activation.

To obtain information concerning critical amino acid side chains for receptor interaction, L-alanine scans of guanylin and uroguanylin were performed. The synthetic peptides were assembled by Fmoc solid-phase chemistry. The disulfide bonds were introduced using Trt/Acm protection groups for the cysteines. For guanylin and uroguanylin, side chains of Gly<sup>114</sup>, Tyr<sup>109</sup>, Ile<sup>106</sup> and of Gly<sup>110</sup>, Asn<sup>105</sup> and Leu<sup>102</sup>, respectively, were identified as crucial for GC-C activation and binding. These data along with the known three-dimensional structure of the peptides allow the definition of a pharmacophoric template to design GC-C antagonists.

Guanylin and uroguanylin occur as a pair of topological stereoisomers. While guanylin topoisomers are rapidly interconverting, uroguanylin stereoisomers are of considerably greater stability. To determine the important amino acid residues influencing the interconversion of guanylin and uroguanylin stereoisomers, L-alanine-substituted peptides were compared to the wild-type peptides by chromatography. It appears that the conformational conversion is predominantly under the control of the C-terminal sterical hindrance, thus providing a model for this unique interconversion.

Guanylin is mainly secreted as the prohormone of 94 amino acid residues. In this study, we show that the originally isolated 15-residue guanylin, representing the COOH-terminal part of the prohormone is released from the prohormone by chemical cleavage of an Asp-Pro amide bond under conditions applied during the isolation procedure. Thus, the 15-residue guanylin is probably not a native GC-C ligand. In addition, it was found that the reduced precursor of the small C-terminal bioactive guanylin does not form the disulfide bonds necessary for GC-C activation. In contrast, refolding of reduced proguanylin almost exclusively generates this disulfide bond pattern. It is thus concluded that the prosequence of proguanylin contributes as an intramolecular chaperone facilitating the correct folding. Structural studies using NMR-spectroscopy show a close proximity of the N- and C-terminal regions of proguanylin. It appears that this interaction is important for the formation of the correctly folded protein. Moreover it provides an explanation for the minor GC-C activity of proguanylin by shielding the bioactive C-terminal domain from the receptor.

**Keywords:** guanylyl cyclase C, peptides, structure-activity-relationship

## 2. Einleitung

### 2.1 Funktion des Gastrointestinaltraktes

Der Gastrointestinaltrakt höherer Organismen hat eine essentielle Bedeutung für die Aufrechterhaltung sämtlicher Lebensfunktionen. Er dient der Überführung der aufgenommenen Nahrung in resorbierbare Bestandteile und deren anschließende Aufnahme in den Körper. Diese Vorgänge werden durch mechanische Prozesse wie das Zerkleinern, die Durchmischung und den Transport der Nahrung eingeleitet und durch Zugabe von Verdauungssäften mit ihren enthaltenen Enzymen fortgesetzt. Die Enzyme spalten Kohlenhydrate, Fette und Eiweiße hydrolytisch in resorbierbare Bestandteile. Die Verdauungsprodukte werden aus dem Darmlumen über die Darmschleimhaut in das Blut oder die Lymphe aufgenommen. Das Darmepithel grenzt die funktionelle Außenseite des Körpers zum Darmlumen ab; seine beiden Hauptfunktionen sind Barrierefunktion und Transport [1].

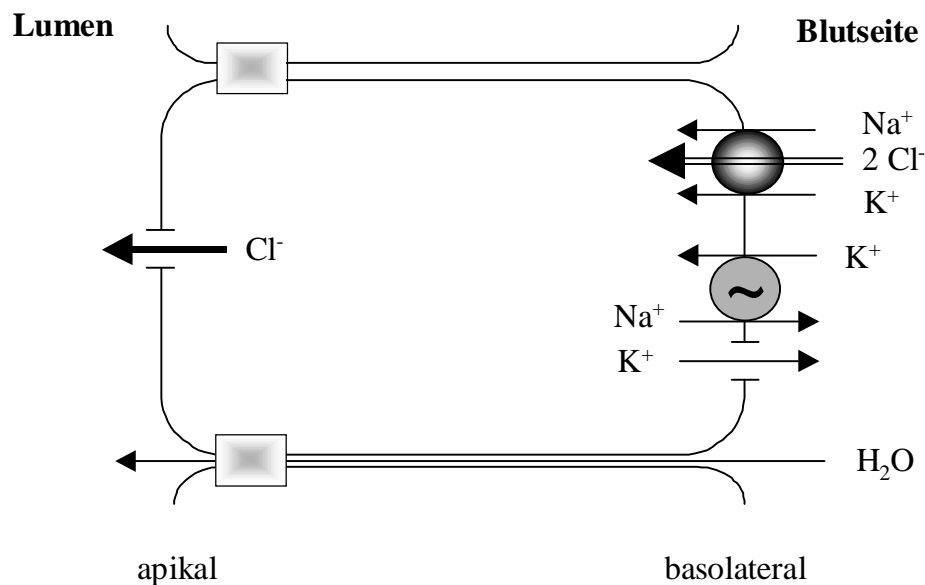
Der Magen dient hauptsächlich der Ansammlung der Nahrung, ihrer Verwandlung in einen viskosen Nahrungsbrei (Chymus), der Hydrolyse von Proteinen und der Emulgation von Fetten. Der hierzu erforderliche niedrige pH-Wert des Magensaftes wird durch Salzsäurebildung in den Belegzellen der Magenschleimhaut erzeugt.

Neben der Beendigung sämtlicher Verdauungsprozesse besteht die wesentliche Aufgabe des Darms in der Resorption von Wasser und seiner gelösten Bestandteile sowie der Verdauung hervorgegangener Aminosäuren, Monosaccharide, Fettsäuren und Glyceride. Resorbierende Zellen befinden sich dabei im superficialen Epithel der Mucosa, während die sekretorischen Zellen in den unverzweigten tubulären Lieberkühnschen Drüsen (Krypten, *Glandulae intestinales*) lokalisiert sind.

Die Resorption von Wasser, Elektrolyten, Vitaminen und Verdauungsendprodukten findet hauptsächlich im Dünndarm statt. Dieser ist gegliedert in Duodenum, Jejunum und Ileum. Im Jejunum und Ileum wird der meiste Teil der gastrointestinalen Flüssigkeitsmenge resorbiert. Um dies zu gewährleisten, besitzt die Mucosa des Dünndarms bestimmte strukturelle Besonderheiten (Kerckrinsche Falten, Dünndarmzotten, Mikrovilli), wodurch die gesamte resorbierende Oberfläche des Dünndarms mehr als 100 m<sup>2</sup> beträgt.

Die Sekretion von Wasser und NaCl in das Dünndarmlumen wird durch die primäraktive  $3\text{Na}^+-2\text{K}^+$ -ATPase der in den Dünndarmkrypten befindlichen Hauptzellen bewirkt (Abbildung 1). Diese löst eine sekundäraktive Aufnahme von Chlorid aus dem Interstitium

mit Hilfe basolateral lokalisierter  $\text{Na}^+$ - $2\text{Cl}^-$ - $\text{K}^+$ -Cotransporter aus. Das aufgenommene Chlorid wird entlang eines Konzentrationsgefälles durch in der apikalen Membran befindliche Chloridkanäle in das Lumen abgegeben. Wasser und Natriumionen folgen passiv auf parazellulärem Weg. Auch bei der  $\text{Na}^+$ -Resorption stellt die  $3\text{Na}^+$ - $2\text{K}^+$ -ATPase die primäre Pumpe dar. Sie befördert an den basolateralen Membranen Natriumionen aus resorbierenden Zellen des Oberflächenepithels. Durch bestimmte Kanäle können nun Natriumionen wieder entlang eines Konzentrationsgefälles aus dem Darmlumen in die Zelle gelangen. Verschiedene  $\text{Na}^+$ -Substrat-Cotransportsysteme ermöglichen dabei die gekoppelte Aufnahme von Monosacchariden, Aminosäuren, Fettsäuren und anderen Molekülen [1].



**Abbildung 1:** Schema der Sekretionsvorgänge am Darmepithel. Erläuterungen im Text.

## 2.2 Bakteriell verursachte, sekretorische Diarrhöe

Der menschliche Darm wird kurz nach der Geburt von einer Vielzahl, größtenteils strikt anaerober Bakterien besiedelt. Diese bilden die sogenannte Darmflora [1]. Es wurden bisher etwa 400-500 in der Darmflora vorkommende Bakterienarten identifiziert. Den größten Teil dieser Bakterien bilden die Gattungen *Bacterioides* und *Eubacterium*. Danach folgen die Gattungen *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Clostridium* und *Lactobacillus*. Das Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* ist dagegen nur mit weniger als

1% der gesamten Keime in der Darmflora vertreten [2]. In der Regel üben die genannten Bakterien keine pathologischen Effekte auf den Menschen aus, sondern interagieren bezüglich der Aufrechterhaltung wichtiger protektiver und physiologischer Prozesse in positiver Weise mit ihm. In diesem Zusammenhang seien nur die Stimulation des Immunsystems zur Antikörperbildung und die Abwehr verschiedener potentiell pathogener Bakterien genannt. Weiterhin sind die Bakterien der Darmflora entscheidend an der Verdauung von Peptiden sowie am Metabolismus von Gallensäuren und Steroiden beteiligt.

Im Gegensatz zu den natürlich in der Darmflora vorkommenden Bakterien können verschiedene Keime und Viren, die etwa unter unhygienischen Bedingungen aufgenommen werden, im Darm starke pathologische Effekte auf den Menschen ausüben. Dabei sei im Rahmen dieser Arbeit nur die Entstehung schwerer sekretorischer Diarrhöen genannt, die weltweit immer noch die häufigste Todesursache bei Kindern darstellt [3, 4].

Die Enterotoxine werden in Abhängigkeit ihrer Temperaturempfindlichkeit in zwei Klassen unterteilt: Hitzestabile (ST = heat-stable toxin) und hitzelabile Enterotoxine. Die hitzelabilen Enterotoxine aus *E. coli* binden mit einer Untereinheit an Monosialoganglioside in der Plasmamembran. Die andere Untereinheit wird daraufhin in die Zelle internalisiert, wo sie Neurotransmitter freisetzt, die die Chloridsekretion auf einem cAMP-abhängigen Weg stimulieren [5].

Die Verursachung sekretorischer Diarrhöe auf bakterieller Ebene wird durch peptiderge Enterotoxine, die von den Mikroorganismen in das Darmlumen sezerniert werden, hervorgerufen. Die hitzestabilen Enterotoxine binden an spezifische membrangebundene Rezeptoren im intestinalen Epithel und lösen über intrazelluläre *second messenger*-Systeme eine Stimulierung der Chloridsekretion und eine Hemmung der Natrium-Chlorid-Resorption aus. Dieses führt zu einem passiven Wasserausstrom in das Darmlumen, was sich in wässrigen Durchfällen äußert [6]. Der dabei auftretende Verlust an Flüssigkeit und Elektrolyten kann so hoch sein, daß er vor allem bei Säuglingen und Kleinkindern häufig zum Tode führt [5].

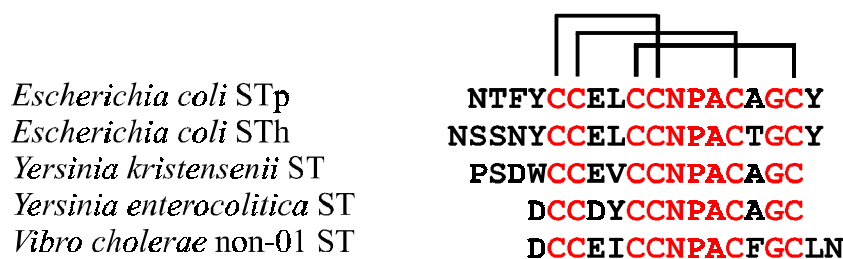
Durch die infektiöse Diarrhöe sterben weltweit jährlich mehr als 5 Millionen Menschen, wobei die meisten Todesfälle in Entwicklungsländern bei Kleinkindern unter einem Jahr auftreten [3, 6]. Neuere Daten sprechen global von insgesamt 1-1,8 Milliarden Diarrhöen pro Jahr [7, 8]. Etwa 50 Millionen Touristen bereisen jährlich die potentiell gefährdeten Regionen, wobei statistisch jeder sechste Tourist an einer sekretorischen Diarrhöe erkrankt. In etwa 80% der auftretenden Reisediarrhöen ist die Krankheit auf ein infektiöses Agens

zurückzuführen. Davon sind enterotoxigene *Escherichia coli*-Stämme für etwa 50% der Fälle verantwortlich [9, 10].

### 2.3 Hitzestabile Enterotoxine (ST)

Die hitzestabilen Enterotoxine aus *E. coli* agieren mit einer membranständigen intestinalen Guanylatzyklase, welche im Gegensatz zum Rezeptor des Cholera-Toxins ihre sekretorische Wirkung über den *second messenger* cGMP vermittelt [11]. Schulz und Mitarbeitern gelang die Klonierung und Charakterisierung des ST-Rezeptors der Ratte. Sie beschrieben den Rezeptor als eine Isoform der Guanylatzyklase und nannten ihn Guanylatzyklase-C (GC-C, siehe 2.4) [12].

Die von *E. coli* gebildeten hitzestabilen Enterotoxine (STa) sind kleine Peptide mit einer am C-Terminus sehr hoch konservierten Aminosäuresequenz (Abbildung 2). Die sechs Cysteinreste sind zu 3 Disulfidbrücken in einer 1-4/2-5/3-6 Anordnung verknüpft, die für die Aktivität des Toxins essentiell ist [13].



**Abbildung 2:** Vergleich der C-terminalen Aminosäuresequenzen hitzestabiler Enterotoxine des STa-Typs. Identische Aminosäuren sind rot dargestellt. Die für die biologische Aktivität erforderlichen Disulfidbrücken sind mit Strichen eingezeichnet.

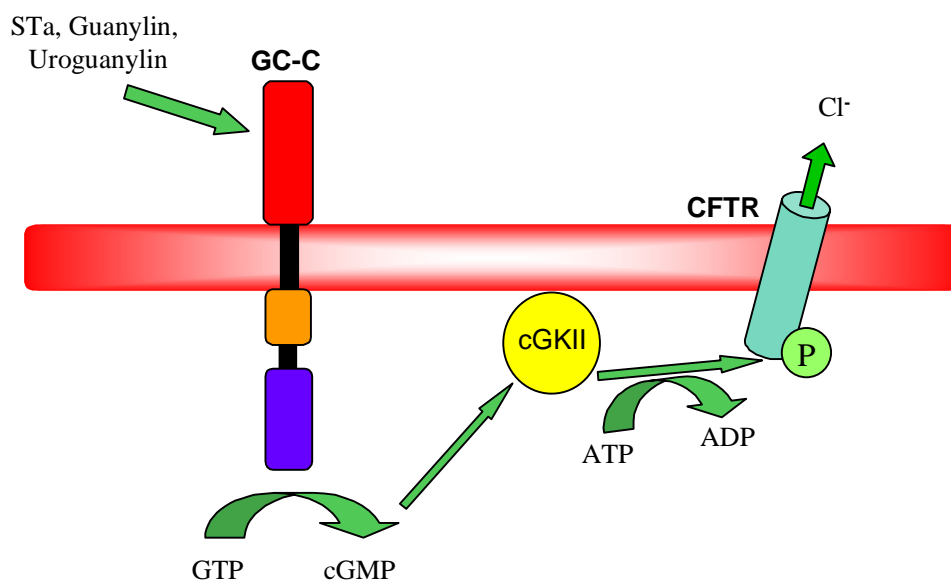
Durch die hohe Anzahl von sechs Cysteinen in einem Bereich von 13 Aminosäuren ist das STa durch eine sehr starre dreidimensionale Struktur gekennzeichnet, die für die hohe Hitze- und pH-Stabilität verantwortlich gemacht wird [14]. Die kleinste, voll biologisch aktive Einheit von STa ist ein aus 13 Aminosäuren bestehendes Peptid, welches sich über die sechs Cysteine erstreckt [15]. Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen des STa, in denen systematisch Aminosäuren ausgetauscht oder durch korrespondierende D-Aminosäuren ersetzt wurden, ergaben eine Reihe von Sequenzpositionen, die sensitiv gegenüber Mutationen waren (Verlust

der Aktivität), und einige Sequenzpositionen, die einen Aminosäureaustausch eher tolerierten [16, 17, 18]. So sind das Asparagin im mittleren Teil des Peptides und das über alle Enterotoxine konservierte Alanin von großer Bedeutung für die Toxizität des STa. Ebenso sind Glutaminsäure und Leucin in STa von essentieller Notwendigkeit für die Aktivität. Es wurden auch verschiedene Toxin-Analoga mit nur zwei Disulfidbrücken synthetisiert, welche alle weniger biologisch aktiv als STa waren. Es kommt allerdings nicht jeder Disulfidbrücke die gleiche Bedeutung zu. So ist die Disulfidbrücke zwischen Cys<sup>2</sup> und Cys<sup>5</sup> unbedingt erforderlich, wohingegen von den beiden anderen Brücken eine weitere ausreicht, um den Rezeptor zu aktivieren. Diese Ergebnisse konnten von zwei Arbeitsgruppen unabhängig bestätigt werden [19, 20]. Die relative Lage dieser wichtigen Disulfidbrücke läßt sich auch in den endogenen Liganden der Guanylatzyklase-C wiederfinden. Die molekulare Struktur der toxischen Domäne von STa wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen über NMR- und Röntgenstruktur-Analysen aufgeklärt [21, 22, 23]. Das Peptidrückgrat des Toxins bildet eine rechtshändige Spirale, die aus drei Umdrehungen besteht und durch die intramolekularen Disulfidbrücken stabilisiert ist.

## 2.4 Der Rezeptor Guanylatzyklase-C (GC-C)

Der Zelloberflächenrezeptor Guanylatzyklase-C (GC-C) ist ein Glycoprotein, das zur Familie der transmembranären Guanylatzyklasen gehört [24, 25]. Die Guanylatzyklase-C ist an der Regulation des intestinalen Elektrolyt- und Wasserhaushaltes wesentlich beteiligt. Die Primärstruktur der GC-C konnte 1990 von Schulz *et al.* durch Klonierung der cDNA aus der Ratte aufgeklärt werden [12]. Das Protein besteht aus einer extrazellulären, einer transmembranären, einer Proteinkinase-ähnlichen und einer katalytischen Domäne. Neben GC-C gibt es noch weitere Guanylatzyklasen, GC-A bis GC-G, die sich durch eine hohe Sequenzhomologie im intrazellulären Bereich auszeichnen. Die extrazellulären Domänen, die für die spezifische Ligandenerkennung und Bindung verantwortlich sind, unterscheiden sich jedoch deutlich [26, 27]. Durch Untersuchungen an GC-C-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, daß GC-C der Rezeptor für die bakteriellen hitzestabilen Enterotoxine ist, da diese nach STa-Gabe keine sekretorische Diarrhöe entwickelten [28, 29]. Dies macht den Rezeptor GC-C zu einem wichtigen pharmakologischen Zielprotein. Geeignete Antagonisten für die GC-C wären von großer Bedeutung in der Behandlung der sekretorischen Diarrhöe.

Die GC-C-vermittelte intestinale Sekretion läßt sich folgendermaßen beschreiben. Der extrazelluläre Teil des Rezeptors wird von der luminalen Seite der Mucosa aus durch seine Liganden STa, Guanylin oder Uroguanylin aktiviert. Daraufhin wird die Synthese des *second messengers* cGMP katalysiert, welcher die ebenfalls membranständige Proteinkinase cGKII aktiviert [30]. Die cGKII phosphoryliert den Ionenkanal (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (CFTR), was zu einem vermehrten Chloridausstrom in das Darmlumen führt (Abbildung 3) [31].



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Stimulation der Chloridsekretion des Darmepithels unter Einfluß von STa, Guanylin oder Uroguanylin. Die Liganden binden an die extrazelluläre Rezeptordomäne und lösen damit die intrazelluläre Akkumulation von cGMP aus. Das gebildete cGMP stimuliert die Membran-gebundene Proteinkinase cGKII zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung des CFTR-Chloridkanals. Dies führt zu einem vermehrten Ausstrom von Chlorid in das Darmlumen.

Das Expressionsmuster der GC-C wurde ausführlich untersucht. Durch Northern-Blot-Analysen konnte im Jejunum, Ileum und Colon der adulten Ratte GC-C-mRNA nachgewiesen werden [12, 32, 33]. Ein direkter Nachweis des GC-C-Proteins erfolgte durch immunhistochemische Untersuchungen am intestinalen Gewebe des Meerschweinchens. Hier konnte gezeigt werden, daß die GC-C ausschließlich in der Bürstensaummembran der Enterozyten lokalisiert ist. Der Rezeptor ist in den direkt dem Darmlumen zugewandten Enterozyten und in denen der *Glandulae intestinalis* in gleichem Maße vorhanden [34]. Die

Untersuchungsergebnisse an Mäusen entsprechen denen an Mensch, Ratte und Meerschweinchen.

Andere Untersuchungen zeigten, daß die Guanylatzyklase-C nicht ausschließlich im intestinalen Trakt lokalisiert ist, sondern auch im fetalen Gewebe von Leber, Hoden und Plazenta [32]. In Leber, Niere und Atemwegen des Opossums konnte die Expression von GC-C ebenfalls detektiert werden [35]. Da diese Organe für bakterielle Enterotoxine nicht zugänglich sind, wurde die Existenz endogener Liganden vermutet.

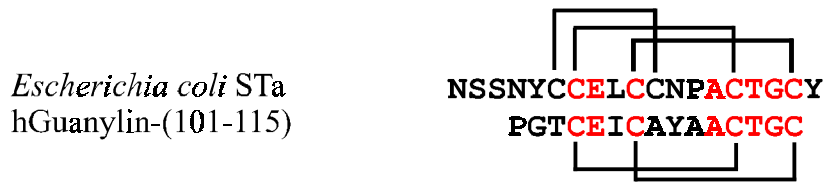
Bezüglich des Mechanismus der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung und der Struktur des Rezeptors ist nur wenig bekannt. Allerdings konnte gezeigt werden, daß die Bindungsstelle der extrazellulären Domäne für STa in der Nähe der Transmembranregion liegt [36]. Es wurde herausgefunden, daß es nach erfolgter Bindung eines Liganden zu einer Oligomerisierung des Rezeptors kommt, welche möglicherweise eine Konformationsänderung in der intrazellulären Domäne bewirkt und somit zu einer Aktivierung der katalytischen Domäne führt [37]. Über die Ligandenerkennung und die Bindung der anderen Rezeptoren der Guanylatzyklase-Familie ist bisher ebensowenig bekannt. Es wird jedoch vermutet, daß die Guanylatzyklase-Aktivität bei allen Rezeptoren mit einer Oligomerisierung des Rezeptors beginnt [38].

## **2.5 Endogene Liganden der Guanylatzyklase-C**

### **2.5.1 Entdeckung von Guanylin**

Die Isolierung von Guanylin gelang erstmals 1992 aus Dünndarmextrakten von Ratten. Die biologische Aktivität der Extrakte wurde unter Verwendung der GC-C-exprimierenden humanen Kolon-Karzinom-Zelllinie T84 ermittelt. Das dabei gefundene Peptid bestand aus 15 Aminosäuren und hatte eine Sequenzhomologie von 47% zum bakteriellen hitzestabilen Enterotoxin STa.





**Abbildung 4:** Vergleich der Aminosäuresequenzen des hitzestabilen Enterotoxins STa und dem C-terminalen Ende von humanem Guanylin. Die Numerierung bezieht sich auf die Sequenzpositionen im Präprohormon. Identische Aminosäuren sind in rot dargestellt. Die Disulfidbrücken sind mit Strichen eingezeichnet.

Im Gegensatz zu STa besitzt Guanylin nur 4 Cysteinreste, die in einer 1-3/2-4 Anordnung verbrückt sind. Die Disulfidbrücken sind essentiell für die biologische Aktivität des Peptides [39]. Guanylin bewirkt analog zu STa einen konzentrationsabhängigen cGMP-Anstieg in T84-Zellen, wobei das Enterotoxin eine höhere Potenz in der cGMP-Produktion zeigte. Es konnte auch gezeigt werden, daß Guanylin und STa um die gleichen Bindungsstellen konkurrieren [39]. Die minimal aktive Sequenz von Guanylin besteht genau wie beim STa aus 13 Aminosäuren [40]. Es wurde vermutet, daß Guanylin in das Darmlumen sezerniert wird und parakrin den Elektrolythaushalt reguliert [39]. Diese Hypothese konnte durch Experimente an Ussing-Kammern verifiziert werden. Nach mucosaler Applikation von Guanylin auf Mucosapräparate sowohl des Jejunums als auch des Kolons erhöhte sich konzentrationsabhängig der Kurzschlußstrom  $I_{SC}$ . STa besaß auch bei diesen Experimenten die höhere Potenz [41].

Nach der Isolierung von Guanylin folgte die Klonierung und Sequenzierung der Guanylin-cDNA aus intestinalem Gewebe der Ratte, der Maus und des Menschen [42, 43, 44]. Es zeigte sich, daß es sich bei dem von Currie isolierten Peptid um ein C-terminales Fragment eines 115 (Mensch) bzw. 116 (Maus) Aminosäuren langen Vorläuferpeptides (Präproguanylin) handelte. Sequenzvergleiche zwischen den verschiedenen cDNA- bzw. den daraus abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen zeigten vor allem im C-terminalen Bereich, welcher die biologisch aktiven Peptide repräsentiert, hohe Übereinstimmungen.

Für das humane Guanylin wurden aufgrund potentieller proteolytischer Spaltstellen zwei mögliche Prohormone postuliert, Guanylin-(17-115) und Guanylin-(22-115). Mit humaner Guanylin-cDNA transfizierte HEK293-Zellen sezernierten das 94 Aminosäuren lange Prohormon Guanylin-(22-115), welches jedoch im T84-Bioassay inaktiv war. Erst nach tryptischer Spaltung in ein 22 Aminosäuren langes carboxyterminales Guanylin-(94-115), konnte eine cGMP-Produktion in T84-Zellen nachgewiesen werden [44]. Wenig später wurde

aus Hämofiltrat niereninsuffizienter Patienten das im Blut zirkulierende menschliche Proguanylin aus 94 Aminosäuren isoliert. Für die Identifizierung des Hormones wurde der T84-Bioassay verwendet [45]. Proguanylin konnte in den biologisch aktiven Fraktionen nachgewiesen werden. Hierbei kann eine Prozessierung durch Ektoenzyme der Zielzelle jedoch nicht ausgeschlossen werden.

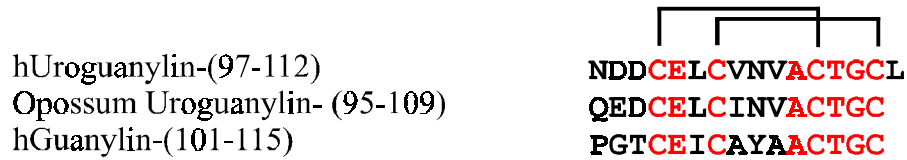
Der Weg der natürlichen Prozessierung des Guanylin-Präprohormons zum bioaktiven Peptid ist bis heute unbekannt. Es wurde allerdings schon kurze Zeit nach der Isolierung von Guanylin darauf hingewiesen, daß das Präprohormon eine säurelabile Spaltstelle zwischen den Aminosäuren Asp<sup>100</sup> und Pro<sup>101</sup> in seiner Sequenz beinhaltet [42]. Die bei der Guanylin-Isolierung von Currie *et al.* durchgeführte Essigsäureextraktion könnte somit zu einer künstlichen Abspaltung des aus 15 Aminosäuren aufgebauten Peptides geführt haben [46]. Es wird jedoch eine weitere Prozessierung des Prohormons postuliert, da einerseits der C-Terminus des Peptids stark konserviert ist und andererseits das Propeptid eine sehr viel schwächere biologische Aktivität als das kurze Peptid besitzt bzw. in einigen Studien völlig inaktiv war [42, 44, 46, 47]. Kürzlich wurde aufgeklärt, daß Proguanylin hauptsächlich zur luminalen Seite der Mucosa abgegeben wird und dort weiter zu einem kleinen bioaktiven Peptid prozessiert wird. Über die eigentliche prozessierte bioaktive Form des Peptides ist allerdings nichts bekannt [48].

Als hauptsächlicher Bildungsort von Guanylin wurde der Darm identifiziert. Dabei ist in Ratte und Maus eine Zunahme detektierbarer Guanylin-mRNA vom Duodenum zum Kolon hin zu verzeichnen. Eine schwache Expression des Guanylin-Gens konnte zudem in der Niere, Nebenniere, Uterus und Ovidukt der Ratte sowie in der Niere der Maus nachgewiesen werden [42, 43]. *In situ*-Hybridisierungsversuche mit Rattengewebebeobachtungen zeigten eine hohe Guanylin-Genexpression in den Enterozyten an der Spitze der Dünndarmzotten und eine schwache Expression in den Epithelzellen der Lieberkühnschen Drüsen [33, 49].

### **2.5.2 Entdeckung von Uroguanylin**

Die Isolierung von Uroguanylin, dem zweiten endogenen Liganden der GC-C, gelang Hamra *et al.* aus Urin vom Opossum [50]. Das 15 Aminosäuren lange Peptid zeigte eine deutliche Abweichung in der Aminosäuresequenz zum Guanylin, weshalb davon ausgegangen wurde, daß es sich um einen weiteren Repräsentanten einer Familie Guanylin-verwandter Peptide handelte. Bald darauf konnten Kita *et al.* ein dem Opossum-Uroguanylin entsprechendes, 16

Aminosäuren langes Peptid aus menschlichem Urin isolieren [51]. Beide Peptide weisen das für Guanylin typische Disulfidverbrückungsmuster auf (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Vergleich der C-terminalen Aminosäuresequenzen von Guanylin und Uroguanylin. Identische Aminosäuren sind in rot dargestellt. Die Disulfidbrücken sind mit Strichen eingezeichnet. Die Nummern beziehen sich auf die entsprechenden Sequenzabschnitte im Präprohormon.

Diese Disulfidverbrückungen sind auch beim Uroguanylin essentiell für seine biologische Aktivität [40]. In Untersuchungen mit Uroguanylin an T84-Zellen konnte eine biologische Aktivität des Peptides nachgewiesen werden. Außerdem wurde eine konkurrierende Bindung von STa und Uroguanylin an GC-C gezeigt [50, 51]. Ausgehend von Hämofiltrat niereninsuffizienter Patienten konnte eine N-terminal verlängerte, im Blut zirkulierende und ebenfalls biologisch aktive Variante von Uroguanylin bestehend aus 24 Aminosäuren isoliert werden [52]. Die 24 Aminosäuren und die 16 Aminosäuren lange Form unterscheiden sich nicht in ihrer biologischen Aktivität. Durch Klonierung der cDNA wurde die Sequenz des menschlichen Präprohormons mit 112 Aminosäuren abgeleitet, das die isolierten Peptide am C-Terminus enthält [53].

Uroguanylin wird im gesamten Gastrointestinaltrakt, einschließlich des Magens, wo mehr gebildet wird als im Pankreas, exprimiert. Dabei ist die Expressionrate im Gegensatz zum Guanylin im Dünndarm deutlich stärker als im Kolon [53, 54, 55]. Somit weisen Guanylin und Uroguanylin ein komplementäres Expressionmuster im Darm auf. Die zelluläre Lokalisierung von Uroguanylin zeigte, daß es in enteroendokrinen Zellen gebildet wird. Aus diesem Grunde wird postuliert, daß es eine regulatorische Funktion in der Magen- und Dünndarmsekretion haben könnte [52].

Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit der cGMP-Produktion von Guanylin und Uroguanylin zeigten, daß Uroguanylin bei niedrigem pH-Wert, wie er im sauren Milieu des Magens vorliegt, 100-fach potenter ist als Guanylin. Umgekehrt war Guanylin bei alkalischem pH-Wert, wie er im Duodenum vorliegt, deutlich potenter als Uroguanylin. Für den Anstieg der Bindungsaffinität bei saurem pH wurden die sauren N-terminalen Aminosäuren des

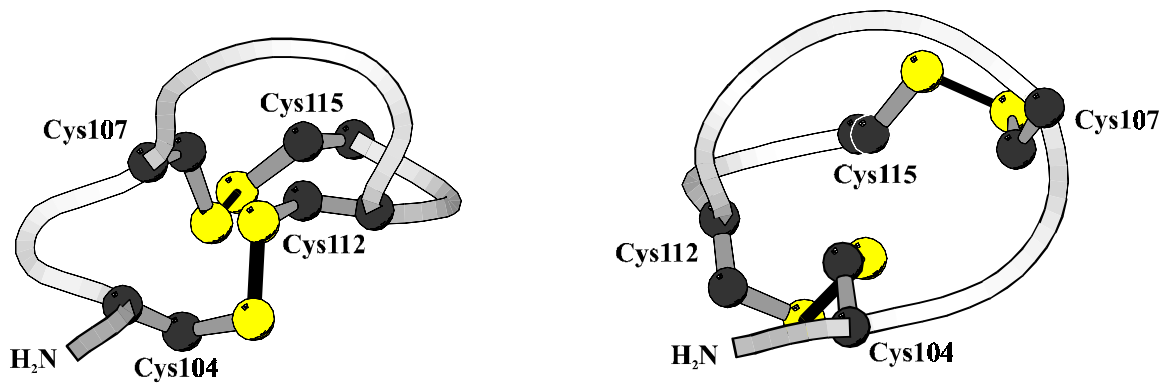
Uroguanylins verantwortlich gemacht [56]. Diese Befunde stehen im Einklang mit dem Expressionsmuster der beiden Peptide.

Neben dem gastrointestinalen Gewebe wurde Uroguanylin ebenfalls in Niere, Leber, Pankreas, Herz und Lunge detektiert, allerdings in deutlich geringeren Mengen [54, 55, 57]. Die Beobachtung, daß Uroguanylin und STA *in vivo* (an narkotisierten Mäusen) und *in vitro* (an der isoliert perfundierten Niere von Maus und Ratte) einen Anstieg der Natriurese und Kaliurese auslöste, führte zu der Hypothese, daß Uroguanylin eine endokrine, enterorenale Achse zur Anpassung der renalen Salz- und Wasserausscheidung an die orale Natriumaufnahme bilden könnte [58, 59].

Es wurde noch ein dritter endogener Ligand der Guanylatzyklase-C beschrieben, allerdings bisher nur auf der cDNA-Ebene. Es handelt sich hierbei um das Lymphoguanylin, das von der Arbeitsgruppe um Forte aus Opossum Milz mittels Klonierung der cDNA gefunden wurde. Die Besonderheit dieses neuartigen Liganden ist, daß Lymphoguanylin nur drei Cysteine in der von der cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz besitzt anstatt vier Cysteinresten in Guanylin und Uroguanylin [60].

## 2.6 Die topologische Isomerie von Guanylin und Uroguanylin

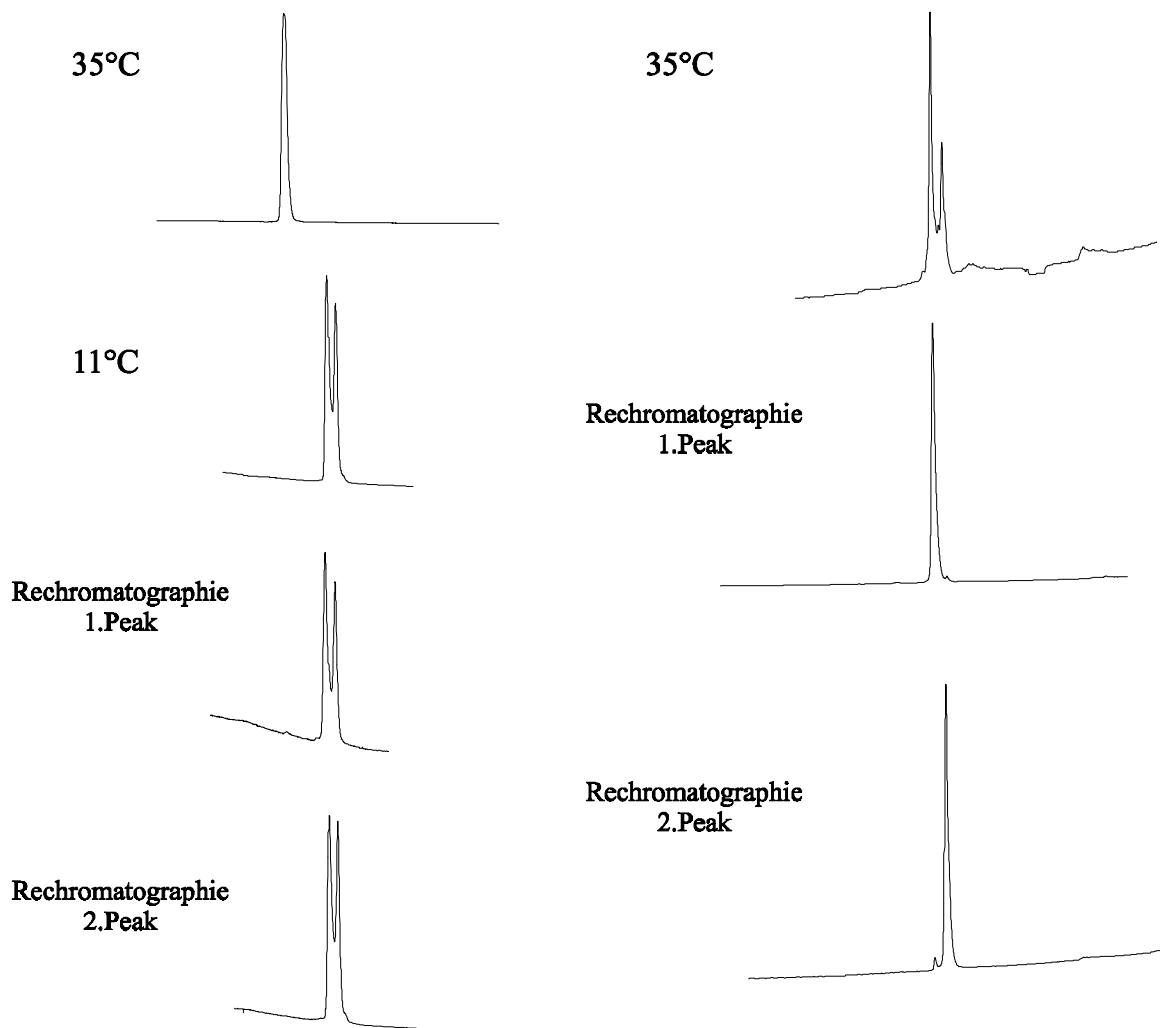
Topologische Isomerie wird definiert als "Existenz mehrerer Möglichkeiten der räumlichen Anordnungen einer nicht planaren Polypeptid-Kette" [61]. Guanylin und Uroguanylin weisen nur dann eine biologische Aktivität auf, wenn die Cysteine in einer 1-3/2-4-Abfolge miteinander verbrückt sind. Temperaturabhängige HPLC-Untersuchungen von bioaktivem Guanylin offenbarten die Existenz von zwei topologischen Isomeren, die miteinander in einem ständigen Gleichgewicht stehen [40].



**Abbildung 6:** Molscript Diagramm der beiden topologischen Stereoisomeren von humanem Guanylin-(103-115), nach Skelton *et al.* (Brookhaven Protein Data Bank, 1GNA und 1GNB). links: A-Form (biologisch aktiv); rechts: B-Form (biologisch inaktiv).

Diese Isomere sind über HPLC nur bei niedriger Temperatur (11°C) detektierbar (Abbildung 7) und liegen in einem Verhältnis von ungefähr 60:40 vor. Die räumliche Anordnung der beiden Stereoisomere im Guanylin konnte von Skelton *et al.* mittels NMR-spektroskopischer Untersuchungen am synthetischen 13 Aminosäuren langen Guanylin-(103-115) gezeigt werden [62]. Die Isomere wurden als A- und B-Form bezeichnet (Abbildung 6). In der A-Form des Guanylins bilden die Aminosäuren eine rechtshändige Spirale, die aus drei Umdrehungen besteht. Die B-Form beschreibt eine linkshändige Spirale.

Ebenfalls durch NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, daß die Umwandlungszeit der beiden Formen ineinander mindestens in der Größenordnung von Sekunden bis hin zu 90 Minuten (Zeitaufwand für eine Rechromatographie) liegt [40]. Eine dauerhafte Trennung der beiden Isomere des Guanylins ist mittels RP-HPLC nicht möglich. Durch C-terminale Verlängerung des Guanylins um ein Leucin (wie im Uroguanylin) und um das Tripeptid Leu-Lys-Lys konnte die Kinetik der Isomerisierung signifikant verlangsamt und so die auftretenden Isomere dauerhaft voneinander getrennt werden. Es war somit erstmals möglich, die biologische Aktivität der Isomere mit ihrer Struktur eindeutig zu korrelieren [63]. Die A-Form des Peptides ist die biologisch aktive und weist eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit dem hitzestabilen Enterotoxin STa auf [21]. Über das Auftreten der topologischen Isomere *in vivo* ist bisher nichts bekannt. Ob auch im 94 Aminosäuren langen Proguanylin zwei Isomere existent sind, ist ebenfalls noch unklar.



**Abbildung 7:** HPLC-Verhalten der Peptidhormone Guanylin (links) und Uroguanylin (rechts). Die topologischen Isomere des Guanylins sind erst bei niedriger Temperatur detektierbar und nicht separierbar. Die Uroguanylin-Stereoisomeren sind schon bei höherer Temperatur detektierbar und lassen sich durch RP-HPLC voneinander trennen.

In der Literatur wurden bisher mehrere Modelle für den Umwandlungsmechanismus diskutiert: zum einen, daß die Umwandlung unter Öffnung einer Disulfidbrücke erfolgt, welches aber nicht bestätigt werden konnte, und zum anderen, daß der mittlere Loop des Moleküls durch die von den Disulfiden aufgespannte Ebene schwingt [62, 64]. Das Durchschwingen wäre allerdings mit einer sehr hohen Aktivierungsenergie verbunden, so daß dieses Modell als sehr unwahrscheinlich erscheint [62]. Durch den Einbau eines Diiodotyrosins in den mittleren Loop des Guanylins, welches eine große sterische Hinderung für das Molekül bedeutet, ließ sich das HPLC-Verhalten des Peptides nicht verändern [63].

Aus diesen Studien läßt sich der Schluß ziehen, daß der C-Terminus eine ausschlaggebende Rolle bei der Umwandlung spielt. Dem N-Terminus des Peptides kann keine Bedeutung für die Interkonversion der Isomeren beigemessen werden, da Guanylin-(99-115) das identische Verhalten wie das N-terminal um zwei Aminosäuren kürzere Guanylin-(101-115) zeigt [40]. Für die vollständige Aufklärung des Umwandlungsmechanismus wären weitere Studien an diesem für Mammalia einzigartigen System von großer Bedeutung, zumal für die biologisch inaktive B-Form des Peptides noch keinerlei physiologische Bedeutung nachgewiesen wurde. Sie könnte zum Beispiel auch an einen anderen Rezeptor binden oder eine Speicherform für die GC-C-aktive A-Form darstellen.

Bei der chemischen Synthese von Uroguanylin werden ebenfalls zwei topologische Isomeren gebildet, die eine den Guanylin-Isoformen sehr ähnliche Struktur aufweisen [65, 66]. Das HPLC-Verhalten der Uroguanylin-Isoformen unterscheidet sich jedoch grundlegend von dem der Guanylin-Stereoisomeren (Abbildung 7). Beide Formen sind bei der chromatographischen Analyse schon bei höherer Temperatur sofort nach der Einführung der Disulfidbrücken erkennbar. Außerdem lassen sich die beiden Isomeren des Uroguanylins separieren, ohne sich wieder ineinander umzuwandeln. Dieses abweichende Verhalten im Vergleich zum Guanylin ist mit großer Sicherheit auf die natürliche C-terminale Verlängerung des Uroguanylins um ein Leucin zurückzuführen. So konnte gezeigt werden, daß ein C-terminal um ein Leucin verkürztes Uroguanylin-Derivat ein ähnliches HPLC-Verhalten wie das Guanylin aufweist [66]. Die biologisch aktive Isoform des Uroguanylins ist ebenfalls die A-Form, welche in ihrer Struktur dem hitzestabilen Enterotoxin STa stark ähnelt [65]. Das aus Hämofiltrat isolierte Uroguanylin besteht ausschließlich aus der A-Form, was durch eine Koinjektion mit synthetischem Referenzmaterial gezeigt werden konnte [67]. Über die Funktion der B-Form ist auch beim Uroguanylin nichts bekannt.

## **2.7 Differentielle Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Peptidhormonen**

Mit Hilfe von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen lassen sich Interaktionen von Hormonen mit ihren Rezeptoren charakterisieren. Im Falle von Peptiden können essentielle Segmente für die Rezeptor-Erkennung und -Aktivierung durch verschiedene Modifikationen in einzelnen Sequenzabschnitten identifiziert werden. Dabei können die Veränderungen entweder in kompletten Teilbereichen des Peptides vorgenommen werden (Segmentaustausch) oder durch

einen systematischen Aminosäureaustausch erfolgen (Scanning). Das Scanning kann durch einen Austausch von L- in D-Aminosäuren, durch eine Mutation gegen L-Alanin oder durch weitergehende Austausche erfolgen. Bei einem L-Alaninscan werden systematisch alle variablen Aminosäuren eines Peptides gegen L-Alanin ausgetauscht. Durch einen solchen L-Alaninscan kann der Einfluß einzelner Seitenketten auf die Rezeptor-Ligand-Interaktion auf molekularer Ebene ermittelt werden. Dies ist eine essentielle Voraussetzung für die Entwicklung antagonistischer Moleküle, die an pharmakologisch wichtigen Rezeptoren binden, diese jedoch nicht aktivieren. Durch einen D-Aminosäurescan wird das Peptidrückgrat an der Stelle, an der die D-Aminosäure eingebaut wird, empfindlich gestört. Es können also auch hierbei einzelne Bereiche innerhalb eines Peptides identifiziert werden, die für eine Rezeptor-Ligand-Interaktion verantwortlich sind. Ein Nachteil bei einem D-Aminosäureaustausch ist allerdings der Preis der D-Aminosäuren. In einem starren kleinen Peptidgerüst wie im Guanylin können solche D-Aminosäureaustausche die Struktur des Peptides sehr stark verändern, so daß die Peptide möglicherweise gar nicht mehr an ihren Rezeptor binden können. Es wurden Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von einer ganzen Reihe von Peptidhormonen durchgeführt. Genannt seien in diesem Zusammenhang nur das NPY und das Galanin [68, 69]. Bei diesen Peptiden ist es heutzutage relativ einfach durch den Einsatz von multiplen Peptidsynthesizern in kurzer Zeit viele Derivate in ausreichender Menge zu synthetisieren, um Bioassays und Rezeptor-Bindungs-Studien durchzuführen, da sie über keine Disulfidbrücken verfügen.

Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen von cyclischen Peptiden sind wesentlich zeitaufwendiger, da nach der Synthese des Rohpeptides noch weitere chemische Reaktionen durchgeführt werden müssen, die eine chromatographische Reinigung erfordern und deshalb mit Substanzverlusten einhergehen.

Durch chemische Veränderungen an Peptiden ist es möglich, für bestimmte Systeme Rezeptorantagonisten zu designen. Dies ist jedoch nur möglich, wenn Chemiker mit Biologen eng zusammenarbeiten, denn biologische Testsysteme, die quantitativ die Aktivierung oder Blockierung von Rezeptoren aufzeigen, sind für dieses Unterfangen unverzichtbar. Auch biophysikalische Studien wie die NMR-Spektroskopie von Peptiden und Proteinen sind in diesem Rahmen nicht zu vernachlässigen. In quantitativen Struktur-Aktivitäts-Relationen (QSAR) wird durch den Vergleich biologischer Daten bestimmter Substanzklassen mit strukturellen Daten über Computeranalysen versucht, Pharmakophore zu modellieren. Dazu muß der aktive Teil des Proteins nicht unbedingt bekannt sein, sondern es wird über "*receptor mapping techniques*" ein hypothetisches Modell des aktiven Bereiches erstellt. Anschließend



werden Substanzbanken generiert, die dem Modell genügen. Diese Banken werden dann an biologischen Testsystemen untersucht. Solche rationalen Analysen sind von unschätzbarem Wert für die chemische Synthese von möglichen Rezeptorantagonisten.

### 3. Problemstellung

Der durch die endogenen Liganden Guanylin und Uroguanylin aktivierbare Rezeptor Guanylatzyklase-C ist an der Regulation des intestinalen Elektrolyt- und Wasserhaushaltes wesentlich beteiligt. Da er auch durch Enterotoxine pathogener Bakterienstämme stimuliert wird und so akute sekretorische Diarrhöen verursacht, ist er ein pharmakologisch wichtiges Zielprotein für die antagonistische Blockierung. Wesentliches Ziel dieser Arbeit ist es daher, eine differentielle Struktur-Aktivitäts-Beziehung zwischen den Liganden Guanylin und Uroguanylin und dem Rezeptor GC-C aufzustellen.

Es sollen zunächst beide Peptide in Hinsicht auf essentielle Aminosäuren für die Rezeptoraktivierung durch Bestimmung von intrazellulärem cGMP charakterisiert und mit STa verglichen werden. Hierzu sollen die variablen Aminosäuren von Guanylin und Uroguanylin jeweils systematisch gegen L-Alanin ausgetauscht werden, um so den Beitrag der verschiedenen Seitenketten zur Rezeptoraktivierung zu ermitteln. Im Anschluß daran soll die Bedeutung der eingeführten Mutationen für die Rezeptorbindung mittels Verdrängung von <sup>125</sup>I-markiertem STa an die GC-C untersucht werden. Die Ergebnisse sollen auch eine Aussage darüber erlauben, ob die beiden Peptide ihren Rezeptor gleichsinnig binden oder ob sie möglicherweise unterschiedliche Rezeptorbindungsstellen besitzen. Die hierfür benötigten Peptide sollen mittels Festphasenpeptidsynthese (SPPS) unter Anwendung der Fmoc-Schutzgruppentechnik synthetisiert werden. Die Einführung der beiden Disulfidbrücken in die Peptide wird regioselektiv unter Verwendung des orthogonalen Schutzgruppenpaares Trt/Acm erfolgen. Die so dargestellten bizyklischen Peptide sollen auch in Bezug auf das Phänomen der topologischen Isomerie untersucht werden, um einzelne Sequenzpositionen zu charakterisieren, die für die Interkonversion von Bedeutung sind. Weiterhin soll die Bedeutung der Prosequenz von Guanylin für die biologische Aktivität und die Ausbildung der nativen Disulfidverbrückung untersucht werden.

Durch die erzielten Ergebnisse wird ein genaueres Verständnis der Interaktion des medizinisch relevanten Rezeptors Guanylatzyklase-C mit seinen Liganden auf molekularer Ebene erwartet, welches von grundlegender Bedeutung für die Entwicklung peptiderger oder nicht-peptiderger Rezeptorantagonisten zur Behandlung sekretorischer Diarrhöen ist. Weiterhin wird ein Einblick in die Ligand-Rezeptor-Aktivierung der anderen Rezeptoren aus der Familie der Guanylatzyklasen erwartet, die möglicherweise auf einem ähnlichen Prinzip beruht.

## 4. Material & Methoden

### 4.1 Peptidsynthesen

Fmoc-geschützte Aminosäuren wurden in der natürlich vorkommenden L-Konfiguration verwendet. Bezogen wurden sie von Orpegen (Heidelberg) oder Perseptive Biosystems (Wiesbaden). Folgende Aminosäuren wurden eingesetzt: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Cys(Acm)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH. Für die Festphasensynthesen der Guanylin- und Uroguanylin-Derivate wurden folgende Reagenzien verwendet:

Harze:	TentaGel-S-Trt-Cys(Acm)-Fmoc	Rapp Polymere, Tübingen
	TentaGel-S-PHB-Cys(Trt)-Fmoc	Rapp Polymere, Tübingen
	Fmoc-Cys(Trt)-Wang Harz	Novabiochem, Bad Soden
	TentaGel-S-Trt-Leu-Fmoc	Rapp Polymere, Tübingen
	Fmoc-Leu-Wang Harz	Novabiochem, Bad Soden
	H-Leu-2-Cl-Trt-Harz	Novabiochem, Bad Soden
	H-Ala-2-Cl-Trt-Harz	Novabiochem, Bad Soden
	H-Cys(Acm)-2-Cl-Trt Harz	Novabiochem, Bad Soden
Synthesereagenzien:	Essigsäure	Merck, Darmstadt
	Essigsäureanhydrid	Merck, Darmstadt
	N,N-Diisopropylethylamin	Merck, Darmstadt
	DIPEA (für ABI 433)	Perkin Elmer/ABI, Weiterstadt
	Ethandithiol	Merck, Darmstadt
	Iod	Fluka, Neu-Ulm
	HBTU	Perkin-Elmer/ABI, Weiterstadt
	1-Hydroxybenzotriazol	Fluka, Neu-Ulm
	N-Methyl-2-pyrrolidinon	Merck, Darmstadt
	Trifluoressigsäure	Merck, Darmstadt
	Piperidin	Merck, Darmstadt

Alle weiteren Synthesereagenzien wurden in p.a. (pro analysi) Qualität verwendet und von Merck (Darmstadt) oder Fluka (Neu-Ulm) bezogen. Wasser wurde in deionisierter Form (Milli-Q-Plus, Millipore) verwendet.

#### 4.1.1 Festphasensynthese von Guanylin- und Uroguanylin-Derivaten

Die linearen Peptide wurden mit einem automatischen Peptidsynthesizer 433A (Perkin Elmer/ABI) synthetisiert. Ausgegangen wurde dabei von 0,1 mmol des vorbeladenen Harzes. Alle Aminosäuren wurden in zehnfachem Überschuss eingesetzt. Die Aktivierung der Aminosäuren erfolgte mit 9 eq. HBTU/HOBt und 20 eq. DIPEA in NMP. Cys<sup>107</sup> und Cys<sup>115</sup> wurden Acn-geschützt eingesetzt, während Cys<sup>104</sup> und Cys<sup>112</sup> Trt-geschützt waren (Numerierung bezogen auf Guanylin-(101-115)). Die Reihenfolge der Cysteinschutzgruppen wurde für die Uroguanylinsynthese entsprechend gewählt. Für die letzten drei Kopplungszyklen wurde jeweils eine Doppelkopplung verwendet, deren Acylierungszeit auf zwei Stunden verlängert wurde. Für alle anderen Kopplungen wurde der FastMoc-Standardzyklus in N-Methylpyrrolidinon (NMP) als Lösungsmittel durchgeführt. Nach beendeter Synthese wurde die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe durch Behandlung mit 20% Piperidin entfernt.

Der FastMoc-Standardzyklus für eine Einfachkopplung setzt sich wie folgt zusammen:

1. Fmoc-Abspaltung (wird 3-5 × durchgeführt)	3 min
2. Lösen der Aminosäure in HBTU/HOBt in NMP	7,6 min
3. Waschen des Harzes mit NMP	2,5 min
4. Zugabe von DIPEA und Transfer in den Reaktor	2,1 min
5. Kopplung und anschließendes Waschen mit NMP	9 min

Die eigentliche Kopplungszeit beträgt also nur etwa 9 min. Eine Doppelkopplung setzt sich aus zwei Einzelzyklen zusammen, wobei dem zweiten Zyklus die initiale Fmoc-Abspaltung fehlt. Auf diese Weise kann die Acylierung zweimal mit frisch gelösten Synthesereagenzien durchgeführt werden.

Das so erhaltene geschützte Peptidylharz wurde in eine Glasfritte überführt, jeweils zweimal mit NMP, 2-PrOH, NMP und TBME gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Zur Abspaltung des Peptides vom Harz und zur Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen wurde das harzgebundene Peptid mit einer frisch angesetzten Abspaltnischung bestehend aus TFA/EDT/H<sub>2</sub>O (94:3:3, v/v/v) für mindestens drei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Pro 100 mg Harz wurden 2 ml Abspaltnischung verwendet. Anschließend wurde die Suspension

über eine Glasfritte (G2) filtriert und das Peptid durch Zugabe von eisgekühltem TBME aus dem Filtrat ausgefällt. Das Harz wurde mit wenig TFA gewaschen und das ausgefallene Rohpeptid wurde zentrifugiert. Zur Entfernung der *scavenger* wurde das Rohmaterial noch dreimal in MTBE resuspendiert, zentrifugiert und dekantiert. Anschließend wurde das Rohpeptid im Exsikkator getrocknet und in dieser Form zur Luftoxidation eingesetzt.

#### 4.1.2 Luftoxidation zur Bildung monozyklischer Peptide

Die linearen reduzierten Derivate von Guanylin und Uroguanylin wurden in Wasser (0,5 mg/ml) gelöst. Grobes, schwer lösliches Material wurde mittels Ultraschallbehandlung zerkleinert. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1 M  $\text{NH}_3$  auf ungefähr 8 eingestellt. Anfänglich unlösliches Material löste sich im Laufe weniger Stunden. Die Lösung wurde so lange unter Lufteinwirkung heftig durchmischt, bis kein freies Thiol chromatographisch oder massenspektrometrisch mehr nachzuweisen war. Nach etwa 2 Tagen Luftoxidation wurde die Lösung mit Eisessig angesäuert, und der entstehende Niederschlag wurde abfiltriert. Das Filtrat wurde durch präparative RP-HPLC (Säule Präp. 1) gereinigt. Fraktionen, die das monozyklische Intermediat in homogener Form enthielten (nachgewiesen durch analytische RP-HPLC und ES-MS), wurden vereinigt, lyophilisiert und zur Einführung der zweiten Disulfidbrücke verwendet.

#### 4.1.3 Iodoxidation monozyklischer, Cys(Acm)-geschützter Peptide

Die oxidative Abspaltung der Acm-Gruppen unter direkter Bildung einer zweiten Disulfidbrücke wurde für alle Guanylin- und Uroguanylin-Derivate mit identischen Versuchsparametern durchgeführt. Das monozyklische Edukt wurde in Eisessig/0,1 M wässr. HCl (4:1, pH 2, 0,5 mg/ml) gelöst. 20 eq. (bezogen auf zwei Acm-Gruppen) einer frisch angesetzten 0,05 M Iod-Lösung in Eisessig wurden hinzugegeben, und die Reaktionslösung wurde 60 min gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das überschüssige Iod durch Zutropfen von frisch angesetzter 0,1 M Ascorbinsäure reduziert, bis sich die Reaktionslösung entfärbte. Die Lösung wurde mit Wasser auf das vierfache Volumen verdünnt und sofort durch präparative RP-HPLC (Säule Präp. 2) bei 25°C Säulentemperatur gereinigt. Fraktionen, die die bityklischen Endprodukte enthielten, wurden vereinigt und lyophilisiert. Beim Uroguanylin wurden die Fraktionen, die nur ein Stereoisomer enthielten, vereinigt und lyophilisiert. Falls bei der HPLC-Analyse unter Standardbedingungen nur ein Uroguanylin-Isomer detektierbar war, wurde die präparative Chromatographie bei einem pH von 7

wiederholt, wodurch auch diese Uroguanylin-Isomeren getrennt werden konnten (siehe 4.2, Abschnitt "RP-HPLC").

#### **4.1.4 Isolierung von Proguanylin aus Hämofiltrat**

Das zirkulierende 94 Aminosäuren lange Proguanylin wurde aus einer Peptidbank aus Hämofiltrat mittels RP-HPLC auf einer C18-Säule (Präp. 3) mit einem Gradienten von 30-80% Eluens B (Standard Laufmittel) in 50 min aufgereinigt [70]. Die Reinheit der Fraktionen wurde mittels analytischer RP-HPLC, ES-MS-Analyse und Kapillarzonenelektrophorese (CZE) überprüft. Fraktionen, die Proguanylin in hochreiner Form enthielten, wurden vereinigt und lyophilisiert. MW (berechnet): 10.337 Da; ES-MS  $[M+H^+]$ : 10.336 Da

#### **4.1.5 Essigsäurespaltung von Proguanylin**

50 µg Proguanylin wurde in 100 µl 1 M HOAc für 5, 10, 20, 40 und 60 min bei 95°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff gestoppt, und anschließend wurden die Proben lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und im cGMP-Bioassay getestet. Anschließend wurden die Proben durch HPLC bei einer Säulentemperatur von 11°C (Säule Analyt. 2) (Gradient 20-80% B in 30 min) und Massenspektrometrie (ES-MS und MALDI-MS) analysiert.

#### **4.1.6 Reduktion und oxidative Faltung von Guanylin und Proguanylin**

500 µg Proguanylin, Guanylin-(53-115) oder Guanylin-(101-115) wurden mit 500 eq. DTT in einem 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Puffer (pH 8,3) für 2-3 h bei 60°C reduziert. Die reduzierten Peptide wurden über HPLC gereinigt (Säule Präp. 3) und mittels ES-MS analysiert. Fraktionen, die die reduzierten Peptide enthielten, wurden vereinigt und lyophilisiert.

Für die oxidative Rückfaltung wurden 250 µg der reduzierten Peptide in 5 ml 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Puffer mit 2 mM EDTA (pH 8,3) gelöst. Dies ergab eine Endkonzentration von 50 µg/ml. Die Oxidationsprodukte wurden nach einer Reaktionszeit von ca. 18 h mittels HPLC (Säule Analyt. 2) analysiert. Der Einfluß verschiedener Pufferzusätze auf die Faltung wurde untersucht (Tabelle 8). Für die Untersuchung der Produkte der Proguanylin-Faltung wurde der bei der HPLC-Analyse auftretende, neu entstandene Peak gesammelt, lyophilisiert und einer Essigsäurespaltung unterzogen, um den C-Terminus aus 15 Aminosäuren vom Rest des Prohormones abzuspalten. Die nach der Spaltung entstandene Mischung aus Disulfidisomeren von Guanylin-(101-115) wurde durch RP-HPLC analysiert.

### 4.1.7 Enzymatische Darstellung von Guanylin-(53-115)

1,5 mg Proguanylin wurden mit 15 µg Endoprotease Lys-C (Boehringer Mannheim, Mannheim) in 600 µl 0,1 M Tris-HCl (pH 8) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 30 min wurde die Reaktion durch Zugabe von TFA gestoppt und die Mischung über RP-HPLC (Säule Präp. 3) aufgereinigt. Nach Analyse mittels ES-MS und HPLC wurden die Fraktionen, die Guanylin-(53-115) in reiner Form enthielten, vereinigt und lyophilisiert.

## 4.2 Analytische Methoden

### 4.2.1 Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)

Für die Flüssigkeitschromatographie wurden Systeme der Firmen Kontron (Eching) und Chemdata (Sinsheim) verwendet. Zur analytischen bzw. präparativen Trennung wurden verschiedene Säulen in Abhängigkeit der zu trennenden Produktmenge eingesetzt. Es wurden folgende HPLC-Säulen der Firmen Vydac (Hesperia, Kalifornien) und Machery & Nagel (Düren) benutzt:

Vydac C18, 47×300 mm, 300 Å 15-20 µm,	Flußrate 50 ml/min	(Säule Präp. 1)
Vydac C18, 20×250 mm, 300 Å, 5 µm,	Flußrate 7 ml/min	(Säule Präp. 2)
Vydac C18, 10×250 mm, 300 Å, 5 µm,	Flußrate 3 ml/min	(Säule Präp. 3)
Vydac C18, 4.6×250 mm, 300 Å, 5 µm,	Flußrate 0.8 ml/min	(Säule Analyt. 1)
C18 PPN, 2×250 mm, 100 Å, 5 µm, (Machery & Nagel)	Flußrate 0.2 ml/min	(Säule Analyt. 2)

Als Laufmittel wurde standardmäßig eine 0,08%ige TFA-Lösung (Eluens A) und eine 0,06%ige TFA-Lösung in 80% Acetonitril/H<sub>2</sub>O (Eluens B) eingesetzt. Für schwierigere Trennungen wurde ein pH 7-Puffersystem eingesetzt: Eluens A, 20 mM Phosphat in H<sub>2</sub>O, pH 7; Eluens B, 20 mM Phosphat in 60% Acetonitril/H<sub>2</sub>O. Zur Analyse der Uroguanylininterkonversion wurde folgendes Puffersystem eingesetzt: Eluens A, 10 mM NH<sub>4</sub>OAc in H<sub>2</sub>O, pH 5,7; Eluens B, 10 mM NH<sub>4</sub>OAc in 80% Acetonitril/H<sub>2</sub>O.

Zur Aufreinigung der monozyklischen Peptide und Endprodukte wurde folgender Gradient benutzt: 20-50% Eluens B in 60 min. Die chromatographischen Aufreinigungen mit dem pH 7-Puffer wurden mit einem Gradienten von 10-40% Eluens B in 60 min durchgeführt. Alle analytischen HPLC-Läufe wurden, soweit nicht anders angegeben, mit einem Gradienten von 10-70% Eluens B in 60 min durchgeführt. Für analytische HPLC-Läufe wurde *gradient grade* Acetonitril (Merck) verwendet und für die präparative Chromatographie Acetonitril in prepsolv-Qualität (Merck). Die eingesetzte TFA war immer von *gradient grade* Qualität (Merck).

#### 4.2.2 Elektrospray-Quadrupol-Massenspektrometrie

Die Elektrospray-Massenspektren wurden auf einem Elektrospray-MS (Perkin Elmer, Sciex API 100, Biomolecular Mass Analyzer) aufgenommen. Ein Aliquot einer lyophilisierten Probe oder einer HPLC-Fraktion wurde in 100 µl 50% MeCN in H<sub>2</sub>O mit 0,2% Ameisensäure gelöst und in eine 100 µl-Spritze aufgezogen. Die Probe wurde dann über eine Kapillare (*fused silica*, Ø 75 µm) mit einem Fluß von 5 µl/min in die Elektrospray-Ionenquelle eingebracht. Die Ionen wurden in dem mit Polypropylenglycol geeichten Quadrupol-Massenspektrometer getrennt. Die Messungen wurden mit dem Programm LC2-TUNE (Perkin Elmer) durchgeführt, die Auswertung der Spektren erfolgte über das Programm BioMultiView (Perkin Elmer).

#### 4.2.3 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die MALDI-Massenspektren wurden auf einem Reflectron MALDI-TOF-Massenspektrometer (Voyager, Perseptive Biosystems, Houston, TX) aufgenommen. Die lyophilisierte Probe wurde in MeCN mit 0,1% TFA im Verhältnis 1:1 aufgenommen, so daß eine Konzentration zwischen 10 fmol/µl und 10 pmol/µl resultierte. Anschließend wurde 1 µl der Probenlösung mit 1 µl der in MeCN gelösten Matrixsubstanz auf dem Probenträger vermischt und an der Luft getrocknet. Als Matrixsubstanzen wurden 3-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxy-phenyl)-acrylsäure oder 3,5-Dimethoxy-4-hydroxymizinsäure (Sinapinsäure) verwendet. Die Proben wurden durch einen Laserstrahl im Massenspektrometer ionisiert und mit 25 kV in Richtung des Detektors beschleunigt. Die Steuerung des Spektrometers und die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programm Voyager Biospectrometry Workstation (Perseptive Biosystems).



#### 4.2.4 Chymotrypsin-Spaltung von bizyklischen Guanylin-Disulfidisomeren

Die nach der oxidativen Faltung von Guanylin erhaltenen Peptide wurden zur Überprüfung des Disulfidmusters mit 2,5 µg Chymotrypsin in 50 µl eines 0,1 M Tris-HCl-Puffers mit 10 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7,8) für 20 h bei Raumtemperatur umgesetzt. Die erhaltene Reaktionsmischung wurde über C18-HPLC (Säule Analyt. 2) analysiert, die resultierenden Peaks fraktioniert und das Molekulargewicht mittels ES-MS bestimmt.

#### 4.2.5 Kapillarzonelektrophorese (CZE)

Die Elektropherogramme wurden mit einer Biofocus 3000-Anlage der Firma Bio-Rad (München) aufgenommen. Es wurde eine beschichtete Kapillare mit einer Länge von 40 cm (BioCap LPA, Coated Capillary, Bio-Rad) mit einem Innendurchmesser von 50 µm verwendet. Vor der Messung wurde die Kapillare jeweils mit H<sub>2</sub>O gespült und anschließend mit dem verwendeten 0,1 M Phosphatpuffer, pH 2,5 (Bio-Rad) äquilibriert. Die salzfreien Proben wurden durch Druckinjektion (20 psi/sec, 20 sec) eingebracht. Alle Messungen erfolgten bei konstanter Stromstärke (250 µA), einer Detektionswellenlänge von 200 nm und innerhalb von 30 min.

#### 4.2.6 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden Tricingele in Gelelektrophoresekammern der Firma Bio-Rad eingesetzt [71]. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V für 1,5-2 h. Anschließend wurden die Gele mit Coomassie (1% Coomassie brilliant blue, 25% Isopropanol, 7% Eisessig in Wasser (w/v/v/v)) für 2-4 h angefärbt, mit H<sub>2</sub>O/Essigsäure/Methanol (70:30:10) gewaschen und mit 5% Essigsäure konserviert.

#### 4.2.7 Aminosäureanalyse (ASA)

Die Aminosäureanalyse zur Bestimmung des Peptidgehaltes wurde mit einem Aminoquant 1090L Analysator (Hewlett-Packard, Waldbronn) durchgeführt. Hierbei wurden die Peptide einer sauren Hydrolyse unterworfen. Es wurden genau ausgewogene Mengen (ca. 100 µg) der Peptide eingesetzt. Die Hydrolyse wurde in einem evakuierten Röhrchen in Gegenwart einer 6 N HCl 90 min bei 150°C durchgeführt. Als interner Standard für die folgende C18-Chromatographie wurden Sarkosin und Norvalin zugesetzt.

#### 4.2.8 Aminosäuresequenzanalyse

Die Sequenzanalyse beruht auf der von Edman entwickelten Methode des schrittweisen N-terminalen Abbaus der einzelnen Aminosäuren durch Reaktion mit Phenylisothiocyanat (PITC) unter Bildung von Phenylthiohydantoin(PTH)-Derivaten [72]. Die Sequenzanalyse der Peptide wurde mit einem vollautomatischen Gasphasen-Protein-Sequenzer Modell 473A (Perkin Elmer/ABI) durchgeführt. Zunächst wurde das in H<sub>2</sub>O gelöste Peptid auf eine Polybrene-beschichtete Glasfasermembran (Whatman) aufgetragen. Die PTH-Derivate wurden über ein RP-HPLC-System getrennt. Nach der Methode von Lottspeich können die hierbei getrennten Aminosäurederivate durch Vergleich mit einem Standard, der die PTH-Derivate der natürlichen Aminosäuren enthält, eindeutig identifiziert werden [73].

#### 4.2.9 Größenausschluß-Chromatographie (SEC)

Zur Bestimmung des Oligomerisierungszustandes von Proguanylin wurde eine Größenausschluß-Chromatographie auf einem Smart-System (Pharmacia, Freiburg) unter Verwendung einer Superdex 75 PC 3.2/30 Säule (Pharmacia, Freiburg) mit einer Flußrate von 40 µl/min durchgeführt. Die UV-Detektion erfolgte durch Messung der Absorption bei 214 nm. Proguanylin wurde in vier verschiedenen Konzentrationen (1 µM, 0,01 mM, 0,1 mM und 1 mM) untersucht. Es wurden zwei verschiedene Puffersysteme verwendet, zum einen ein 50 µM Tris-HCl, 0,2 M NaCl Puffer (pH 7,4) und zum anderen ein 0,1 M Phosphat, 0,1 M NaCl Puffer (pH 5). Zur Kalibrierung wurde eine Mischung aus Rinderserumalbumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Chymotrypsinogen A (24 kDa) und Ribonuklease A (13,7 kDa) verwendet (Pharmacia, Freiburg). Der Verteilungskoeffizient  $K_{av}$  wurde mit folgender Gleichung bestimmt:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

Dabei ist  $V_e$  das Elutionsvolumen,  $V_t$  das Säulenvolumen und  $V_0$  das Ausschlußvolumen der Säule. Der Verteilungskoeffizient ist direkt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes. Anhand der resultierenden Eichgerade kann das Molekulargewicht der zu untersuchenden Probe bestimmt werden.

#### 4.2.10 Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR)

Alle NMR-spektroskopischen Strukturuntersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Professor Paul Rösch am Lehrstuhl für Struktur und Chemie der Biopolymere, Universität Bayreuth, von Dr. Ute C. Marx durchgeführt.

Eine detaillierte Durchführung der NMR-Messungen und Strukturberechnungen für Proguanylin wurde bereits veröffentlicht [74]. Die NMR-Spektren wurden an einem Bruker DRX600-Spektrometer bei 284 und 293 K mit einer spektralen Bandbreite von 6613,8 Hz und mit  $4096 \times 512$  oder 700 Datenpunkten unter Standardbedingungen aufgenommen [75]. Proguanylin wurde mit einer Peptidkonzentration von 2,4 mM in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9:1, v/v, 500 µl), pH 3,3 gemessen. Die Prozessierung und Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programmpaket NDee (SpinUp, Lünen).

#### 4.2.11 Circular dichroismus (CD)

CD-Spektren wurden bei 19,8°C in einer 0,1 cm-Zelle und einem Wellenlängenbereich von 250 bis 190 nm mit einer Aufnahmegeschwindigkeit von 20 nm/min aufgenommen. Es wurde ein Jasco J 600A CD-Spektropolarimeter verwendet. Die Proguanylinkonzentration für die Messungen betrug 7 µM in Wasser. Die Spektren wurden zehnmal aufgenommen und der Mittelwert gebildet. Als Referenzprobe diente Wasser.

#### 4.2.12 cGMP-Bioassay

Zur Detektion der Bioaktivität der synthetischen Peptide wurde die T84-Zelllinie verwendet. Diese exprimiert von den in der Literatur bekannten Guanylatzyklasen ausschließlich die GC-C [76]. Die Erhöhung der cGMP-Konzentration innerhalb dieser Zellen ist somit ein indirektes, aber spezifisches Maß für die Aktivierung dieses Rezeptors [39]. Zunächst wurden unterschiedlich konzentrierte Lösungen der synthetischen Peptide ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) angesetzt. Die Konzentrationen bezogen sich auf den vorher bei der ASA ermittelten tatsächlichen Aminosäuregehalt der Proben. Kultivierte humane Kolonkarzinomzellen (T84) wurden bei 37°C für 45 min in Gegenwart des Phosphodiesteraseinhibitors IBMX (1 mM, Sigma) mit den Peptidproben inkubiert. Die Nährlösung für die T84-Zellen setzte sich folgendermaßen zusammen: DMEM/HAM'SF12 1:1 mit HEPES-Puffer + 1% L-Glutamin + 0,5 ml Penicillin/Streptomycin pro 100 ml Medium. Anschließend wurden die Zellen in Ethanol bei -20°C tiefgefroren, wobei sie lysiert wurden. Alle Proben wurden in zwei unterschiedlichen Wells doppelt gemessen. Die Menge des intrazellulär gebildeten cGMP wurde anschließend

durch einen spezifischen cGMP-Radioimmunoassay (RIA) oder durch einen spezifischen ELISA (IHF, Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung GmbH, Hamburg) detektiert [77]. Im RIA und im ELISA wurden pro cGMP-Probe jeweils Doppelwerte gemessen. Die qualitativen Ergebnisse des ELISA und des RIA sind vergleichbar.

#### **4.2.13 Rezeptorbindungsstudien**

Alle Rezeptorbindungsstudien wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Yuji Hidaka von der Arbeitsgruppe von Professor Yasutsugu Shimonishi (Institute for Protein Research, Osaka University, Japan) durchgeführt.

Die spezifische Bindung der Peptide an GC-C wurde an Membranpräparationen von 293T-Zellen, die mit der Guanylatzyklase-C stabil transfiziert sind, gemessen [78]. 20 µl einer  $6 \times 10^{-6}$  M Lösung der Peptide wurden mit 60 µl PBS, 10 µl radioaktiv markiertem heat-stable Enterotoxin ( $^{125}\text{I}$ -STp-(4-17)) und 30 µL der membranpräparierten GC-C für 1 h bei 37°C inkubiert (Peptidkonzentration  $1 \times 10^{-6}$  M) [79]. Anschließend wurden die Proben eisgekühlt, und die Membranen wurden auf einem GF/C-Filter (Whatman) konzentriert. Die Filter wurden mit PBS gewaschen und die Radioaktivität wurde im Gamma-Zähler gemessen. Es wurden jeweils Doppelwerte gemessen.

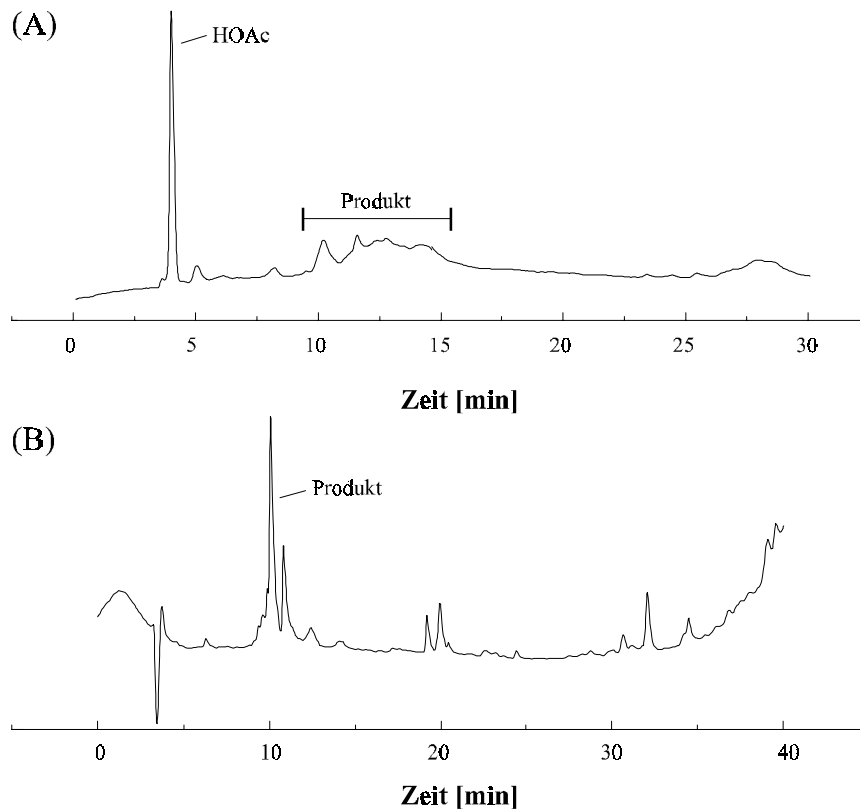
## 5. Ergebnisse

### 5.1 Peptidsynthesen

Die Peptide wurde mittels der von Merrifield entwickelten Festphasenpeptidsynthese an polymeren Trägerharzen synthetisiert [80]. Der Aufbau der Peptidkette beginnt am C-Terminus des Peptides. Die Aminosäuren werden N-terminal mittels der basenlabilen Schutzgruppe Fmoc geschützt, die sich durch Piperidin abspalten läßt. Zur Aktivierung der Carboxylfunktion wird HBTU eingesetzt, welches die Aminosäure zu einem Aktivester umwandelt. Dieser reagiert mit der freien Aminofunktion der am Harz gebundenen Peptidkette unter Ausbildung der Peptidbindung. Nach erfolgtem Kettenaufbau wird das Peptid mit TFA vom Trägerharz abgelöst, wobei auch gleichzeitig die säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen entfernt werden. Das so erhaltene Rohpeptid mit zwei freien Thiofunktionen wird durch Luftoxidation zum Monozyklus oxidiert. In einer zweiten Oxidation werden anschließend die beiden Acn-geschützten Cysteine verbrückt, wodurch bityklische Peptide erhalten werden.

#### 5.1.1 Synthese von Guanylin-Derivaten

Guanylin war schon länger in synthetischem Sinne als "schwierige Sequenz" bekannt, d.h. im fortschreitenden Verlauf der Festphasensynthese traten zunehmend Fehlsequenzen auf. Im Laufe dieser Arbeit zeigte sich, daß es von Vorteil war, die letzten drei Aminosäuren in der Guanylinsequenz, Pro-Gly-Thr, doppelt und mit erhöhter Acylierungszeit zu koppeln, weil vermutlich durch Aggregation die Solvation der Peptidkette im Laufe der Synthese abnahm. Wurden diese Doppelkopplungszyklen nicht verwendet, so traten gehäuft Fehlsequenzen im Rohprodukt auf, was die Ausbeuten drastisch reduzierte. Die Einführung eines hydrophoben Alanins in das ohnehin eher hydrophobe Guanylin wirkte sich abhängig von der Position der Substitution negativ auf die Gesamtausbeute aus. Auf der Stufe der linearen Rohpeptide war die Löslichkeit der Peptide im pH-Bereich von 2-7 sehr gering.



**Abbildung 8:** HPLC-Analytik von Guanylin-(101-115). (A): lineares Rohpeptid in Essigsäure/Acetonitril; (B): Rohpeptid nach 1 Tag Luftoxidation in Wasser bei pH 8.

Es war nicht möglich, eine aussagekräftige RP-HPLC-Analytik der Rohpeptide durchzuführen, was möglicherweise auf die freien Thiofunktionen zurückzuführen ist. Bei der ES-MS-Analyse bereiteten die freien SH-Gruppen jedoch keine Schwierigkeiten. Deshalb wurde zur Charakterisierung der Syntheseprodukte die HPLC-Analytik nach der Einführung der ersten Disulfidbrücke herangezogen, da es auf dieser Stufe möglich war, aussagekräftige Chromatogramme zu erhalten. Fehlsequenzen in den Rohprodukten äußerten sich häufig in sehr dicht beieinander eluierenden HPLC-Peaks, was die präparative Aufreinigung einiger Derivate des L-Alaninscans von Guanylin erschwerte. Als häufigste Fehlsequenzen sollen hier nur die Aminosäuren Thr<sup>103</sup> und Ile<sup>106</sup> genannt werden, die beide auf ein Cystein folgen und  $\beta$ -verzweigte Seitenketten tragen.

**Tabelle 1:** Aminosäuresequenzen und Ausbeuten der monozyklischen Guanylderivate des Alaninscans in etwa 90% Reinheit.

Nr.	Name	Peptidsequenz	MW <sub>berechnet</sub> [Da]	MW <sub>ES/MS</sub> [Da]	Ausbeute [mg]
1	Guanylin	PGTCEIC*AYAACTGC*	1602,6	1603,5	14,08 <sup>(d)</sup>
2	GuaAla1	PGTCEIC*AYAACTAC*	1616,6	1617,0	12,16
3	GuaAla2	PGTCEIC*AYAACAGC*	1572,6	1573,5	11,34
4	GuaAla3	PGTCEIC*AAAACACTGC*	1510,4	1510,5	20,11
5	GuaAla4	PGTCEAC*AYAACTGC*	1560,5	1561,0	14,24
6	GuaAla5	PGTCAIC*AYAACTGC*	1544,6	1544,5	5,00 <sup>(c)</sup>
7	GuaAla6	PGACEIC*AYAACTGC*	1572,6	1573,0	11,85
8	GuaAla7	PATCEIC*AYAACTGC*	1616,6	1616,0	10,41
9	GuaAla8	AGTCEIC*AYAACTGC*	1576,6	1576,5	17,06
10	desGly <sup>102</sup> Gua	P_TCEIC*AYAACTGC*	1545,6	1546,0	24,50
11	Guanylin (Ratte)	DPNTCEIC*AYAACTGC*	1774,7	1774,0	1,73 <sup>(a)</sup>
12	Guanylin	PGTCEIC*AYAACTGC*	1602,6	1603,5	22,58 <sup>(b)</sup>

<sup>(a)</sup> Nach zwei chromatographischen Reinigungsschritten mit Phosphatpuffer und anschließender Entsalzung,

<sup>(b)</sup> Synthese am 2-Cl-Trt-Harz, <sup>(c)</sup> nach zwei chromatographischen Aufreinigungen mit Standardpuffer,

<sup>(d)</sup> Synthese am TentaGel-Harz; C\* = Cys(Acm); die nicht markierten Cysteinreste sind jeweils disulfidverbrückt.

Die meisten Synthesen mußten doppelt durchgeführt werden, weil der Anteil an Fehlsequenzen zu groß war und kein sauberes Produkt erhalten wurde. Rattenguanylin 16mer (Tabelle 1, Nr. 11) mußte sogar zweimal mit einem Phosphatpuffer bei pH 7 aufgereinigt werden, da es zu viele Verunreinigungen aufwies. Für das originale Guanylin wurde zusätzlich zu den an TentaGel durchgeführten Synthesen eine Darstellung an einem 2-Cl-Trt-Harz durchgeführt. Die Ausbeute des monozyklischen Produktes war dabei deutlich höher als bei den Synthesen am TentaGel. Dies könnte auf die Beschaffenheit des Harzes zurückgeführt werden. Für Uroguanylin wurde eine genauere Untersuchung der Auswirkung von verschiedenen Harztypen auf die Syntheseausbeute unternommen (siehe 5.1.2). In Tabelle 1 sind die Ausbeuten der erhaltenen monozyklischen Derivate der Guanylinpeptide aufgeführt.

**Tabelle 2:** Sequenzen und Ausbeuten der bizyklischen synthetischen Guanylinpeptide.

Nr.	Name	Peptidsequenz	MW <sub>berechnet</sub> [Da]	MW <sub>ES/MS</sub> [Da]	Ausbeute [mg]
1	Guanylin	PGTCEICAYA AACTGC	1458,6	1457,5	3,59
2	GuaAla1	PGTCEICAYA AACTAC	1472,6	1472,5	1,88
3	GuaAla2	PGTCEICAYA ACAGC	1428,6	1428,5	2,75
4	GuaAla3	PGTCEICAAA AACTGC	1366,4	1366,5	1,91
5	GuaAla4	PGTCEACAYA AACTGC	1416,5	1416,5	0,92
6	GuaAla5	PGTCAICAYA AACTGC	1400,6	1400,5	1,77
7	GuaAla6	PGACEICAYA AACTGC	1428,6	1428,2	3,72
8	GuaAla7	PATCEICAYA AACTGC	1472,6	1472,5	1,89
9	GuaAla8	AGTCEICAYA AACTGC	1432,6	1432,5	2,59
10	desGly <sup>102</sup> Gua	P_TCEICAYA AACTGC	1401,6	1402,8	2,40
11	Guanylin (Ratte)	DPNTCEICAYA AACTGC	1630,7	1630,5	1,18
12	Guanylin	PGTCEICAYA AACTGC	1458,6	1457,7	5,96

Die Iodoxidation der monozyklischen Acm-geschützten Guanylinderivate verlief ohne nennenswerte Nebenreaktionen [81]. Die Reaktionszeit von 60 min erwies sich dabei als ausreichend, um eine quantitative Abspaltung der Thiolschutzgruppen mit anschließender Zyklisierung zu erreichen. Die Reinigung der Reaktionsmischung war nach der Iodoxidation unproblematisch, da ausschließlich vereinigte monozyklische Peptide eingesetzt wurden. Die Gesamtausbeuten der für die biologische Charakterisierung benötigten Peptide lagen im Bereich zwischen 1 und 5 mg. Während für die Bioassays schon etwa 50-100 µg pro Peptid ausreichen, sollten für NMR-strukturelle Untersuchungen jedoch etwa 1,5 bis 2 mg der Peptide vorliegen. In Tabelle 2 sind die Ausbeuten der Endprodukte der Guanylinsynthesen angegeben.

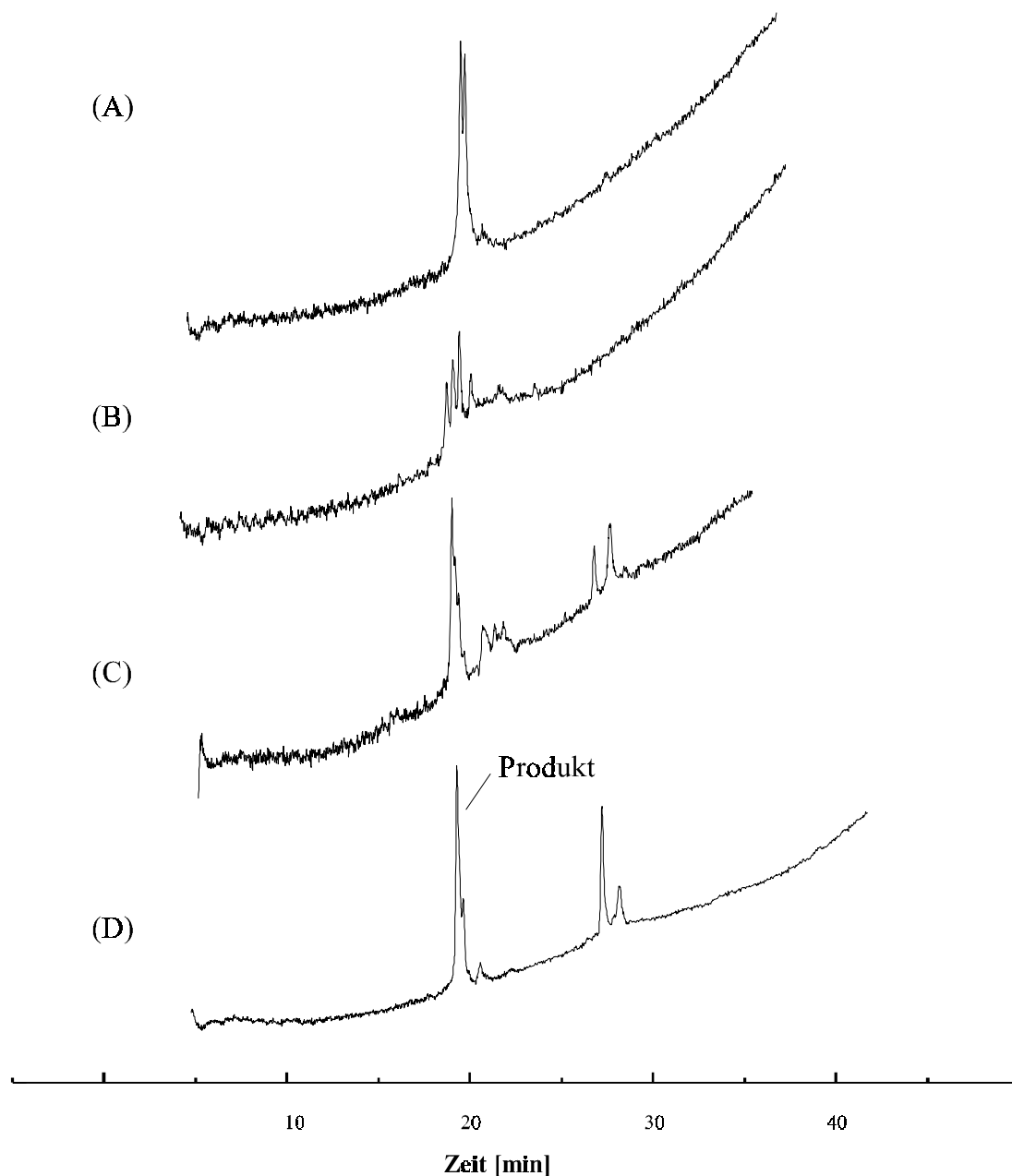
Die bizyklischen Produkte wurden zur Charakterisierung durch HPLC bei 50°C und bei 11°C untersucht. Alle Peptide ergaben bei 50°C einen homogenen Peak, während bei 11°C bei allen Derivaten, außer bei UroAla3, zwei Peaks detektiert wurden. Um sicherzugehen, daß es sich dabei um die topologischen Isomere der Peptide handelt, wurden die Peptide mit Chymotrypsin, das hinter dem Tyrosin spaltet, behandelt und anschließend chromatographisch bei 11°C analysiert. Nach Chymotrypsinbehandlung war bei allen



Derivaten statt eines Doppelpeaks nur noch ein Peak mit einem um 18 Da erhöhten Molekulargewicht bei 11°C Säulentemperatur zu detektieren. Dies ist der eindeutige Beweis dafür, daß es sich um topologische Isomeren handelt. Die bei tiefer Temperatur auftretenden Doppelpeaks wurden zusätzlich noch fraktioniert und rechromatographiert. Über die Ergebnisse dieser Analysen wird näher im Kapitel 5.2 berichtet. Das Guanylinderivat GuaAla<sub>3</sub>, das bei der Tieftemperaturanalyse nur einen Peak zeigte, konnte nicht in der Mitte des Peptides gespalten werden, da das Tyrosin gegen Alanin substituiert ist. Deshalb wurden NMR-spektroskopische Analysen mit diesem Derivat unternommen. Auch für dieses Peptid konnten eindeutig zwei topologische Isomeren nachgewiesen werden, da eindeutig die zwei charakteristischen Spinsysteme der Topoisomeren vorliegen (U. Marx, persönliche Mitteilung).

### 5.1.2 Synthese von Uroguanylin-Derivaten

Für Uroguanylin wurde aufgrund der beim Guanylin gemachten Beobachtungen eine genauere Untersuchung von Synthesen an verschiedenen Syntheseharzen vorgenommen. Hierzu wurden drei verschiedene Harze verwendet. Die Synthese an einem TentaGel S-Trt-Harz, bei der alle Aminosäuren einfach gekoppelt wurden, brachte fast ausschließlich N-terminal verkürzte Uroguanylin-Peptide hervor. Eine zweite Synthese an diesem Harz, bei der die letzten drei Aminosäuren (Asn-Asp-Asp) doppelt gekoppelt wurden und zusätzlich ein Capping-Schritt (Acetylierung nicht umgesetzter Aminogruppen) verwendet wurde, brachte zwar eine Verbesserung, aber der Anteil an Fehlsequenzen war immer noch sehr groß. Durch die Verwendung eines hydrophoberen Wang-Harzes konnte die Synthese nicht verbessert werden. Eine Synthese an einem 2Cl-Trt-Harz mit Doppelkopplungen der letzten drei Aminosäuren, die zusätzlich um 2 h verlängert gekoppelt wurden, brachte das beste Ergebnis (Abbildung 9), so daß in allen weiteren Synthesen vorbelegte Harze dieses Typs verwendet wurden.



**Abbildung 9:** Vergleich der Uroguanylin-synthesen an verschiedenen Harztypen (Analytik nach der Luftoxidation der freien Thiolfunktionen). (A) TentaGel-S-Trt-Harz (Einfachkopplungen); (B) TentaGel-S-Trt-Harz (Doppelkopplungen für NDD + Capping); (C) Wang-Harz (Doppelkopplungen für NDD); (D) 2-Cl-Trt-Harz (um 2 h verlängerte Doppelkopplungen für NDD).

Die Synthesen für den L-Alanin-scan des Uroguanylins verliefen insgesamt besser als die Guanylin-synthesen bezüglich der Qualität des einfach disulfidverbrückten Zwischenproduktes. Als problematischer Sequenzbereich sind nur die letzten drei Aminosäuren zu nennen. Die Ausbeuten der monozyklischen Peptide sind dementsprechend etwas besser als beim Guanylin (Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Peptidsequenzen und Ausbeuten der monozyklischen Uroguanylderivate des Alanin-scans in etwa 90% Reinheit.

Nr.	Name	Peptidsequenz	MW <sub>berechnet</sub> [Da]	MW <sub>ES/MS</sub> [Da]	Ausbeute [mg]
1	Uroguanylin	NDDCELC*VNVACTGC*L	1811,9	1812,0	9,03
2	UroAla1	NDDCELC*VNVACTGC*A	1769,8	1769,5	14,03
3	UroAla2	NDDCELC*VNVACTAC*L	1825,9	1825,5	20,52
4	UroAla3	NDDCELC*VNVACAGC*L	1781,8	1781,5	17,58
5	UroAla4	NDDCELC*VNAACTGC*L	1783,8	1783,5	12,66
6	UroAla5	NDDCELC*VAVACTGC*L	1768,8	1768,7	10,40
7	UroAla6	NDDCELC*ANVACTGC*L	1783,8	1783,5	12,40
8	UroAla7	NDDCEAC*VNVACTGC*L	1769,8	1769,3	12,96
9	UroAla8	NDDCALC*VNVACTGC*L	1753,8	1753,5	22,01
10	UroAla9	NDACELC*VNVACTGC*L	1767,8	1767,5	25,45
11	UroAla10	NADCELC*VNVACTGC*L	1767,8	1767,5	23,41
12	UroAla11	ADDCELC*VNVACTGC*L	1768,8	1768,5	26,09

C\* = Cys(Acm).

Nach der Iodoxidation der Acm-geschützten monozyklischen Peptide entstanden beim Uroguanylin meistens zwei Produkte mit identischem Molekulargewicht, die sich durch RP-HPLC trennen ließen. Besonderheiten gab es bei der Iodoxidation von Uroala1, Uroala3 und Uroala6. Hier konnte durch HPLC unter Standardbedingungen (pH ~ 2) nur ein Produkt detektiert werden. Durch Verwendung eines Phosphat-Puffers bei pH 7 konnten aber auch hier die beiden Isomeren detektiert und chromatographisch getrennt werden, so daß im Bioassay beide Topoisomeren getrennt untersucht werden konnten. In Tabelle 4 sind die Ausbeuten der zweifach disulfidverbrückten Endprodukte aufgelistet.

**Tabelle 4:** Aminosäuresequenzen und Ausbeuten synthetischer Uroguanyline.

Nr.	Name	Peptidsequenz	MW <sub>berechnet</sub> [Da]	MW <sub>ES/MS</sub> [Da]	Ausbeute [mg]
1	Uroguanylin (A)			1668,0	2,07
2	Uroguanylin (B)	NDDCELCVNVACTGCL	1667,9	1667,5	0,84
3	UroAla1 (A)			1625,2	2,30 <sup>(a)</sup>
4	UroAla1 (B)	NDDCELCVNVACTGCA	1625,8	1624,8	1,41 <sup>(a)</sup>
5	UroAla2 (A)			1681,0	1,98
6	UroAla2 (B)	NDDCELCVNVACTACL	1681,9	1682,0	2,58 <sup>(b)</sup>
7	UroAla3 (A)			1637,2	4,35 <sup>(a)</sup>
8	UroAla3 (B)	NDDCELCVNVACAGCL	1637,8	1637,5	1,55 <sup>(a)</sup>
9	UroAla4 (A)			1640,0	2,50
10	UroAla4 (B)	NDDCELCVNAACTGCL	1639,8	1639,5	2,00
11	UroAla5 (A)			1624,2	3,54
12	UroAla5 (B)	NDDCELCVAVACTGCL	1624,8	1624,7	1,94
13	UroAla6 (A)			1640,0	2,07 <sup>(a)</sup>
14	UroAla6 (B)	NDDCELCANVACTGCL	1639,8	1640,0	2,05 <sup>(a)</sup>
15	UroAla7 (A)			1625,2	1,92
16	UroAla7 (B)	NDDCEACVNVACTGCL	1625,8	1625,0	0,91
17	UroAla8 (A)			1609,2	6,47
18	UroAla8 (B)	NDDCALCVNVACTGCL	1609,8	1610,0	2,53
19	UroAla9 (A)			1623,5	4,02
20	UroAla9 (B)	NDACELCVNVACTGCL	1623,8	1623,2	4,18
21	UroAla10 (A)			1623,2	1,28
22	UroAla10 (B)	NADCELCVNVACTGCL	1623,8	1623,2	2,00
23	UroAla11 (A)			1624,7	2,19 <sup>(c)</sup>
24	UroAla11 (B)	ADDCELCVNVACTGCL	1624,8	1624,7	3,37

<sup>(a)</sup> pH 7-Reinigung und anschließende Entsalzung; <sup>(b)</sup> nach drei HPLC-Schritten (pH ~ 2); <sup>(c)</sup> nach zwei HPLC-Schritten (pH ~2); (A) = Isomer A; (B) = Isomer B.

Die Ausbeuten der Uroguanylinsynthesen waren insgesamt besser als die der Guanylinsynthesen. Es konnten von allen Peptiden die beiden Isomeren getrennt und die A-Formen in Ausbeuten isoliert werden, die sowohl eine biologische Charakterisierung der Peptide als auch NMR-spektroskopische Untersuchungen erlaubten. Zur weiteren Charakterisierung der Endprodukte wurden diese noch bezüglich der Isomerisierungscharakteristik untersucht (s. 5.2).

### 5.1.3 Synthese von chimeren GC-C-Liganden

Guanylin, Uroguanylin und STa weichen signifikant in der Primärstruktur zwischen den inneren Cysteinen voneinander ab. Daher wurden zusätzlich zu den L-Alaninscan-Peptiden chimere Peptide aus Guanylin, Uroguanylin und STa dargestellt. In diesen Peptiden wurde zum einen der zentrale Bereich aus STa in Guanylin und Uroguanylin eingesetzt und zum anderen der mittlere Bereich aus Uroguanylin in Guanylin eingefügt und umgekehrt. Ein Guanylin-Derivat mit der dritten Disulfidbrücke vom STa wurde ebenfalls dargestellt. Dieses Derivat sollte durch oxidative Faltung aus einem linearen Vorläufermolekül mit sechs freien Thiolfunktionen synthetisiert werden. Es konnten drei verschiedene, vollständig verbrückte sechs-Cystein-Guanyline isoliert werden, über deren Verbrückungsmuster allerdings keine Aussage getroffen werden konnte. Die Hybride aus Guanylin, Uroguanylin und STa wurden an 2Cl-Trt-Harzen synthetisiert. Die Ausbeuten der monozyklischen Produkte sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

**Tabelle 5:** Aminosäuresequenzen und Ausbeuten monozyklischer chimerer Peptide in etwa 90% Reinheit.

Nr.	Name	Peptidsequenz	MW <sub>berechnet</sub> [Da]	MW <sub>ES/MS</sub> [Da]	Ausbeute [mg]
1	Gua-Uro	PGTCEIC*VNVACTGC*	1609,6	1609,5	34,24
2	Gua-STa	PGTCEIC*ANPACTGC*	1579,6	1579,2	25,22
3	Uro-Gua	NDDCELC*AYAACTGC*L	1804,8	1805,0	18,13
4	Uro-STa	NDDCELC*VNPACTGC*L	1809,8	1809,5	35,65

C\* = Cys(Acm).

Auffällig ist, daß die Ausbeuten der monozyklischen Chimere alle höher sind als die Ausbeuten der L-Alaninderivate von Guanylin und Uroguanylin. Bei der Iodoxidation der monozyklischen Zwischenstufen entstand bei den Guanylin-Chimeren (Gua-Uro, Gua-STa) jeweils wie erwartet ein bizyklisches Produkt. Bei den Uroguanylin-Chimeren entstanden entsprechend zwei isomere Produkte mit identischem Molekulargewicht. Diese konnten durch RP-HPLC voneinander getrennt werden (Tabelle 6).

**Tabelle 6:** Aminosäuresequenzen und Ausbeuten der chimeren GC-C-Liganden.

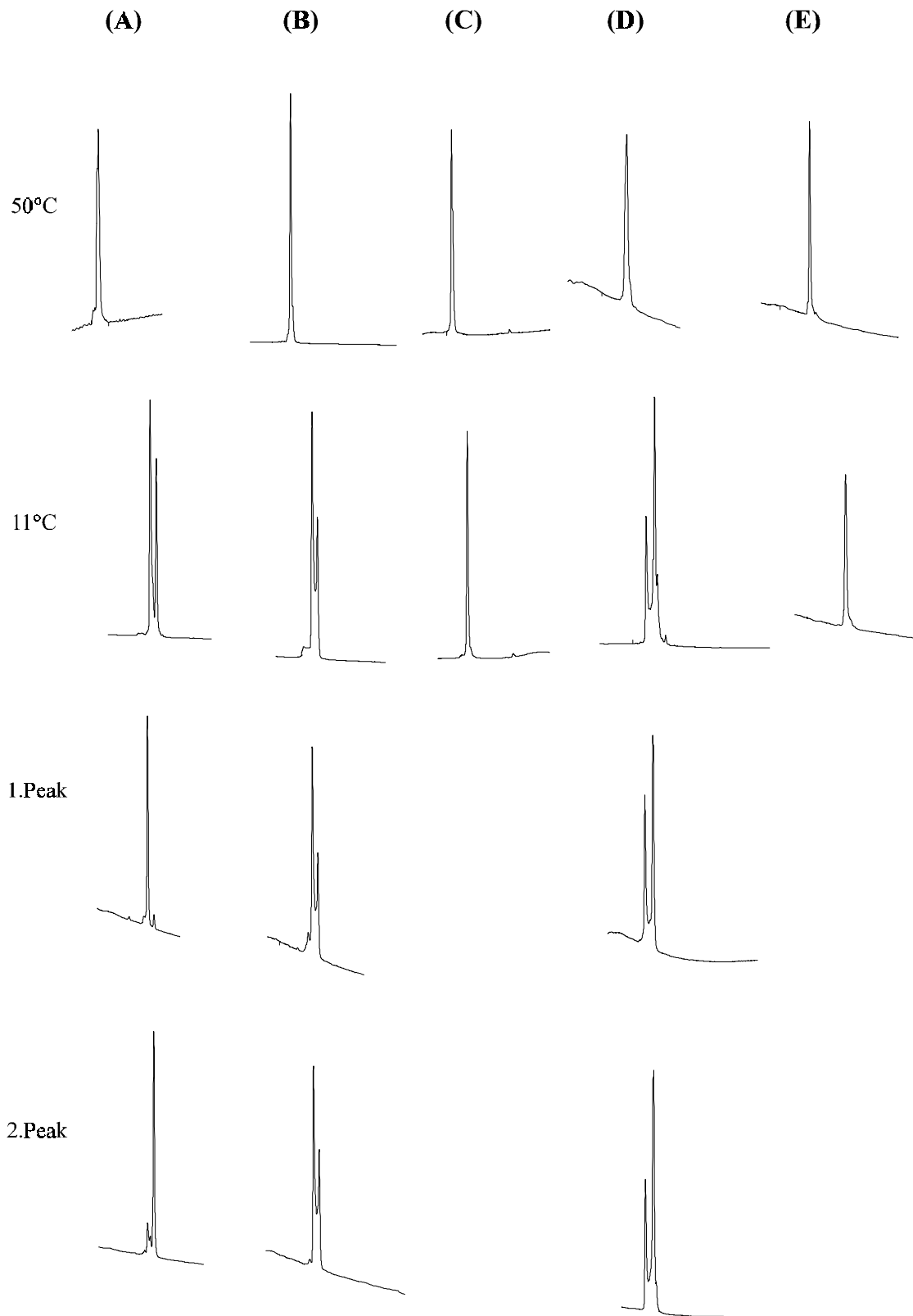
Nr.	Name	Peptidsequenz	MW <sub>berechnet</sub> [Da]	MW <sub>ES/MS</sub> [Da]	Ausbeute [mg]
1	Gua-Uro	PGTCEICVNVACTGC	1465,7	1465,2	22,36
2	Gua-STa	PGTCEICANPACTGC	1435,6	1434,7	5,79
3	Uro-Gua (A)			1659,7	1,77 <sup>(a)</sup>
4	Uro-Gua (B)	NDDCELCA <del>Y</del> A <del>A</del> CTGCL	1660,8	1660,2	3,69
5	Uro-STa (A)			1665,7	11,42 <sup>(a)</sup>
6	Uro-STa (B)	NDDCELCVNPACTGCL	1665,8	1665,5	2,94 <sup>(a)</sup>

<sup>(a)</sup> Nach zwei HPLC-Schritten mit Standardpuffer; (A) = Isomer A; (B) = Isomer B.

Zur weiteren Charakterisierung wurden die Guanylin-Chimeren bei 11°C chromatographisch analysiert. Gua-STa spaltete dabei in zwei Peaks auf, während Gua-Uro nur eine Schulter ausbildete. Vom Gua-Uro-Chimeren wurden bisher noch keine NMR-Untersuchungen durchgeführt, so daß nicht klar ist, ob dieses Derivat auch aus zwei Isomeren besteht. Allerdings wurde ein entsprechendes 17 Aminosäuren langes Chimer aus Guanylin und Uroguanylin NMR-spektrometrisch untersucht [40]. Dabei wurde die Existenz von zwei Isomeren nachgewiesen. Die Uroguanylin-Chimeren werden in Kapitel 5.2 ausführlicher behandelt.

## 5.2 Topologische Isomerie der synthetischen Peptide

Um die Auswirkungen der einzelnen Seitenkettensubstitutionen der Alaninscanderivate auf die topologische Isomerie zu untersuchen, wurden die Guanylinderivate bei 11°C durch HPLC analysiert. Die entstandenen Peaks wurden separiert und rechromatographiert. Signifikante Unterschiede zum Verhalten von originalem Guanylin zeigten GuaAla1, GuaAla2, GuaAla3, GuaAla4 und desGly<sup>102</sup>Guanylin. Die HPLC-Analysen dieser Peptide sind in Abbildung 10 dargestellt. Die Substitution Gly114Ala in GuaAla1 bewirkte, daß die beiden bei 11°C auftretenden Peaks wesentlich langsamer interkonvertierten. Der Austausch Thr113Ala bewirkte eine Erhöhung der Umwandlungsgeschwindigkeit. Es war nicht möglich, ein Isomer nach der chromatographischen Trennung anzureichern.



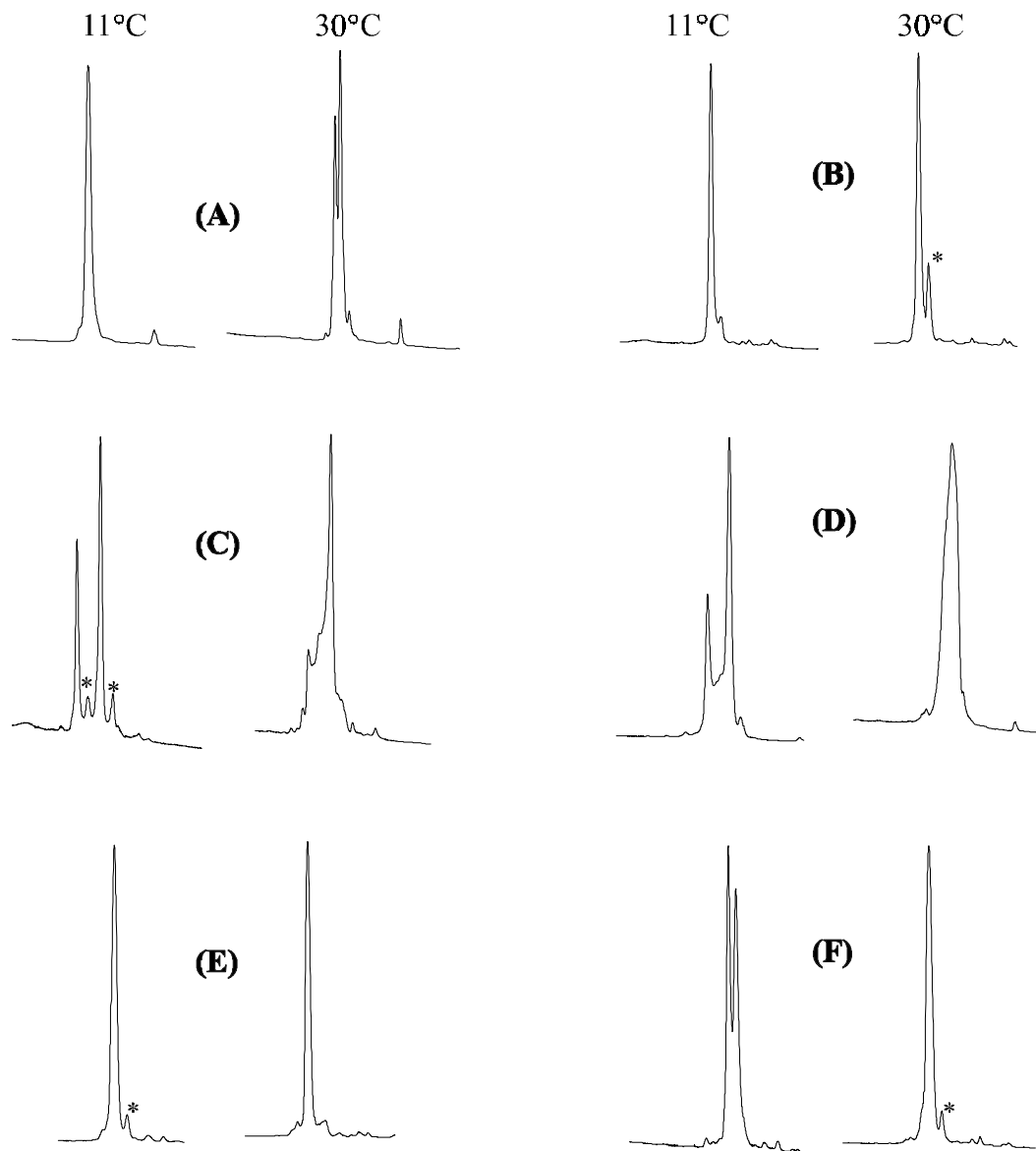
**Abbildung 10:** Chromatographische Analysen der isomeren Interkonversion von Guanylin-Alanin-peptiden. (A) GuaAla1; (B) GuaAla2; (C) GuaAla3; (D) GuaAla4; (E) desGly<sup>102</sup>Guanylin. Die bei 11°C entstehenden Peaks wurden fraktioniert, lyophilisiert und direkt vor der Rechromatographie in Wasser aufgenommen und injiziert. Es wurde der Standard-HPLC-Puffer mit einem Gradienten von 20-80% B in 30 min verwendet.

Normalerweise wird nach der chromatographischen Trennung der beiden Isomere das Ausgangsisomer etwas angereichert (siehe Abbildung 7). Bei der chromatographischen Analyse des bityklischen GuaAla3 mit dem Austausch Tyr109Ala fiel auf, daß bei 11°C nur ein Peak detektierbar war. Durch NMR-Spektroskopie wurden aber auch hier zwei Isomeren eindeutig nachgewiesen. Das Aufspaltungsmuster von GuaAla4 mit dem Austausch Ile106Ala zeigte ein anderes Bild als die normalerweise vorhandene Aufspaltung im Verhältnis von ca. 6:4 zugunsten des ersten Peaks. In diesem Derivat war der zweite Peak die bevorzugte Isoform. Auch hierbei war es nicht möglich, ein Isomer anzureichern, was für eine Geschwindigkeitserhöhung bei der Umwandlung spricht. In GuaAla5 mit der Substitution Glu105Ala wurde ebenfalls eine geringe Geschwindigkeitserhöhung der Umwandlung des zweiten in den ersten Peak beobachtet. GuaAla6, GuaAla7 und GuaAla8 zeigten unter normalen HPLC-Bedingungen eine sehr geringe Aufspaltung in zwei Peaks. Sie verhielten sich ansonsten aber ähnlich dem Wildtyp-Guanylin. DesGly<sup>102</sup>Guanylin, das N-terminal nur zwei Aminosäuren besitzt, zeigte wie auch schon GuaAla3 bei tiefer Temperatur keine Aufspaltung in zwei Peaks. Unter Verwendung von HPLC-Laufmitteln mit einem pH von 5,7 spaltete auch dieses Peptid in zwei Peaks auf. Eine Rechromatographie dieser Peaks wurde allerdings nicht durchgeführt.

Zusätzlich zu der Analyse mit dem Standardpuffersystem (pH ~ 2) wurde eine HPLC-Analyse mit einem Puffersystem bei pH 5,7 durchgeführt. Hierbei wurden die Peptide allerdings nicht rechromatographiert, sondern nur bei 11°C und bei 30°C analysiert. Es traten bei einigen Peptiden Abweichungen im Vergleich zur Analyse bei pH ~ 2 auf. So spaltete GuaAla1 bei 11°C nicht in zwei Peaks auf, dafür aber bei 30°C. GuaAla3 zeigte auch in diesem Puffersystem keinen Doppelpeak. GuaAla4 spaltete bei 11°C zu zwei Peaks auf, bei 30°C allerdings wurde kein scharfer, sondern ein mit einer großen Schulter eluierender Peak detektiert. Möglicherweise handelt es sich dabei um konformativ unterschiedliche Zwischenstufen, die bei der Umwandlung entstehen. GuaAla5 ergab bei 30°C ebenfalls nur einen breiten, schultrigen Peak, so daß davon ausgegangen werden muß, daß die saure Aminosäure Glu<sup>105</sup> und das sterisch anspruchsvolle Ile<sup>106</sup> bei der Umwandlung eine Rolle spielen. GuaAla6 spaltete weder bei hoher noch bei tiefer Temperatur zu zwei Peaks auf. Guanylin-(101-115) verhielt sich in diesem Puffersystem wie in dem Standardpuffersystem bei pH 2. Es wurden bei 11°C zwei Peaks, bei 30°C dagegen nur ein Peak detektiert. Die Analysen sind in Abbildung 11 dargestellt. Die anderen L-Alanin-Scanning-Peptide zeigten ein ähnliches HPLC-Verhalten wie das Wildtyp-Guanylin.



Die chimeren Peptide aus Guanylin und Uroguanylin bzw. STa wurden ebenfalls bezüglich ihres HPLC-Verhaltens bei verschiedenen Trenntemperaturen charakterisiert. Das Hybrid aus Guanylin und STa spaltete bei der Analyse bei tiefer Temperatur zu zwei Peaks in einem Verhältnis von 40:60 auf. Bei der Rechromatographie lag der später eluierende Peak immer bevorzugt vor, was auf eine schnelle Umwandlung hindeutet.

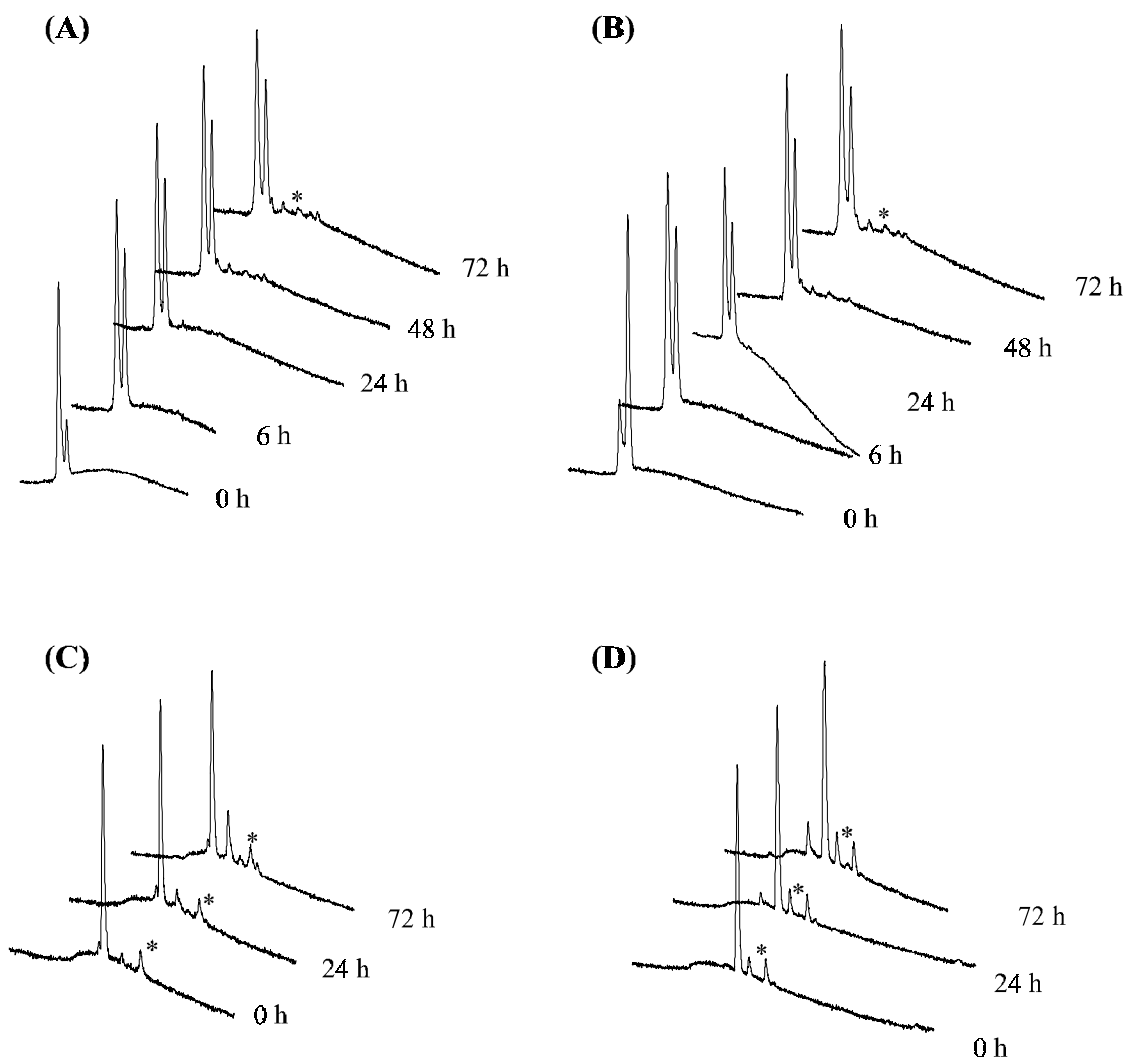


**Abbildung 11:** Chromatographische Analysen ausgewählter Peptide des Alaninscans vom Guanylin mit einem Laufmittelsystem bestehend aus Eluens A: 10 mM NH<sub>4</sub>Ac, pH 5,7; Eluens B: 10 mM NH<sub>4</sub>Ac/Acetonitril 20:80. Gradient 0-45% B in 90 min. (A): GUAAla1; (B): GUAAla3; (C): GUAAla4; (D) GUAAla5; (E) GUAAla6; (F): Guanylin-(101-115); \* = Verunreinigungen.

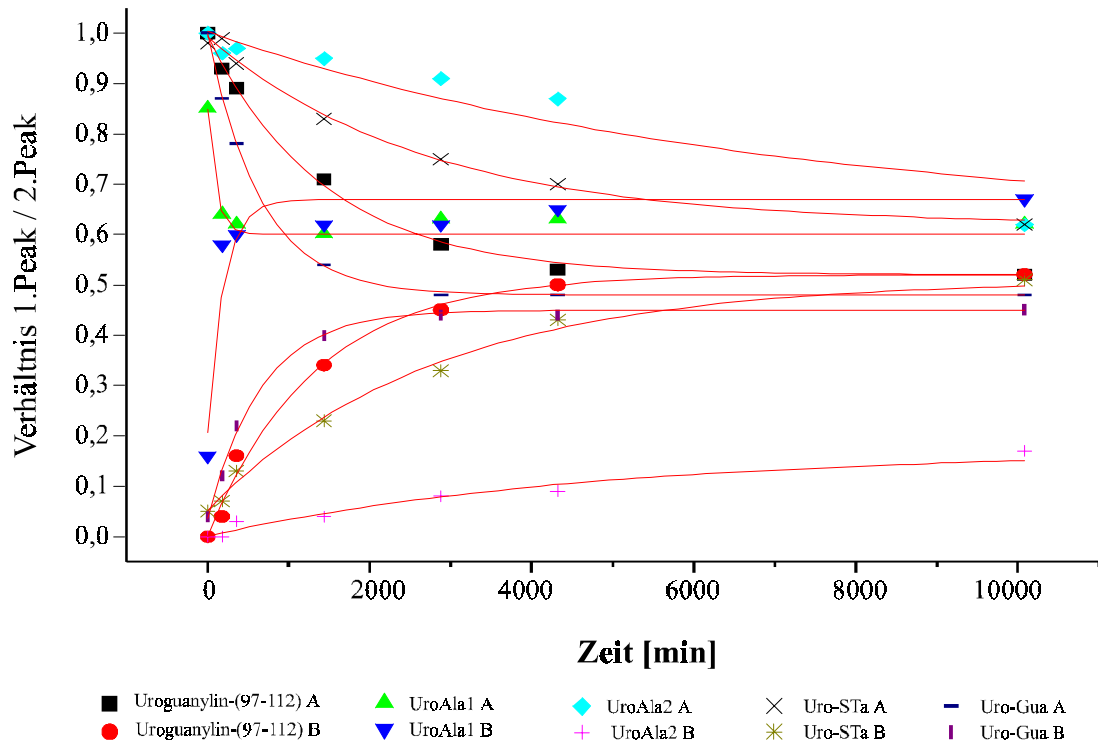
Das Chimere aus Guanylin und Uroguanylin spaltete unter Standardbedingungen nicht in zwei Peaks auf, sondern eluierte nur mit einer kleinen Schulter. Dies ist ein ähnliches Verhalten, wie es ein 17 Aminosäuren langes Guanylin-Uroguanylin-Hybrid zeigte, bei dem durch NMR-Spektroskopie eindeutig die Existenz zweier Isomere gezeigt wurde [40].

Alle L-Ala-enthaltenden Mutanten des Uroguanylins ließen sich dauerhaft voneinander separieren, so daß bei ihnen eine genauere kinetische Untersuchung bezüglich der gegenseitigen Umwandlung der Isomeren durchgeführt werden konnte. Dazu wurden die separierten Isoformen in Wasser (pH 4-5) bei 37°C inkubiert, nach 3, 6, 24, 48, 72 und 168 h Proben entnommen und diese über HPLC analysiert. Die Fläche unter den Peaks diente als Maß für die Quantifizierung der Umwandlung. Als Laufmittelsystem wurde ein NH<sub>4</sub>Ac-Puffer (10 mM, pH 5,7) gewählt, da bei Verwendung des Standardpuffers nicht alle Isomeren detektierbar waren. In Abbildung 12 sind beispielhaft für diese Versuche die Chromatogramme der Umwandlung von UroAla1 und UroAla2 dargestellt. Diese zeigten auch die größten Abweichungen vom Umwandlungsverhalten des Wildtyp-Uroguanylins. Die Umwandlung von UroAla1 verläuft sehr schnell. So ist nach 3 h schon fast der Endwert des Peakverhältnisses erreicht. Der letzte Zeitwert war bei allen Umwandlungen durch einen beginnenden Disulfidaustausch der Peptide beeinträchtigt. Die Isomerisierung von UroAla2 verläuft bedingt durch den Austausch von Gly<sup>110</sup> gegen das sterisch anspruchsvollere Ala sehr viel langsamer als beim Uroguanylin-(97-112). Hier war der Endwert der Umwandlung nach 168 h noch nicht erreicht. Allerdings verlief die Umwandlung ausgehend von der A- zur B-Form schneller als die Umwandlung von der B- in die A-Form. Diese Beobachtung wurde auch bei anderen Derivaten gemacht, zum Beispiel bei UroAla6 und UroAla10.

Es kann angenommen werden, daß die Reaktion nach erster Ordnung abläuft, da keine Zwischenprodukte detektiert werden konnten. Ausgehend von den Endwerten der Umwandlung konnte somit die Gleichgewichtskonstante K berechnet werden, da im Gleichgewicht  $k_{\text{hin}} = k_{\text{rück}}$  ist. Die Anfangsgeschwindigkeiten wurden aus der Steigung der in Abbildung 13 dargestellten Graphen berechnet. Durch ein exponentielles Fitting konnten die Zeiten, die bis zum Erreichen des Gleichgewichtes benötigt werden, bestimmt werden. Sie sind in Tabelle 7 zusammengefaßt und mit  $\tau$  bezeichnet.



**Abbildung 12:** HPLC-Analysen der Kinetik der konformativen Interkonversionen von UroAla1 und UroAla2 nach verschiedenen Zeiten. Die Isomerisierungen wurde bei 37°C in wässriger Lösung untersucht. (A) UroAla1 A→B; (B) UroAla1 B→A; (C) UroAla2 A→B; (D) UroAla2 B→A. Gradient 10-70% B in 60 min. Eluens A, 10 mM NH<sub>4</sub>OAc in H<sub>2</sub>O, pH 5,7; Eluens B, 10 mM NH<sub>4</sub>OAc in 80% Acetonitril/H<sub>2</sub>O; \* = Verunreinigungen.



**Abbildung 13:** Kinetik der Isomerisierung verschiedener Uroguanylin-derivate. Es wurden die Umwandlungen des ersten in den zweiten Peak und die Umwandlungen des zweiten in den ersten Peak aufgetragen. Die Datenpunkte wurden mit Hilfe von Microcal Origin entsprechend einem exponentiellen Verlauf erster Ordnung angepasst.

In Tabelle 7 sind die Gleichgewichtskonstanten und die Anfangsgeschwindigkeiten für alle untersuchten Uroguanylin-derivate aufgelistet. Die Umwandlungen der Chimeren aus Uroguanylin und Guanylin bzw. STa wurden ebenfalls untersucht. Für UroAla2 konnten keine Werte berechnet werden, da die Umwandlung nach 168 h noch nicht ihr Gleichgewicht erreicht hatte.

**Tabelle 7:** Berechnete Gleichgewichtskonstanten der Umwandlungsreaktionen verschiedener Uroguanylderivate. Signifikante Abweichungen zur Umwandlungsgeschwindigkeit von Wildtyp-Uroguanylin sind rot gekennzeichnet.

<b>Umwandlung A- zur B-Form</b>						
Peptid	K	Fehler [%]	$k_{\text{Anfang}}$ [1/min $\times 10^{-4}$ ]	Fehler [%]	$\tau$ [min]	Fehler [%]
Uroguanylin	0,956	1,7	3,23	2,6	1521,11	6,7
UroAla 1	0,612	0	<b>13,3</b>	3,9	61,018	16,9
UroAla 3	0,672	2,8	<b>1,53</b>	4,3	1359,63	18,5
UroAla 4	1,155	5,2	3,23	1,9	1337,19	17,3
UroAla 5	1,247	5,1	<b>9,51</b>	2,3	569,72	22,4
UroAla 6	2,225	0	<b>6,19</b>	1,2	832,14	9,0
UroAla 7	1,564	0	2,31	0,2	3285,7	6,0
UroAla 8	1,127	0	2,61	1,6	1876,43	3,3
UroAla 9	1,631	0	2,92	2,3	2267,53	9,5
UroAla 10	3,761	0	<b>4,18</b>	3,7	2314,98	11,2
UroAla 11	0,886	0	2,95	0,4	1441,13	3,0
Uro-STa	0,631	2,7	<b>1,11</b>	13,9	2819,11	12,2
Uro-Gua	1,091	0,5	2,89	18,0	658,96	2,1
<b>Umwandlung B- zur A-Form</b>						
Peptid	K	Fehler [%]	$k_{\text{Anfang}}$ [1/min $\times 10^{-4}$ ]	Fehler [%]	$\tau$ [min]	Fehler [%]
Uroguanylin	1,083	0	4,84	3,4	1329,49	14,9
UroAla 1	2,030	0	<b>20,6</b>	3,9	117,77	22,2
UroAla 3	1,857	0	2,92	1,6	1611,93	6,5
UroAla 4	0,724	0	<b>2,01</b>	1,9	1723,41	4,7
UroAla 5	0,960	0	5,86	1,4	665,06	31,6
UroAla 6	0,492	0	<b>2,01</b>	3,1	3269,25	9,6
UroAla 7	0,923	0	3,23	1,9	1307,23	13,2
UroAla 8	0,923	0	4,18	3,3	1716,51	9,7
UroAla 9	1,777	0	3,55	2,8	2039,55	14,8
UroAla 10	0,449	0	3,55	3,6	360,90	71,2
UroAla 11	1,173	0	3,45	2,6	1557,31	3,9
Uro-STa	1,122	2,8	<b>1,21</b>	15,0	3054,01	12,0
Uro-Gua	0,802	1,0	<b>2,31</b>	19,0	648,02	7,4

Aus den Daten der Tabelle wird ersichtlich, daß, wie bereits bekannt, nicht nur der C-Terminus, sondern noch weitere Sequenzbereiche kritisch für die Umwandlungen zwischen den einzelnen Isoformen sind. Es kann festgehalten werden, daß die Umwandlungsgeschwindigkeiten nicht für beide Richtungen gleich sind. Dies ist schon am Wildtyp-Uroguanylin ersichtlich. Hierbei ist die Umwandlung der A- in die B-Form langsamer als umgekehrt.

L-Alanin-Substitutionen, die zu einer Erhöhung der Umwandlungsgeschwindigkeit von der A- zur B-Form führen, sind: Leu<sup>112</sup> (4-fach), Asn<sup>105</sup> (3-fach), Val<sup>104</sup> (2-fach) und Asp<sup>98</sup> (1,5-fach). Zu einer sehr großen Verringerung der Anfangsgeschwindigkeit der Isomerisierung von A zu B führte der Austausch Gly110Ala. Der Austausch Thr109Ala sowie die Substitution Val106Pro verringern die Umwandlungsgeschwindigkeit um etwa die Hälfte.

Substitutionen, die die Umwandlungsgeschwindigkeit von B zu A erhöhen, sind Leu<sup>112</sup> (5-fach) und Asn<sup>105</sup> (1,5-fach). Eine deutliche Erniedrigung der Umwandlungsgeschwindigkeit von B zu A wird durch den Austausch Gly110Ala bewirkt. Die Substitutionen der Valinreste gegen Alanine sowie der Austausch Val106Pro verringern die Umwandlungsgeschwindigkeit um etwa die Hälfte. Der Austausch von VNV gegen AYA, im Uro-Gua führt ebenfalls zu einer Verringerung der Isomerisierungsgeschwindigkeit. Es läßt sich also zusammenfassend sagen, daß Substitutionen im C-terminalen Bereich von Guanylin und Uroguanylin einen sehr großen Einfluß auf die Isomerisierungsgeschwindigkeit der beiden Peptide haben. Substitutionen im mittleren Bereich haben einen geringeren Einfluß auf die Umwandlung.

### 5.3 Die biologische Aktivität synthetischer Guanyline und Uroguanyline

Als Maß für das biologische Potential der Peptide wurde das intrazellulär gebildete cGMP in T84-Zellen nach Peptidinkubation herangezogen. T84-Zellen exprimieren von den bekannten Guanylatzyklen nur die Guanylatzyklase-C, welche nach Aktivierung durch die Liganden Guanylin, Uroguanylin und STa den *second messenger* cGMP freisetzt [76]. Dieser cGMP-Anstieg ist ein indirektes, aber spezifisches Maß für die Aktivierung des Rezeptors und läßt sich über cGMP-spezifische Radioimmunoassays oder ELISAs bestimmen. Die Bindung der Peptide an die extrazelluläre Domäne der GC-C wurde über einen Verdrängungsassay an Membranpräparationen von 293T-Zellen, die den Rezeptor GC-C stabil transfiziert exprimieren, ermittelt. Die Peptide konkurrierten dabei mit radioaktiv markiertem <sup>125</sup>I STp (4-17) um die Bindungsstelle [79].

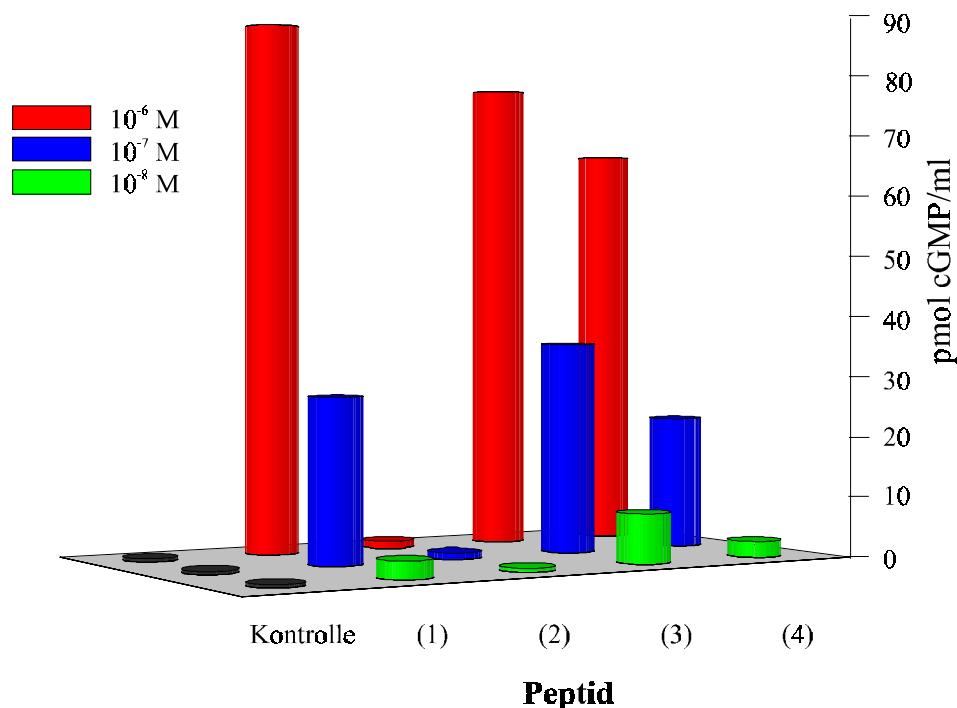
### 5.3.1 Die biologische Aktivität von Guanylin-(100-115) der Ratte

Kürzlich wurde die Isolierung eines neuen Guanylinmoleküls der Ratte beschrieben [82]. Dieses war N-terminal um eine Aminosäure verlängert und bestand damit aus 16 Aminosäuren. Unerwarteterweise beschrieben die Autoren dieses Peptid als biologisch inaktiv bezüglich der Bildung von cGMP in T84-Zellen. Dies steht in krassem Gegensatz zu Daten über humanes Guanylin, das in Größen von 15-17 Aminosäuren eine unveränderte Aktivität zeigte [40]. Zur Überprüfung dieses Berichtes wurde Guanylin der Ratte synthetisiert und im T84-Assay charakterisiert.

(A)

(1)	Guanylin-(101-115)	PGTCEICAYAACTGC
(2)	Guanylin-(84-115)	EPNAQEILQRLEEIAEDPGTCEICAYAACTGC
(3)	Guanylin-(100-115) (Ratte)	DPNTCEICAYAACTGC
(4)	Guanylin-(101-115) (Ratte)	PNTCEICAYAACTGC

(B)



**Abbildung 14:** cGMP-Bildung in T84-Zellen durch Guanylin der Ratte. (A) Aminosäuresequenzen der im Bioassay eingesetzten Peptide. (B) cGMP-Bildung in T84-Zellen im Konzentrationsbereich von  $10^{-8}$ - $10^{-6}$  M (detektiert durch RIA).

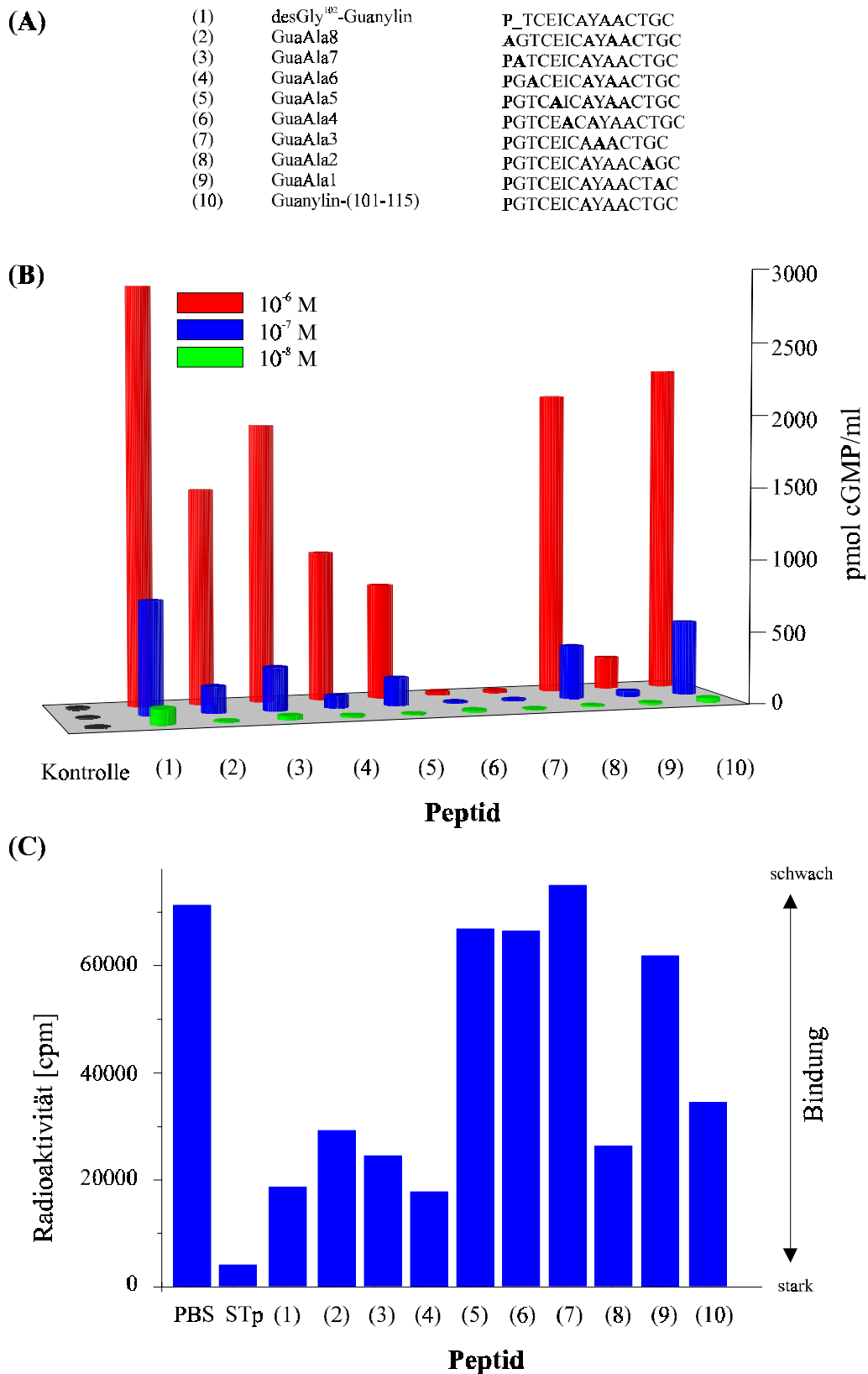
Als Vergleichssubstanzen wurden Rattenguanylin aus 15 Aminosäuren und humanes Guanylin-(101-115) verwendet. Zusätzlich wurde auch noch ein 32 Aminosäuren langes Guanylin-(84-115), das durch Lys-C-Spaltung von Proguanylin generiert wurde getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt. Der Bioassay zeigt, daß Rattenguanylin aus 16 Aminosäuren eindeutig biologisch aktiv ist und nur ein geringer Unterschied zum Guanylin aus 15 Aminosäuren besteht. Beide Peptide sind ab einer Konzentration von  $10^{-8}$  M in der Lage, cGMP in T84-Zellen zu produzieren und zwar in vergleichbaren Mengen wie humanes Guanylin-(101-115). Guanylin-(84-115) war dagegen im Bereich von  $10^{-8}$ - $10^{-6}$  M nicht in der Lage, cGMP in größeren Mengen zu produzieren. Seine biologische Aktivität ist schwach, vergleichbar mit der des Proguanylins.

### 5.3.2 Biologische Aktivität der L-Alaninscanderivate des Guanylins

Um die biologische Aktivität der L-Alanin-substituierten Derivate von Guanylin zu bestimmen, wurden die Peptide im Konzentrationsbereich von  $10^{-8}$ - $10^{-6}$  M mit T84-Zellen inkubiert und das interzellulär gebildete cGMP anschließend über einen RIA und über einen ELISA bestimmt. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 15 dargestellt.

Es ist erkennbar, daß GuaAla3 und GuaAla4 bei keiner getesteten Konzentration in der Lage waren, die Bildung von cGMP zu stimulieren. GuaAla1 zeigte bei  $10^{-6}$  M ein sehr reduziertes Potential zur cGMP-Entwicklung und war bei niedrigeren Konzentrationen inaktiv. Die Aktivität der Derivate GuaAla5 und GuaAla6 war geringfügig reduziert im Vergleich zu Guanylin-(101-115). Im Falle von GuaAla2, GuaAla7 und GuaAla8 hatte die Substitution fast keinen Einfluß auf die Potenz der Peptide. Die Deletionsmutante des Gly<sup>102</sup>-Guanylin war bei Konzentrationen von  $10^{-6}$  bis  $10^{-7}$  M sogar etwas potenter als Guanylin-(101-115) selbst. Zur Korrelation mit der Bioaktivität wurden die Guanylinpeptide in einem Rezeptorbindungsassay an Membranpräparationen von 293T-Zellen, die mit Guanylatzyklase-C stabil transfiziert waren, untersucht. Dazu wurde die Bindung der Peptide an GC-C in einer kompetitiven Reaktion mit radioaktiv markiertem STp überprüft [79]. Das Ergebnis dieses Assays ist in Abbildung 15 C dargestellt.





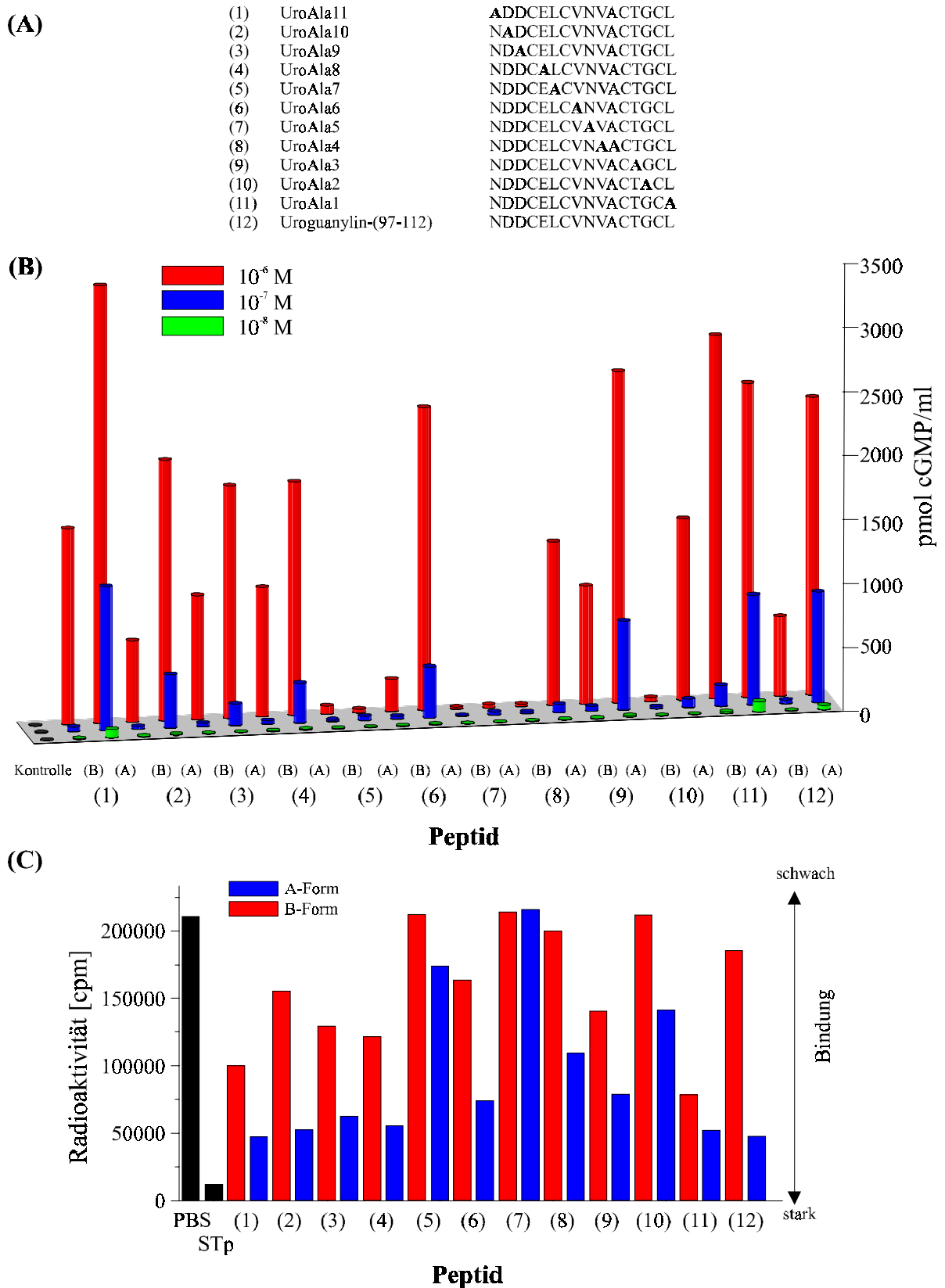
**Abbildung 15:** cGMP-Bildung in T84-Zellen und Rezeptorbindung durch L-Alaninscan-Peptide von Guanylin. (A) Aminosäuresequenzen der getesteten Peptide. (B) cGMP-Bildung in T84-Zellen im Konzentrationsbereich von  $10^{-8}$ - $10^{-6}$  M (gemessen durch ELISA). (C) Bindung an Membranpräparationen von GC-C-überexprimierenden 293T-Zellen bei einer Peptidkonzentration von  $10^{-6}$  M.

Das Bindungsverhalten der getesteten Peptide und ihre Potenz im cGMP-Assay stimmen im wesentlichen überein. GuaAla3 und GuaAla4 verdrängen STp nicht, GuaAla1 nur sehr schwach und GuaAla6, GuaAla7, GuaAla8 und desGly<sup>102</sup>-Guanylin vergleichbar mit Guanylin-(101-115). Auffälligerweise zeigte das T84-aktive GuaAla5 keine Bindung an GC-C bei einer Konzentration von  $10^{-6}$  M. Bei  $10^{-5}$  M wurde jedoch eine STp-Verdrängung gemessen, die vergleichbar mit derjenigen von STp bei  $10^{-6}$  M ist. Anzumerken bleibt, daß alle Guanylinpeptide als Mischung ihrer zwei topologischen Isomeren vorlagen und somit die aktive Komponente nur zu etwa 50% vorhanden war.

Der Austausch der Aminosäuren Gly<sup>114</sup>, Tyr<sup>109</sup> sowie Ile<sup>106</sup> gegen Alanin führt also zu einem Verlust sowohl der Bioaktivität als auch der Rezeptorbindung des Guanylins.

### 5.3.3 Biologische Aktivität der L-Alaninscanderivate des Uroguanylins

Die Peptide des L-Alaninscans von Uroguanylin wurden im T84-Bioassay getestet. Von jedem Peptid wurden die beiden Isoformen getrennt auf ihr cGMP-produzierendes Potential untersucht. Dabei zeigte die B-Form in jedem Fall eine deutlich geringere Aktivität. In Abbildung 17 ist das Ergebnis des Bioassays dargestellt. Eine mit dem Wildtyp-Uroguanylin-(97-115) vergleichbare Erhöhung des cGMP-Spiegels zeigten die Derivate UroAla1, UroAla3, UroAla6 und UroAla11. Die B-Form von UroAla1 zeigte bei  $10^{-6}$  M auch ein erhebliches cGMP-bildendes Potential, das aber durch die sehr schnelle Umwandlung in die Isoform A zu erklären ist. UroAla8, UroAla9 und UroAla10 zeigten eine etwas verminderte Aktivität. UroAla2 zeigte nur bei  $10^{-6}$  M eine geringe Aktivität, geringere Peptidkonzentrationen führten nicht zu einer Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels. Die Derivate UroAla5 und UroAla6 waren völlig inaktiv. Sie weisen substituierte L-Alaninreste an identischen Sequenzpositionen wie die inaktiven Derivate der entsprechenden Guanylinserie (GuaAla3 und GuaAla4) auf. Bei allen Derivaten war die cGMP-Produktion der B-Formen nur bei einer Peptidkonzentration von  $10^{-6}$  M erhöht. Geringere Konzentrationen führten in keinem Fall zu einem Anstieg des cGMP-Spiegels.



**Abbildung 16:** cGMP-Bildung in T84-Zellen und Rezeptorbindung durch L-Alaninscan-Peptide von Uroguanylin. (A) Aminosäuresequenzen der getesteten Peptide. (B) cGMP-Bildung in T84-Zellen im Konzentrationsbereich von  $10^{-8}$ - $10^{-6}$  M (gemessen durch ELISA). (C) Bindung an Membranpräparationen von GC-C-überexprimierenden 293T-Zellen bei einer Peptidkonzentration von  $10^{-6}$  M. (A) = A-Isoform; (B) = B-Isoform.

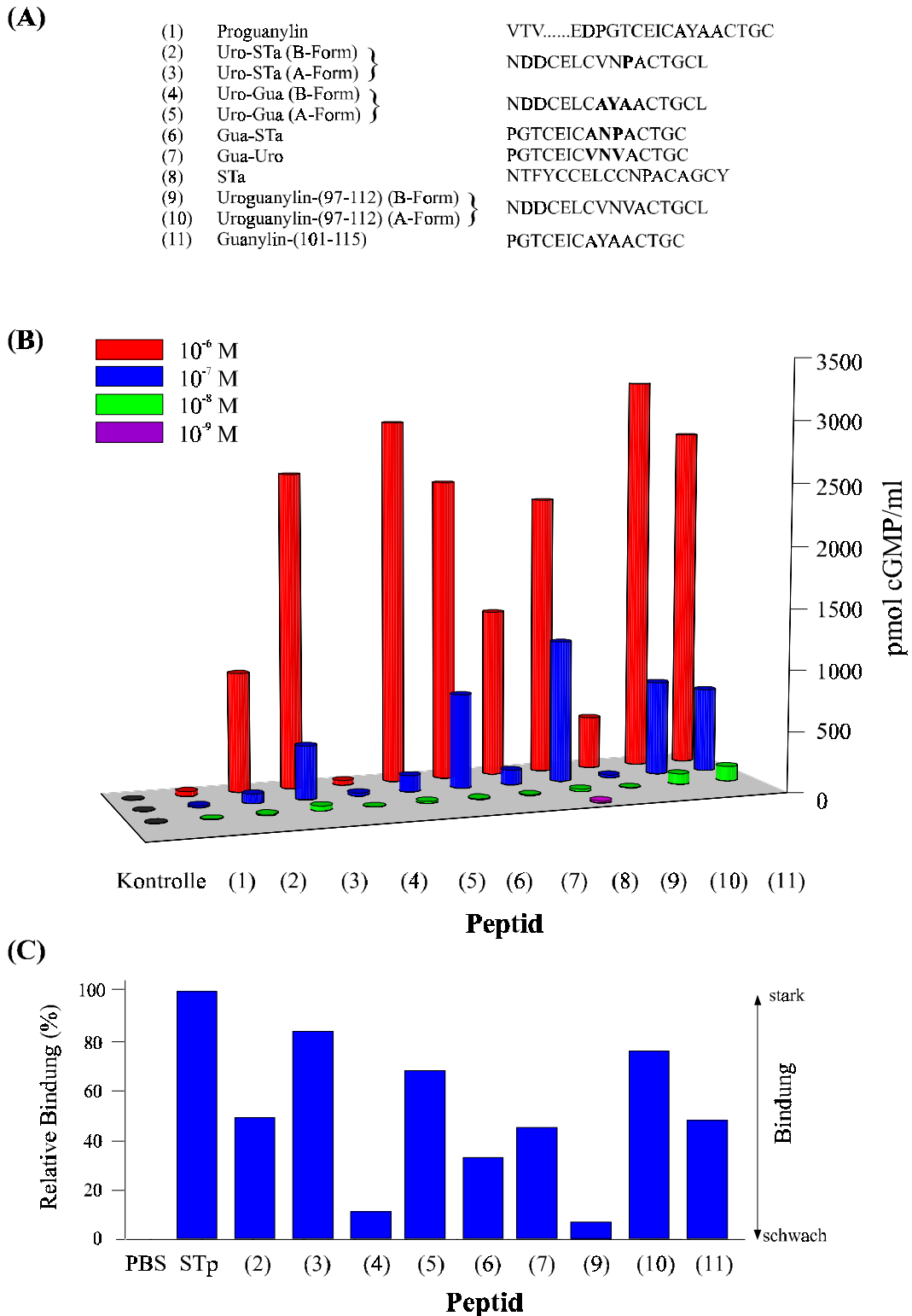
Im Bindungsassay an Membranen von 293T-Zellen wurden analoge Ergebnisse erhalten (Abbildung 16 C). Alle B-Formen zeigten eine geringe bzw. gar keine Bindung an GC-C. Die A-Isomeren von UroAla5 und UroAla7 waren ebenfalls nicht in der Lage, STp zu verdrängen. UroAla2 zeigte ebenfalls eine verringerte Bindung an die GC-C. Alle anderen Derivate zeigten eine mittlere Bindungsaffinität, verglichen mit derjenigen des STp.

Der Austausch der Aminosäuren Gly<sup>110</sup>, Asn<sup>106</sup> sowie Leu<sup>102</sup> gegen Alanin hat also einen Verlust der Bioaktivität des Uroguanylins im Sinne der Aktivierung der katalytischen Domäne und der Bindung an die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne von GC-C zur Folge.

#### **5.3.4 Biologische Aktivität chimerer Peptide von Guanylin, Uroguanylin und STa**

Um weitere Aussagen über die Struktur-Aktivitäts-Relation von GC-C-Liganden zu ermöglichen, wurden synthetische Chimere entsprechend der Ala-substituierten Mutanten von Guanylin und Uroguanylin untersucht. Als Chimere sind diese Peptide zu bezeichnen, da sie im Bereich zwischen den inneren Cysteinen jeweils Segmente der beiden anderen Aktivatoren enthalten.

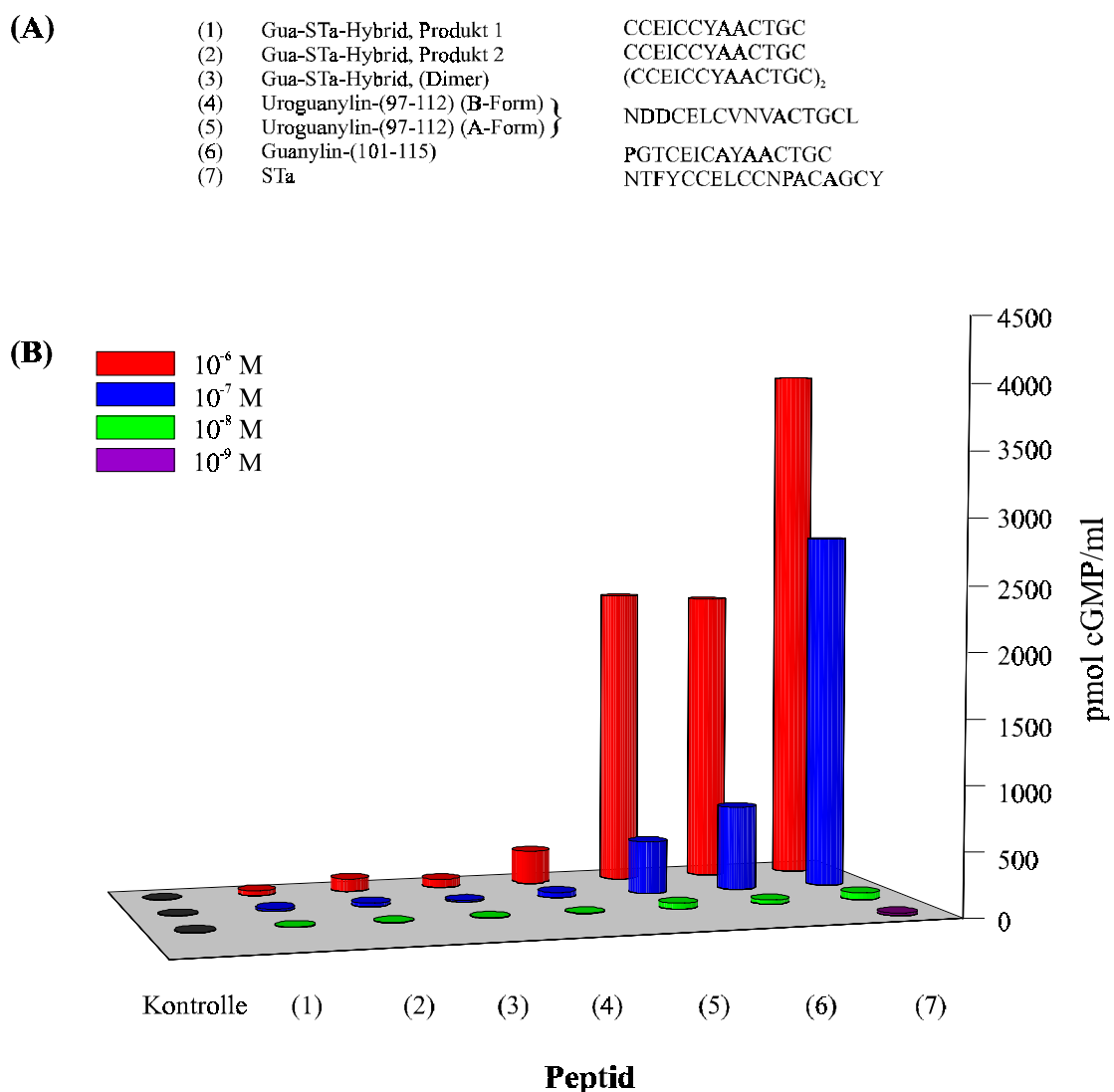
Die synthetischen Peptide wurden bezüglich cGMP-Bildung und Rezeptorbindung untersucht. Topologische Isomere wurden separat charakterisiert. Als Referenzpeptide wurden Uroguanylin-(97-112), Guanylin-(101-115) und STa eingesetzt. Die getesteten B-Formen der Peptide zeigten wie erwartet eine deutlich geringere Aktivität als die korrespondierenden A-Formen. Das Gua-Uro-Chimer zeigte die geringste Aktivität, verglichen mit den anderen Chimeren. Gua-STa, Uro-STa (A-Form) und Uro-Gua (A-Form) besitzen eine vergleichbare Potenz wie die Referenzpeptide. Die Aktivität von STa bei  $10^{-6}$  M ist in diesem Assay unerwartet niedrig ausgefallen, was auf eine nicht gleichmäßige Zelldichte zurückzuführen sein könnte. Bei  $10^{-7}$  M zeigt es jedoch eine deutlich größere Aktivität als alle anderen getesteten Peptide. Normalerweise ist die Aktivität von STa im T84-Assay wesentlich höher (siehe Abbildung 18 B). Das zusätzlich getestete Proguanylin zeigte, wie schon bekannt, keine biologische Aktivität.



**Abbildung 17:** cGMP-Bildung in T84-Zellen und Rezeptorbindung durch chimere Peptide von Guanylin, Uroguanylin und STa. (A) Aminosäuresequenzen der getesteten Peptide. (B) cGMP-Bildung in T84-Zellen im Konzentrationsbereich von  $10^{-9}$ - $10^{-6}$  M (gemessen durch ELISA). (C) Bindung an Membranpräparationen von GC-C-überexprimierenden 293T-Zellen bei einer Peptidkonzentration von  $10^{-6}$  M. Die Bindung von STp an die GC-C wurde als 100% gesetzt, und die anderen Peptide wurden darauf bezogen.

Bei den Untersuchungen der Membranbindung (Abbildung 17 C) wurden die Referenzpeptide nicht mitgemessen, so daß nur eine relative Bindung der Peptide, verglichen mit der Bindung von STp, angegeben werden konnte. Dies ist jedoch für eine qualitative Betrachtung der Bedeutung interner Sequenzsegmente der Liganden ausreichend.

Zusätzlich zu den oben beschriebenen chimere Peptiden wurden die durch oxidative Faltung von einem Guanylin-STa-Chimeren mit drei Disulfidbrücken erhaltenen Peptide auf ihre biologische Aktivität getestet.



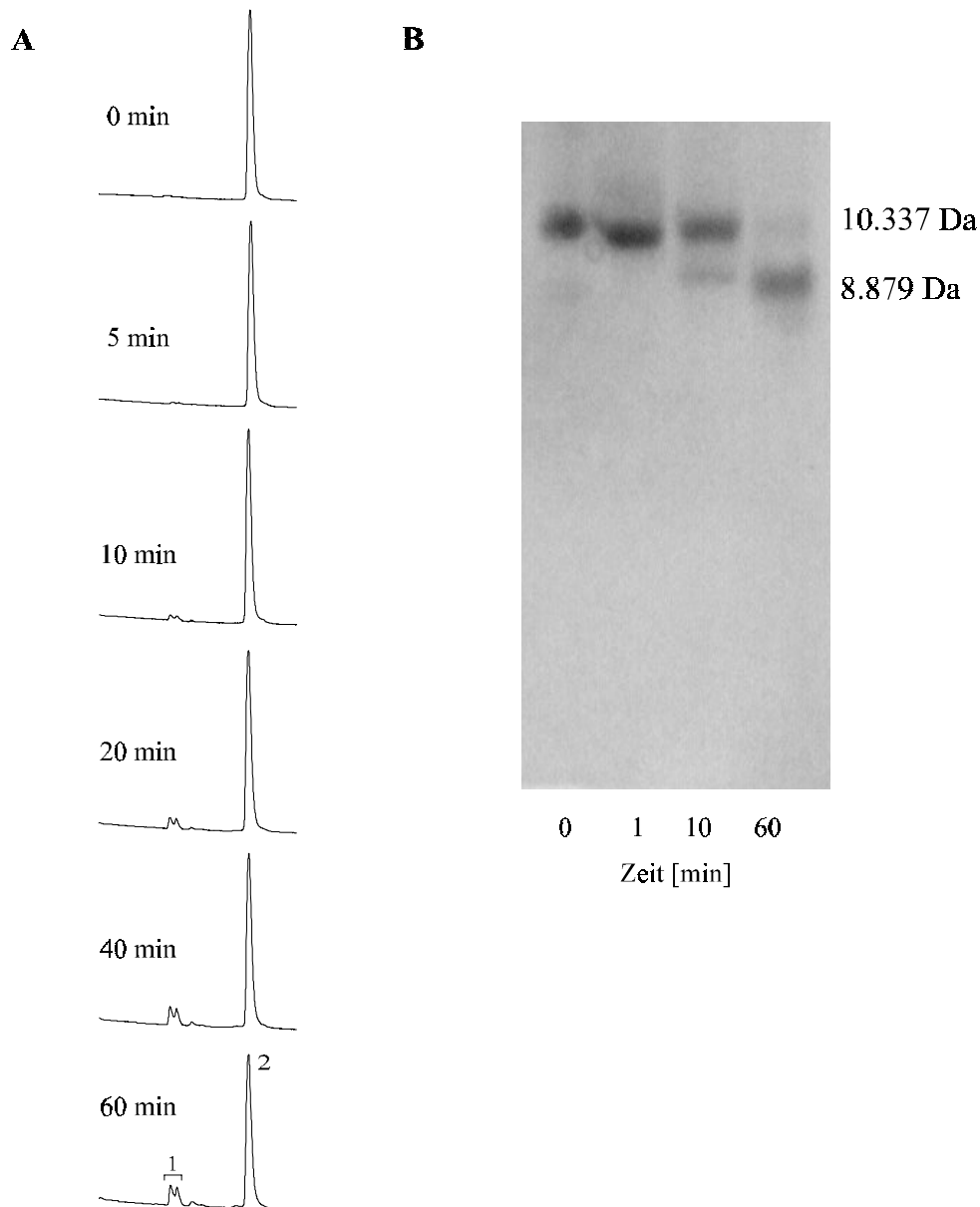
**Abbildung 18:** cGMP-Bildung in T84-Zellen und Rezeptorbindung durch chimere Guanylin-STa-Peptide mit drei Disulfidbrücken. (A) Aminosäuresequenzen der getesteten Peptide. (Das Dimer ist über Disulfidbrücken verknüpft; über das Disulfidmuster der Produkte ist nichts bekannt). (B) cGMP-Bildung in T84-Zellen im Konzentrationsbereich von  $10^{-9}$ - $10^{-6}$  M (gemessen durch ELISA).

Keines der so erhaltenen Peptide war in der Lage, eine intrazelluläre cGMP-Produktion auszulösen. Als Erklärung hierfür kann herangezogen werden, daß entweder nicht die richtige Disulfidverbrückung erhalten wurde oder das Guanylin-Peptid mit drei Disulfidbrücken durch eine zu starre Struktur nicht mehr an den Rezeptor binden kann. Das Verbrückungsmuster der Produkte ist aufgrund ihres Cysteinreichtums nicht durch die üblichen proteinchemischen Verfahren zu bestimmen. Als Referenzpeptide in diesem Assay wurden Guanylin-(101-115), Uroguanylin-(97-112) und STa getestet. STa besaß auch hier wieder die größte Aktivität. Die Ergebnisse dieses T84-Bioassays sind in Abbildung 21 dargestellt.

## **5.4 Untersuchungen zur Funktion der Prosequenz von Guanylin**

### **5.4.1 Stabilität von Proguanylin**

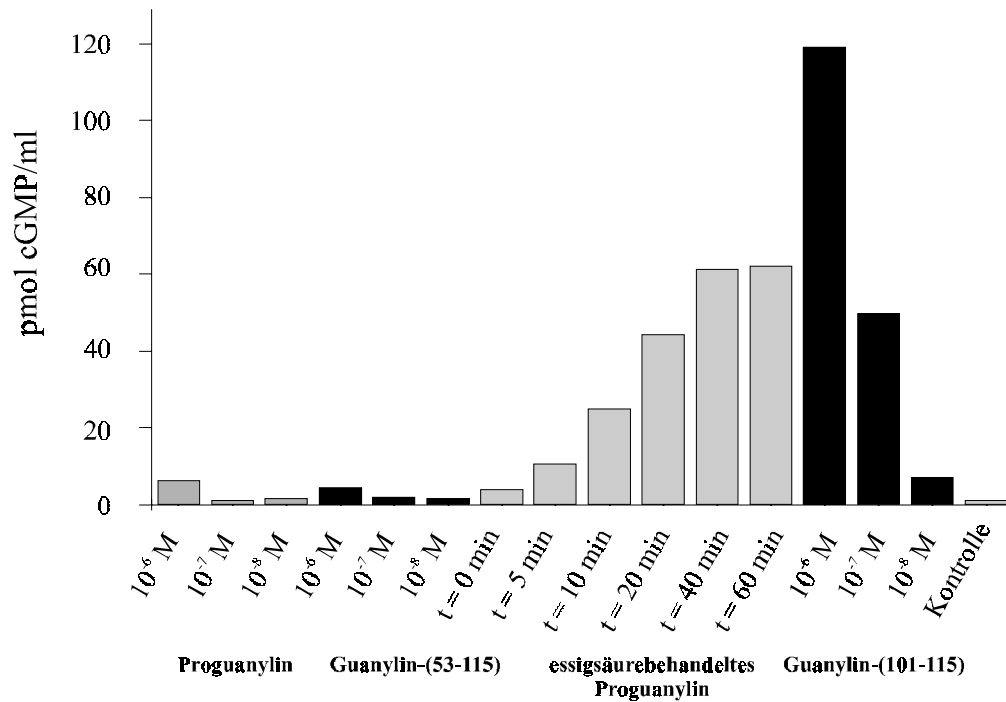
Proguanylin enthält eine potentielle säurelabile Spaltstelle zwischen den Sequenzpositionen 100-101 (Asp-Pro), die das Propeptid vom bioaktiven Guanylin-(101-115) trennt [83, 84]. Die chemische Stabilität dieser Peptidbindung wurde unter verschiedenen Bedingungen untersucht. In 1 M HOAc bei 95°C wird das Propeptid quantitativ vom bioaktiven Guanylin-(101-115) getrennt. In Abbildung 22 A ist die HPLC-Analytik dieser Reaktion gezeigt. Das entstandene Guanylin-(101-115) ist in der HPLC deutlich an dem aufgespaltenen Peak zu erkennen (s. 5.2). Guanylin-(22-100) und Proguanylin eluierten zeitgleich während der HPLC, was durch ES/MS-Analyse nachgewiesen wurde. Durch Gelelektrophorese konnte allerdings gezeigt werden, daß es sich um Proguanylin und Guanylin-(22-100) handelt, da keine niedermolekularen Spaltprodukte auftraten (Abbildung 22 B).



**Abbildung 19:** Stabilität von Proguanylin. A) HPLC-Analytik der Essigsäurespaltung von Proguanylin. Gradient: 20-80% B in 30 min. 1: Guanylin-(101-115) A- und B-Isomer; 2: Guanylin-(22-100) koelulierend mit Proguanylin; B) SDS-Gelelektrophorese von HOAc-behandeltem Proguanylin (TRICIN-PAGE, Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung).

Das gebildete Guanylin-(101-115) konnte durch ES-MS- und MALDI-MS-Analytik nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde die Kinetik der Essigsäurespaltung auch mittels des cGMP-Assays an T84-Zellen untersucht. In Abbildung 23 wird deutlich, daß die cGMP-Produktion durch HOAc-behandeltes Guanylin ansteigt und nach ca. 40 min ein Maximum erreicht. Die Halbwertszeit von Proguanylin in kochender 1 M Essigsäure liegt ausgehend vom T84-Bioassay bei etwa bei 15-20 min.





**Abbildung 20:** cGMP-Produktion in T84-Zellen durch natives Proguanylin, Guanylin-(53-115), Guanylin-(101-115) und essigsäurebehandeltes Proguanylin im Konzentrationsbereich von  $10^{-8}$  bis  $10^{-6}$  M. Die Gesamtpeptidkonzentration des essigsäurebehandelten Proguanylins betrug  $10^{-7}$  M.

Proguanylin war in 1 M Essigsäure bei Raumtemperatur über Tage hinweg stabil. In Wasser bei  $95^{\circ}\text{C}$  generierte es allerdings auch die beiden Fragmente Guanylin-(22-100) und Guanylin-(101-115), jedoch war die Kinetik dieser Spaltung deutlich verlangsamt. Es läßt sich also feststellen, daß bei einer zehnminütigen Behandlung von Proguanylin mit Essigsäure schon ein signifikanter Anteil von Guanylin-(101-115) entsteht, der leicht mit einem cGMP-Assay detektiert werden kann. Mit deutlicher Verzögerung gilt dies auch für Wasser. Bezüglich der Isolierungen von Guanylin, wobei Kochschritte unter den hier verglichenen Bedingungen durchgeführt wurden, kann also festgehalten werden, daß Guanylin-(101-115) chemisch induziert wird, wobei eine Abhängigkeit vom pH-Wert und der Temperatur besteht [39, 85]. Guanylin-(22-100) alleine war nicht in der Lage, cGMP in T84-Zellen zu generieren.

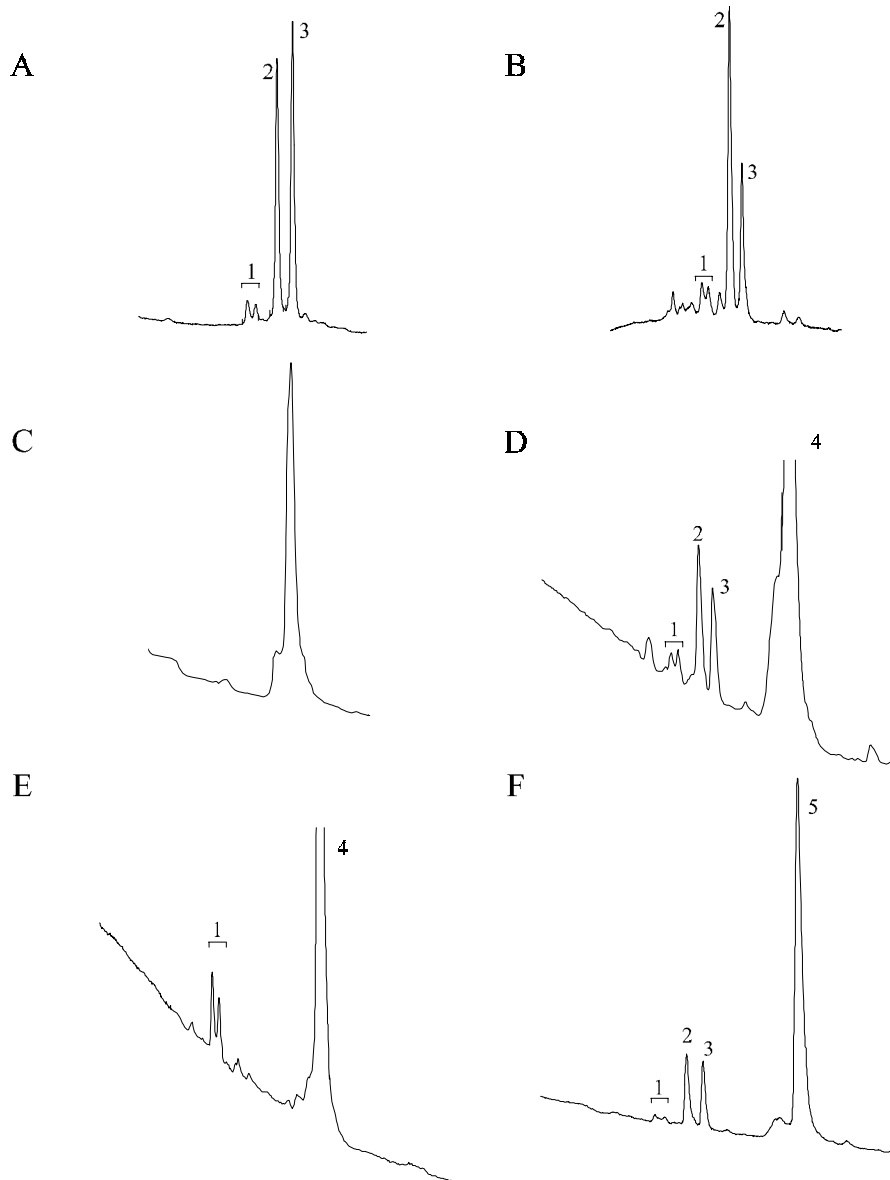
## 5.4.2 Oxidative Faltung von Guanylin

### Guanylin-(101-115)

Es ist schon lange bekannt, daß die Luftoxidation von reduziertem Guanylin-(101-115) zu einem Produkt mit sehr geringer Bioaktivität führt [86]. Abbildung 24 A zeigt, daß dabei alle drei möglichen Disulfidisomeren gebildet werden. Das native Produkt mit relativer 1-3/2-4-Verbrückung der Cysteine, das durch den spezifischen Doppelpeak identifiziert wurde, wird jedoch nur in äußerst geringem Ausmaß gebildet. Peaks 2 und 3 wurden durch chymotryptische Spaltung als die korrespondierenden 1-4/2-3-(Peak 2) bzw. 1-2/3-4-(Peak 3) Disulfidisomeren identifiziert. Es wurden verschiedene Faltungsbedingungen getestet, wobei sich aber der Anteil des korrekt verbrückten Guanylins nicht veränderte. Guanylin mit der nativen Disulfidverbrückung wurde etwa zu 5-10% gebildet, die beiden anderen Isomeren waren jeweils die Hauptprodukte der Oxidationsreaktionen. Das Isomerenverhältnis konnte auch durch die Verwendung von Faltungszusätzen, wie etwa GnHCl, nicht in Richtung des nativen Isomeren verschoben werden.

### Proguanylin und Guanylin-(53-115)

Die oxidative Faltung von Proguanylin wurde mit DTT-reduziertem Proguanylin untersucht und unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Während der HPLC-Analyse der Faltungsmischungen eluierte Proguanylin nur als ein relativ breiter Peak von der HPLC, so daß die entstandenen Disulfidisomeren nicht direkt detektiert werden konnten. Deshalb wurde die Essigsäureinstabilität von Proguanylin ausgenutzt, um das Propeptid von Guanylin-(101-115) abzutrennen. Reduziertes Proguanylin wurde demnach luftoxidiert und der fraktionierte HPLC-Peak anschließend getrocknet und mit 1 M Essigsäure bei 95°C für 60 min behandelt. Die so entstandenen und leicht detektierbaren Disulfidisomeren von Guanylin-(101-115) konnten mittels HPLC eindeutig identifiziert werden (Abbildung 24 C und D). Bei der Luftoxidation von Proguanylin entstanden ebenfalls hauptsächlich die nicht nativen Disulfidisomeren.



**Abbildung 21:** HPLC-Profile der oxidativen Faltungen von Guanylin-(101-115), Proguanylin und Guanylin-(53-115) mit verschiedenen Faltungszusätzen (100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 2 mM EDTA, pH 8.3). (A) Luftoxidation von Guanylin-(101-115); (B) Oxidation von Guanylin-(101-115) in Anwesenheit von  $\text{Cys}_2/\text{Cys}$ ; (C) Luftoxidation von Proguanylin; (D) Luftoxidation von Proguanylin; (E) Oxidation von Proguanylin in Anwesenheit von  $\text{Cys}_2/\text{Cys}$ ; (F) Oxidation von Guanylin-(53-115) in Anwesenheit von  $\text{Cys}_2/\text{Cys}$ . Peak 1: Topologische Isomeren von bioaktivem Guanylin-(101-115); Peak 2: 1-4/2-3-Disulfidisomer; Peak 3: 1-2/3-4-Disulfidisomer; Peak 4: Guanylin-(22-100); Peak 5: Guanylin-(53-100). Standard HPLC-Bedingungen, Gradient 30-80% B in 30 min, Säulentemperatur 11°C; (D)-(F): die Analytik wurde nach HOAc-Behandlung durchgeführt.

Durch die Verwendung von Redox-Puffern, wie etwa GSSG/GSH oder Cys<sub>2</sub>/Cys, konnte jedoch das Verhältnis der entstandenen Disulfidisomeren zugunsten des nativen Isomers verschoben werden. Das beste Ergebnis wurde durch die Verwendung eines Cys<sub>2</sub>/Cys-Redoxsystemes in Abwesenheit von GnHCl erzielt. Hierbei wurde fast ausschließlich die native Disulfidverbrückung wiederhergestellt (Abbildung 24E). Um die Bedeutung des N-terminalen Teils der Prosequenz von Proguanylin zu ermitteln, wurde ein durch Lys-C-Spaltung entstandenes Guanylin-(53-115) reduziert und ebenfalls unter den für Proguanylin geeigneten Faltungsbedingungen oxidiert. Guanylin-(53-115) war nicht in der Lage, die native Disulfidverbrückung wieder auszubilden. Es wurden hauptsächlich die beiden nicht nativen Disulfidisomeren gebildet. Deshalb kann angenommen werden, daß das N-terminale Segment (22-52) von Proguanylin molekulare Informationen enthält, die *in vitro* für die Ausbildung der nativen Disulfidverbrückung essentiell sind. Während der Untersuchungen wurden keine Beobachtungen gemacht, die darauf hindeuten, daß die dritte Disulfidbrücke im Proguanylin in die Ausbildung der nativen Disulfidverbrückung involviert ist. Gemischte Disulfide nach der Rückfaltung traten nicht auf. In Tabelle 13 sind die verschiedenen Faltungsbedingungen aller Oxidationen mit ihren Ergebnissen dargestellt.

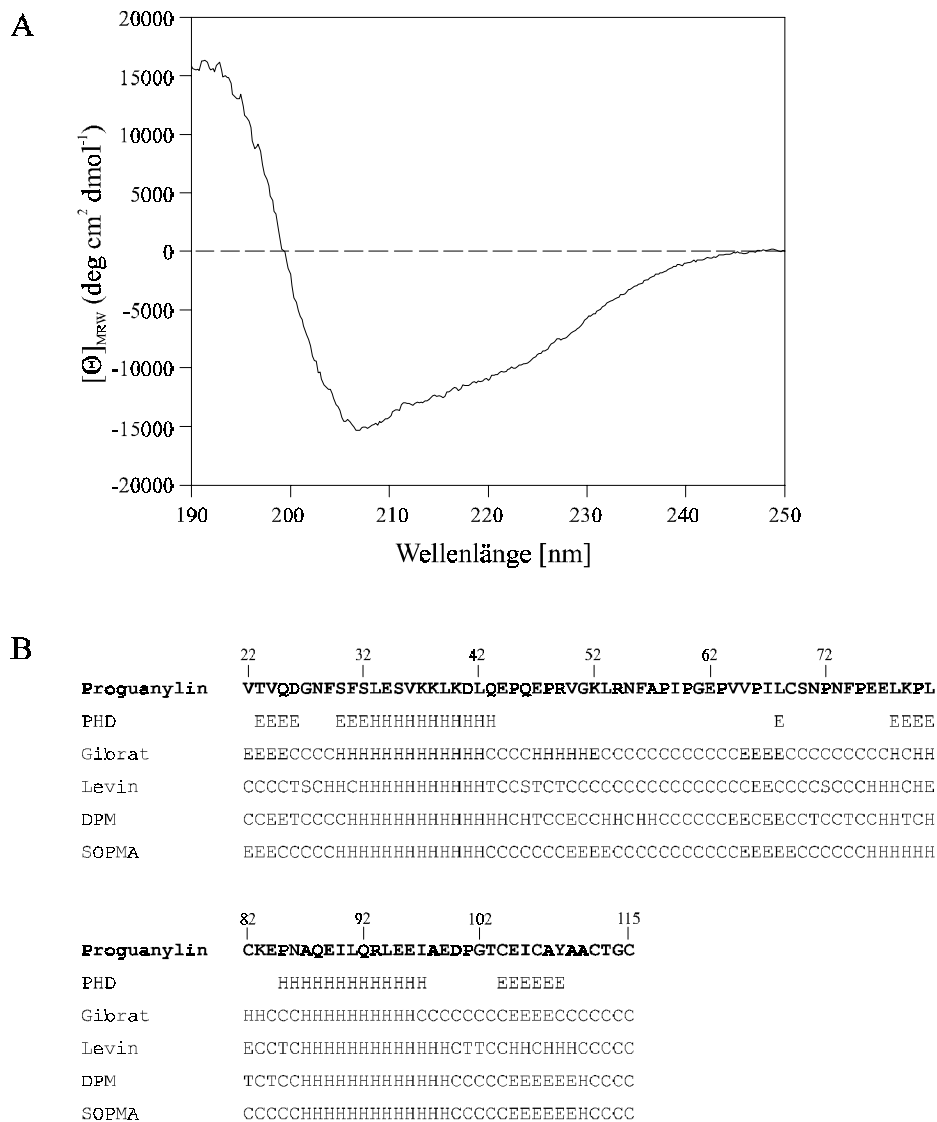
**Tabelle 8:** Faltungsbedingungen und erhaltene Disulfidisomere der verschiedenen durchgeführten oxidativen Faltungen von Guanylin.

Peptid	Faltungsbedingungen	Isomerenverhältnis (%) (nativ:1-4/2-3:1-2/3-4)
<b>hGuanylin-(101-115)</b>	Luftoxidation, RT	5 : 45 : 50
	1 mM GSH : 0,1 mM GSSG, RT, 4 M GnHCl	10 : 60 : 30
	1 mM Cystein : 0,05 mM Cystin, 5°C, N <sub>2</sub> -Atmosphäre	7 : 50 : 43
<b>hGuanylin-(53-115)</b>	1 mM Cystein : 0,05 mM Cystin, 5°C, N <sub>2</sub> -Atmosphäre	3 : 50 : 47
<b>hGuanylin-(22-115), Proguanylin</b>	Luftoxidation, RT, 4 M GnHCl	7 : 50 : 43
	Luftoxidation, 5°C	3 : 47 : 50
	1 mM GSH : 0,1 mM GSSG, RT, 4 M GnHCl	30 : 40 : 30
	1 mM GSH : 0,1 mM GSSG, 5°C, 4 M GnHCl	50 : 27 : 23
	1 mM Cystein : 0,05 mM Cystin, 5°C, 4 M GnHCl	40 : 35 : 25
	1 mM DTT(red.):0,05 mM DTT(ox.), 5°C, 4 M GnHCl	30 : 37 : 33
	1 mM GSH : 0,1 mM GSSG, 5°C,	70 : 17 : 13
	1 mM Cystein : 0,05 mM Cystin, 5°C	80 : 12 : 8
	1 mM Cystein : 0,05 mM Cystin, 5°C, N <sub>2</sub> -Atmosphäre	95 : 3 : 2

### 5.4.3 Strukturelle Untersuchungen von Proguanylin

#### CD-Spektroskopie

Das Profil des CD-Spektrums von Proguanylin gibt klare Hinweise auf eine Anwesenheit von  $\alpha$ -helikalen Strukturelementen [87, 88].



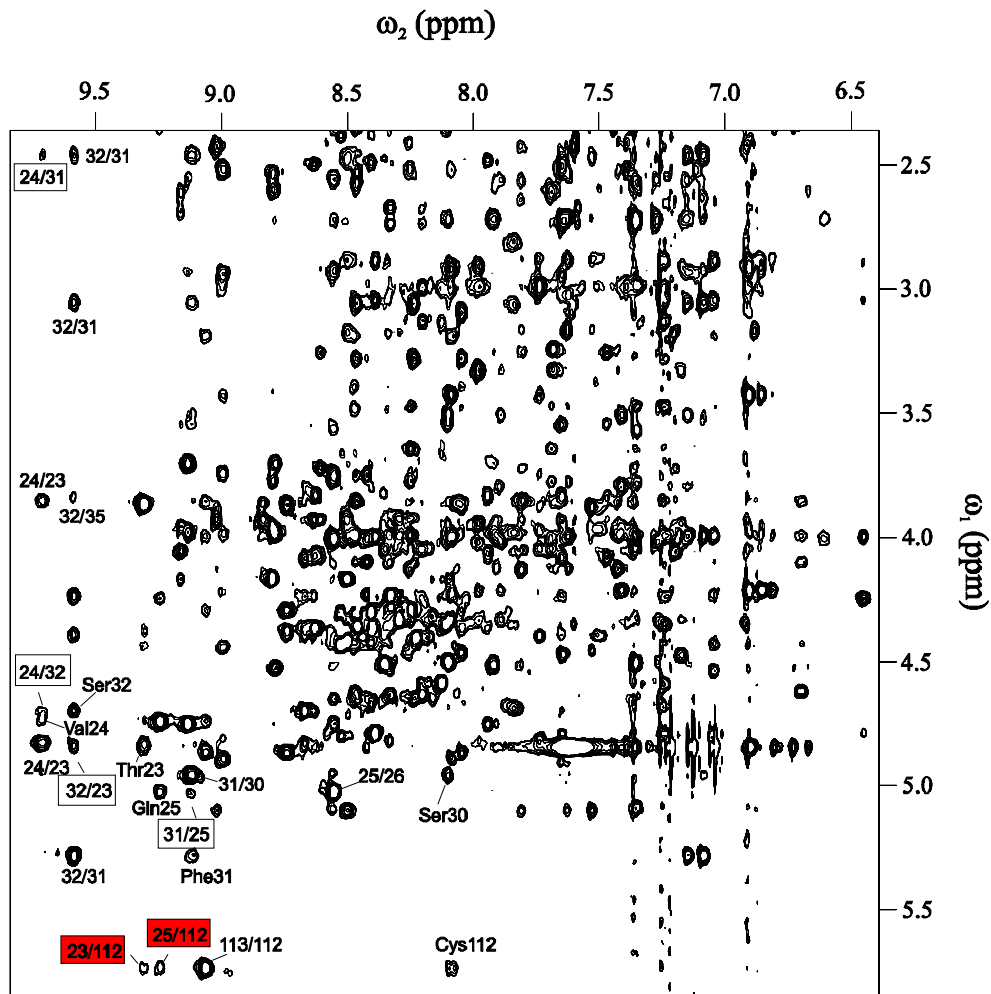
**Abbildung 22:** A) CD-Spektrum von nativem Proguanylin. B) Sekundärstruktur-Vorhersagen von Proguanylin nach verschiedenen Methoden. PHD: Rost & Sander [89, 90]; Gibrat: Gibrat [91]; Levin: Levin & Garnier [92]; DPM: Deleage & Roux [93]; SOPMA: Geourjon & Deleage [94]. C, coil; E, extended; H, helix; T, turn; S, bend. In den Vorhersagen werden die Disulfide im C-terminalen Bereich nicht berücksichtigt, so daß hier Abweichungen zur tatsächlichen Struktur vorhanden sind.

Ein Minimum bei 222 nm und ein Nulldurchgang bei 180-200 nm zeigen die Anwesenheit von  $\alpha$ -helikalen Bereichen an. Für ein unstrukturiertes Protein würde kein Nulldurchgang gemessen werden. Die quantitative Auswertung der Sekundärstrukturelemente nach der Methode von Sreerama ergab einen  $\alpha$ -helikalen-Anteil von etwa 33% und einen  $\beta$ -Faltblatt-Anteil von etwa 17% [95]. Dieses Ergebnis korreliert mit der Sekundärstruktur-Vorhersage nach anderen Methoden (Abbildung 25 B).

### NMR-Spektroskopie

Um weitere strukturelle Informationen über Proguanylin zu erhalten, wurden zweidimensionale homonukleare  $^1\text{H}$ -NOESY-, COSY- und TOCSY-Spektren bei 11 und 20°C aufgenommen. Die hohe Dispersion der chemischen Verschiebungen der Amidprotonen, die hochfeldverschobenen Resonanzen einzelner Methylgruppen (nicht gezeigt) sowie das überfüllte NOESY-Spektrum deuten auf ein gut strukturiertes Protein hin. Eine helikale Struktur spiegelt sich in einer hohen Anzahl von *cross peaks* in der Rückgrat-Amid-Region und in den hochfeldverschobenen  $\text{C}\alpha$ -Protonenresonanzen des NOESY-Spektrums wieder [96]. Tieffeldverschobene  $\text{C}\alpha$ -Protonenresonanzen deuten auf Spin-Systeme, die entweder in  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen involviert sind oder auf ein Prolin folgen, hin [96]. Fehlende Resonanzen in den Korrelationsspektren (TOCSY, COSY) machten zwar die volle Zuordnung der 94 Spin-Systeme unmöglich, es konnten jedoch der N-Terminus, eine kleine Sequenzregion im mittleren Teil und der C-Terminus aufgrund ihrer typischen Spin-Systeme und ihren Sequenzpositionen eindeutig zugeordnet werden.

Eindeutige *Long-range*-Interaktionen wurden zwischen dem  $\text{C}\alpha$ -Proton von Cys<sup>112</sup> und den Amid-Protonen von Thr<sup>23</sup> und Gln<sup>25</sup> sowie zwischen den Amid-Protonen von Thr<sup>113</sup> und Thr<sup>23</sup> nachgewiesen (Abbildung 26). Die hierbei detektierten NOESYs bedeuten eine räumliche Nähe von mindestens 5 Å.



**Abbildung 23:** Ausschnitt der Rückgrat-Amid-Region aus dem NOESY-Spektrum von Proguanylin bei 20°C. Es sind *cross peaks* zwischen Amid- und C $\alpha$ -Protonen sowie einigen Seitenketten-Protonen abgebildet. Die Beschriftungen beziehen sich auf die Numerierung im Präprohormon. *Long-range*-Interaktionen sind als Kästchen eingezeichnet.

Dies deutet darauf hin, daß Proguanylin in Lösung eine Struktur mit einer direkten räumlichen Nachbarschaft von C- und N-Terminus einnimmt. In Übereinstimmung mit den Sekundärstruktur-Vorhersagen deuten das NOESY-Muster und die chemischen Verschiebungen auf eine  $\beta$ -*hairpin*-Struktur für den N-Terminus, gefolgt von einer  $\alpha$ -Helix, hin. Da die Größenausschlußchromatographie bei pH 5 und 7,4 ein ungefähres Molekulargewicht von 18,6 kDa ergab, bildet das Protein in Lösung möglicherweise ein Dimer. Deshalb läßt sich zu diesem Zeitpunkt nicht eindeutig sagen, ob die Nachbarschaft des C- und des N-Terminus auf intra- oder intermolekularen Wechselwirkungen der Termini beruht.

---

Eindimensionale NMR-Spektren von Proguanylin waren über einen Konzentrationsbereich von 0,032 bis 2,4 mM identisch, was darauf hindeutet, daß sich der Oligomerisierungszustand von Proguanylin innerhalb dieses Konzentrationsbereiches nicht ändert. Für den C-terminalen Teil des Proteins, der das 15 Aminosäuren lange, bioaktive Guanylin-(101-115) enthält, welches zwei topologische Isomeren bildet, wurde nur eine Serie von Spin-Systemen detektiert und zugeordnet. Diese ähnelt eher der Serie des A-Isomeren von Guanylin-(101-115), das das biologisch aktive Isomer ist [62, 63]. Deshalb kann spekuliert werden, daß im nativen Proguanylin möglicherweise nur die Guanylin-A-Form oder eine ihr ähnliche Konformation vorliegt. Eine vollständige Zuordnung aller Spin-Systeme war bisher jedoch nicht möglich.



## 6. Diskussion

### Ist Guanylin-(101-115) ein natürliches, zirkulierendes Peptid?

Die genaue Kenntnis der Struktur endogener Peptide ist von höchster Bedeutung, da schon relativ geringfügige Änderungen ihrer Aminosäuresequenz zu drastischen Veränderungen bezüglich ihrer Rezeptorwechselwirkung führen können. So führen z.B. N-terminale Verkürzungen bei Chemokinen zu einem Verlust der Rezeptoraffinität oder sogar zu einer antagonistischen Aktivität [97]. Eine eindeutige Charakterisierung der Primärstruktur zirkulierender, bioaktiver Peptide ist ebenso im Rahmen ihrer Prozessierung ausgehend vom Gen und für die korrekte Einordnung in physiologische Regelkreise von höchster Bedeutung. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Resultate zur chemischen Stabilität zeigen eindeutig, daß Proguanylin unter den Bedingungen der Isolierung von Guanylin-(101-115) aus intestinalem Gewebe an der Amidbindung zwischen Asp<sup>100</sup> und Pro<sup>101</sup> gespalten wird. Dabei generiert es die Fragmente Guanylin-(101-115) und Guanylin-(22-100) [39, 55, 82, 85]. Die Kinetik dieser Spaltung scheint ausreichend zu sein, um eine ausreichend große Menge an bioaktivem Guanylin-(101-115) zu produzieren, das durch einen sensitiven cGMP-Bioassay detektierbar ist. Diese Instabilität ist nicht nur auf das komplette Proguanylin beschränkt, sondern auch auf jedes andere Guanylinmolekül, das diese Asp-Pro-Bindung enthält. Deshalb kann festgehalten werden, daß Guanylin-(101-115) ein chemisches Produkt ist. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß dieses Molekül auch ein natürliches Guanylin darstellt. Jedoch muß dann festgehalten werden, daß der Kochschritt in Essigsäure bzw. Wasser, der Proteasen inaktivieren soll, nicht geeignet ist zur Isolierung der nativen Peptide. Es stellt sich deshalb weiterhin die Frage, welches die native Form von Guanylin ist, die GC-C aktiviert, da Proguanylin nur ein vermindertes Potential zur Rezeptoraktivierung besitzt [42]. Die Identifizierung eines solchen Liganden wäre von größter Wichtigkeit, da spekuliert wird, daß es weitere Rezeptoren für Guanylin geben könnte [28, 31]. Die Isolierung von Guanylin-(100-115) aus Rattengewebe, welches eine intakte Asp-Pro-Spaltstelle besitzt, als auch eines kürzeren Guanylins aus 14 Aminosäuren zeigen, daß andere Guanylinformen existieren [82, 98]. In der Sequenz von Proguanylin befinden sich zwei potentielle Spaltstellen für Enzyme (Lys<sup>83</sup> und Arg<sup>93</sup>). Da Guanylin-(84-115) biologisch inaktiv ist und somit keinen GC-C-Liganden repräsentiert, ist Guanylin-(94-115) ein plausibler Kandidat für die native Form von Guanylin [44].

## **Bedeutung der Prosequenz von Guanylin für die *in vitro*-Faltung**

Synthetische Arbeiten zur Darstellung von Guanylin-(101-115) zeigten schon vor längerer Zeit, daß ausgehend von einem Tetrathiolvorläufer praktisch kein bioaktives Produkt durch eine Oxidation zum zweifach verbrückten Disulfid gebildet wird [86]. Unter allen in dieser Arbeit für die oxidative Faltung getesteten Bedingungen war reduziertes Guanylin-(101-115) nicht in der Lage, als Hauptprodukt dasjenige mit der nativen Disulfidverbrückung auszubilden. Dieses Ergebnis steht in Gegensatz zu Oxidationen anderer kleiner, cysteinhaltiger Peptide, wie etwa Endothelin oder Conotoxin [99, 100]. Diese Peptide bilden bei der oxidativen Faltung überwiegend Produkte mit den nativen Disulfidverbrückungen aus. Da dieses für Guanylin-(101-115) nicht der Fall ist, kann man daraus schließen, daß das Peptid thermodynamisch ungünstig vorliegt. Neben der kurzen, C-terminalen Aminosäuresequenz scheint also noch ein weiterer Faktor für die Bildung der korrekten Disulfidbrücken *in vivo* notwendig zu sein. Dies kann als nicht-Anfinsen-typisches Verhalten, wonach alle notwendigen Informationen innerhalb der Aminosäuresequenz eines Peptides zu dessen Faltung vorliegen sollen, interpretiert werden [101]. Dies ist auch der Grund für die zwangsläufig selektive Einführung der Disulfidbrücken während der Guanylin- und Uroguanylinsynthesen.

Entsprechende Rückfaltungsexperimente mit Proguanylin in Gegenwart von Redox-Systemen, wie etwa GSH/GSSG oder Cystein/Cystin, führten jedoch zu einem Produkt mit der nativen Disulfidverbrückung. Daraus läßt sich schließen, daß zumindest ein Teil der Prosequenz von Guanylin wie ein intramolekulares Chaperon während der intrazellulären Ausbildung der Disulfidverbrückung wirkt. Da in Anwesenheit des Denaturierungsmittels GnHCl hauptsächlich die nicht nativen Disulfidisomere entstehen, sind keine kovalenten Interaktionen zwischen dem Propeptid und dem C-Terminus von Proguanylin für die Faltung verantwortlich. Die Rückfaltung des N-terminal um 31 Aminosäuren verkürzten Guanylin-(53-115) unter denselben Bedingungen, die für Proguanylin zur Ausbildung der nativen Disulfidverbrückung führten, resultierte hauptsächlich in nicht nativen Isomeren. Deshalb kann abschließend gesagt werden, daß das fehlende N-terminale Segment aus 31 Aminosäuren essentiell für die Ausbildung der nativen Disulfidverbrückung ist.

Diese Ergebnisse stimmen mit Studien über die verwandten Peptide Uroguanylin und Prouroguanylin überein [102]. Für diese wurde herausgefunden, daß die Rückfaltung von reduziertem Prouroguanylin ausschließlich in der nativen 1-3/2-4-Verbrückung des C-terminalen Segments resultierte. Zirkulierendes Uroguanylin aus 24 Aminosäuren [52] war

dagegen nicht in der Lage, die native Disulfidverbrückung wieder aufzubauen. Mutagenesestudien mit N-terminal verkürzten Prouroguanylinderivaten legen sogar nahe, daß etwa die ersten fünf Aminosäurereste *in vitro* absolut notwendig für die Bildung des bioaktiven Disulfidmusters sind [103]. Also scheint auch bei Uroguanylin die Prosequenz als ein intramolekulares Chaperon zu funktionieren. Für einige andere Proteine, wie z.B. das Subtilisin, ist schon länger bekannt, daß die Prosequenz als ein intramolekulares Chaperon fungiert [104]. Diese Proteine unterscheiden sich allerdings dadurch, daß ihre Prosequenz verglichen mit dem funktionellen Peptid wesentlich kleiner ist. Mit diesem Ergebnis kann festgehalten werden, daß - zumindest *in vitro* - erstmals eine Funktion für die Prosequenz eines Peptidhormones gefunden wurde, die über die Aufgabe als Signalpeptid im intrazellulären Transport (*trafficking*) hinausgeht.

### **Strukturelle Charakteristika von Proguanylin**

Im Gegensatz zu einer früheren Studie über Proguanylin, in der rekombinantes Protein aus *Escherichia coli* untersucht wurde das hauptsächlich  $\beta$ -Faltblatt und  $\beta$ -turns, aber fast keinen  $\alpha$ -Helix-Anteil enthielt, konnte im Rahmen dieser Arbeit festgestellt werden, daß in nativem Proguanylin ein definierter Anteil an  $\alpha$ -Helix vorhanden ist. Das aus *E. coli* gewonnene Protein war allerdings N-terminal um fünf Aminosäuren verlängert [47], so daß diese Verlängerung offensichtlich die Sekundärstruktur von Proguanylin entscheidend beeinflusst. Für natives Proguanylin konnte eine räumliche Nähe von N- und C-Terminus eindeutig durch NMR-spektroskopische Experimente nachgewiesen werden. Somit unterstützen die strukturellen Ergebnisse die Resultate der Faltungsexperimente und liefern auch eine mögliche Erklärung für die abweichende Sekundärstruktur des rekombinanten Proguanylins. Eine stabilisierende Wirkung durch Assoziation der Termini während der disulfidgekoppelten Faltung würde erklären, warum Guanylin-(53-115), dem dieser Teil der Prosequenz fehlt, nicht zu einem Produkt mit der nativen Disulfidverbrückung zurückfaltet. Die Interaktionen des C- und N-Terminus liefern eine naheliegende Erklärung für die sehr niedrige biologische Aktivität des Prohormones, die etwa um den Faktor 100 reduziert ist, verglichen mit Guanylin-(101-115). Eine stabile Fixierung des N-Terminus an das aktive C-terminale Segment könnte den Liganden vom Rezeptor effektiv abschirmen und somit die vollständige Aktivierung der GC-C verhindern.

Das Phänomen der Bildung von zwei topologischen Stereoisomeren bei Guanylin-(101-115) betreffend, konnte nur ein Satz von Spinsystemen für den C-terminalen Bereich von

Proguanylin identifiziert werden [40, 62]. Weil die chemischen Verschiebungen der zugeordneten C-terminalen Aminosäuren von Proguanylin eher denen der A-Isoform ähneln, folgern wir, daß das C-terminale Fragment im Proguanylin eine ähnliche Struktur wie im Topoisomer A von Guanylin-(101-115) ausbildet. Da das A-Isomer das GC-C-aktivierende Isomer darstellt, wird spekuliert, daß die B-Form möglicherweise keine physiologische Relevanz hat [63]. Diese Hypothese wird stark dadurch gestützt, daß das verwandte Prouroguanylin ausschließlich zum bioaktiven A-Isomer zurückfaltet [102]. Allerdings muß die Mutmaßung, daß Proguanylin eine einzige definierte Struktur für den C-Terminus einnimmt, noch durch eine vollständige Strukturbestimmung belegt werden. Es besteht jedoch *in vivo* die plausible Möglichkeit, daß durch proteolytische Abspaltung eines C-terminalen Fragments aus dem stereochemisch homogenen Proguanylin ein bioaktives Peptid gebildet wird, daß durch die topologische Stereoisomerisierung inaktiviert wird.

### **Synthesen von Guanylin- und Uroguanylin-Derivaten**

Zur Untersuchung der Struktur-Aktivitätsrelation von Guanylin und Uroguanylin ist eine Synthese aufbauend auf der Festphasentechnik unumgänglich. Die Synthesen von Guanylin- und Uroguanylin-Peptiden sind jedoch bedingt durch die eher hydrophoben Sequenzen der beiden Peptide erschwert. Offensichtlich infolge von Aggregationen verlaufen die Acylierungen von Aminogruppen ab etwa der fünften Aminosäure kinetisch ungünstig, d.h. unvollständig. Fehlsequenzen wie Thr<sup>103</sup> und Ile<sup>105</sup> bei Guanylin oder Asp<sup>99</sup> bei Uroguanylin lassen sich nur durch hohe Kopplungszeiten und Doppelkopplungen zurückdrängen. Als Folge des Auftretens von Fehlsequenzen in den Rohprodukten mußten die monozyklischen Zwischenprodukte teilweise mehrfach chromatographisch gereinigt werden, was letztendlich die Gesamtausbeuten drastisch herabsetzte. Durch den Einsatz von 2Cl-Trt-Harzen, bei denen die sterisch aufwendige Tritylgruppe als Linker zwischen dem Harz und der ersten Aminosäure verwendet wird, konnten bessere Ausbeuten erzielt werden. Diese gehinderte Gruppe scheint die Aggregation der wachsenden Peptidketten zu unterdrücken und so die Syntheseausbeuten entscheidend zu verbessern. TentaGele, die zu mehr als 70% aus Polyethylenglykolketten bestehen, scheinen für die Synthesen von Guanylin und Uroguanylin nicht geeignet zu sein.

Die beiden Zyklisierungsschritte zur Einführung der nativen Disulfidverbrückung laufen unproblematisch ab. Um die Zugänglichkeit von Derivaten des Guanylin/Uroguanylin-Typs weiter zu erleichtern, wären vor allem Optimierungen am Aufbau der Peptidkette notwendig.

Ansatzpunkte hierfür könnten möglicherweise die Kondensation von geschützten Peptidfragmenten oder die *native chemical ligation* von ungeschützten Peptidfragmenten sein [105]. Es könnte auch versucht werden, die beiden Zyklisierungsschritte zu umgehen. Dies könnte unter Zuhilfenahme des Redoxpotentials von Selenocystein geschehen. Für Endothelin-1 konnte gezeigt werden, daß die Einführung von Selenocystein in das Peptid zu einer favorisierten Bildung des Selenocystins führte, ohne eine Beeinflussung der Rezeptorerkennung [106]. Somit könnte es möglich sein, durch oxidative Faltung von z.B. [Sec<sup>115</sup>, Sec<sup>107</sup>]-Guanylin-(101-115) bioaktive Guanylinderivate zu synthetisieren. Diese Syntheseoptimierung ist insbesondere für die Darstellung von Substanzbibliotheken, die möglicherweise in Zukunft notwendig werden, unerlässlich. Um ein *high-throughput-screening* mit Guanylin/Uroguanylin-Derivaten durchzuführen, wobei nach Rezeptor-Antagonisten gesucht wird, müssen die Derivate in hoher Zahl, Reinheit und schnell darstellbar sein.

### **Topologische Stereoisomerie von Guanylin- und Uroguanylin-Peptiden**

Guanylin und Uroguanylin sind die bislang einzigen Säugerpeptide, bei denen die Existenz topologischer Stereoisomere nachgewiesen wurde. Außer ihnen ist lediglich über ein Mitglied der Familie der Conotoxine - kanalinhibierende Peptidtoxine tropischer Schnecken der Gattung *Conus* - eine wahrscheinlich ähnliche Charakteristik bekannt [107, 108]. Dort wurden die beiden Isoformen der betreffenden  $\alpha$ -Conotoxine mit zum Guanylin vergleichbarem Disulfidmuster durch NMR-Spektroskopie untersucht, wobei über den Mechanismus ihrer Interkonversion allerdings nichts bekannt ist. Es ist durchaus vorstellbar, daß die topologische Stereoisomerie auch bei anderen vorkommenden Peptiden auftritt. Daher besteht bezüglich des Mechanismus der isomeren Interkonversion ein grundsätzliches Interesse.

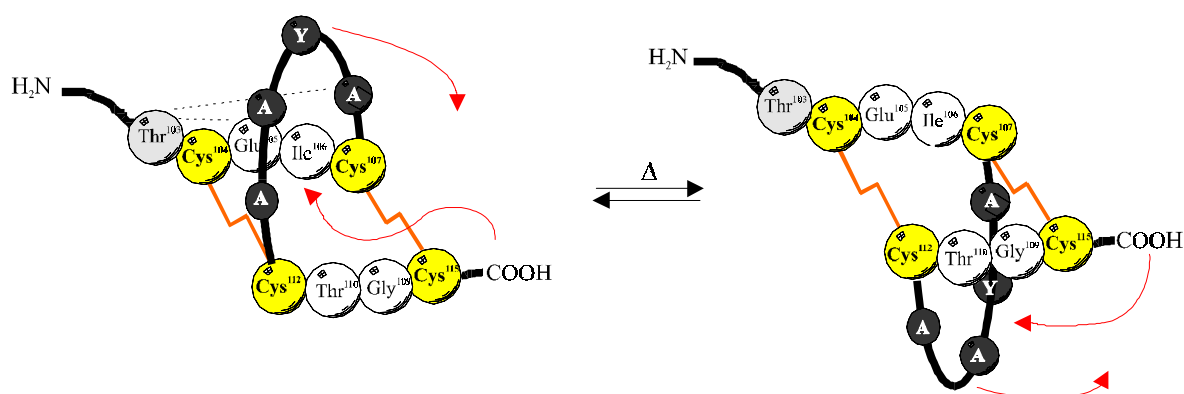
Die Topoisomeren des Guanylins stehen in einem dynamischen Gleichgewicht, das einer schnellen Kinetik unterliegt [40]. Auf Dauer sind die beiden Isoformen nicht voneinander trennbar, sondern lediglich bei tiefen Temperaturen chromatographisch detektierbar. Uroguanylin verhält sich abweichend, indem es bei der chemischen Synthese zwei dauerhaft trennbare Isoformen bildet [65, 66]. Auch diese interkonvertieren, wobei die Geschwindigkeit der Umwandlung von der Temperatur und dem pH-Wert des Lösungsmittels abhängig, aber konzentrationsunabhängig ist [65]. Die erhöhte Stabilität der Uroguanylinisomeren wird maßgeblich durch die natürliche C-terminale Verlängerung des Peptides durch ein Leucin

hervorgerufen. Dieses konnte durch die Synthese von C-terminal verlängerten Guanylderivaten bestätigt werden, die ebenfalls stabilisierte Isoformen bildeten [63]. Weiterhin zeigte ein exocyclisch um Leu<sup>112</sup> verkürztes Uroguanylin-Derivat eine guanylinähnliche Charakteristik [66]. N-terminal verlängerte Guanylderivate, wie Guanylin-(99-115) und Guanylin-(94-115), zeigten keinerlei Stabilisierung der Isoformen, so daß gefolgert werden kann, daß die Länge des N-Terminus keinen sterischen Einfluß auf die Kinetik der Isomerisierung hat [62]. Die Disulfidbrücken werden während der Interkonversion nicht geöffnet, wie in früheren Studien bereits gezeigt wurde [65]. Die Topoisomerisierung ist also ein rein konformativer Prozeß.

Die Untersuchungen dieser Arbeit können ein stark verfeinertes Modell des Umwandlungsmechanismus zwischen den topologischen Isoformen liefern. Von den synthetisch dargestellten Guanylderivaten bewirkte nur die Gly114Ala-Substitution eine Stabilisierung der Isoformen. Alle anderen Aminosäureaustausche hatten entweder eine Erhöhung der Interkonversionsgeschwindigkeit zur Folge, oder die Isoformen waren unter Standard-HPLC-Bedingungen nicht mehr detektierbar. Durch die Verwendung eines Laufmittelsystems bei einem basischeren pH-Wert von 5,7, wodurch mögliche strukturstabilisierende Wasserstoffbrücken unterbunden werden sollten, zeigte sich folgendes: Die Ile106Ala- und die Glu105Ala-Mutanten eluierten bei der HPLC-Analytik bei 30°C mit einem Peak mit einer großen Schulter. Hierbei handelt es sich möglicherweise um konformativ unterschiedliche Zwischenstufen, die wegen der fehlenden Seitenketten von Ile und Glu detektierbar geworden sind. Das Thr103Ala-Derivat zeigte bei dieser Analytik bei hoher und tiefer Temperatur nur einen Peak. Für das originale Guanylin sind Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Thr<sup>103</sup> und Ala<sup>108</sup> sowie zwischen Thr<sup>103</sup> und Glu<sup>105</sup> in der A-Form möglich, so daß ein Thr103Ala-Austausch möglicherweise ebenfalls eine Destabilisierung der Isoformen bewirkt. Wasserstoffbrücken scheinen also bei der Umwandlung der Stereoisomeren für diese eine stabilisierende Rolle zu spielen. Ein chimeres Peptid aus Guanylin und STa mit dem doppelten Austausch Tyr109Val und Ala110Pro zeigte ein guanylinähnliches Isomerenmuster, jedoch war das Isomerenverhältnis zugunsten der später eluierenden Isoform verschoben. Dies zeigt, daß eine Vergrößerung der sterischen Hinderung im Loop des Peptides nichts wesentliches an der Umwandlungscharakteristik ändert. Frühere Arbeiten, bei denen in den zentralen Loop des Guanylins das sterisch anspruchsvollere 2,5-Diiodotyrosin statt Tyrosin eingebaut wurde, bestätigen diesen Befund [63].

Die Untersuchungen zur Umwandlungskinetik beim Uroguanylin zeigen deutlich, daß das exocyclische Leucin den größten Einfluß auf die Konversion der Stereoisomeren ausübt. Durch den Leu112Ala-Austausch wurde die Kinetik der Umwandlung um den Faktor 4-5 heraufgesetzt. Dies zeigt eindeutig den sterischen Beitrag einer verzweigten Seitenkette am C-Terminus für die Stabilität der Isoformen. Hierfür spricht außerdem, daß die Gly110Ala-Substitution die Umwandlungsgeschwindigkeit etwa halbiert, die Isomerisierung also zusätzlich blockiert. Der Einfluß der Substitutionen auf die Umwandlung wird um so kleiner, je weiter der Austausch vom C-Terminus entfernt vorgenommen wird. Es läßt sich, ausgehend von den berechneten Geschwindigkeitskonstanten der Isomerisierungsreaktionen, folgende Abstufung in der Erhöhung der Umwandlungsgeschwindigkeit durch L-Alanin-Austausche vornehmen: Leu112 (4-fach), Asn105 (3-fach), Val104 (2-fach) und Asp98 (1,5-fach). Dies gilt jedoch nur für die Umwandlung der A- in die B-Form. Für die Interkonversion in umgekehrter Richtung zeigten die Austausche Leu112Ala (5-fach) und Asn105Ala (1,5-fach) eine Geschwindigkeitserhöhung. Dies bestätigt, daß der Mechanismus der Konversion nicht für beide Formen gleich ist.

Die Interkonversion der Guanylin/Uroguanylin-Stereoisomeren ist also ein dynamischer Prozeß, der von mehreren Faktoren beeinflusst wird. Neben der exocyclischen, verzweigten Aminosäure spielen auch die Seitenketten der Aminosäuren außerhalb des zentralen Loops eine entscheidende Rolle. Aufgrund der gemachten Beobachtungen läßt sich folgender Mechanismus für die Umwandlung postulieren (Abbildung 24). Der C-Terminus bewegt sich durch den von vier Aminosäuren aufgespannten Loop in Richtung N-Terminus. Gleichzeitig schlägt der Loop einen Bogen um den C-terminalen Bereich der durch die Disulfidbrücken aufgespannten Molekülebene.



**Abbildung 24:** Modell des Umwandlungsmechanismus für Guanylin. Der Loop der A-Form klappt über den C-Terminus hinweg, der sich gleichzeitig durch die Molekülebene hindurch auf den N-Terminus zu bewegt, wodurch die korrespondierende B-Form entsteht. Disulfidbrücken sind orange eingezeichnet, gestrichelte Linien zeigen potentielle Wasserstoffbrücken.

Beim Guanylin-(101-115) vollzieht sich dieser Prozeß sehr schnell (innerhalb weniger Minuten), da der C-Terminus keine exocyclische, hindernde Aminosäure aufweist. Wird allerdings durch die Mutation Gly114Ala eine zusätzliche Methylgruppe am C-Terminus eingebaut, verlangsamt sich die Umwandlung, da entweder das Umklappen des Loops oder die Bewegung des C-Terminus in Richtung N-Terminus erschwert ist. Demnach müßten sich die Guanylintopoisomeren weiter stabilisieren lassen, indem statt Gly<sup>114</sup> nicht Ala, sondern eine noch weitaus effektiver sterisch hindernde Aminosäure, wie z.B. Val, Ile oder tert-Butylglycin, eingebaut wird. Uroguanylin vollzieht die Interkonversion nur unter zusätzlicher Energiezufuhr, hier ist also die C-Terminale Verlängerung ausschlaggebend. Wird diese jedoch wie in der Mutante Leu112Ala gegen eine unverzweigte Aminosäure ausgetauscht, ist die Umwandlungsbarriere herabgesetzt und die Interkonversion läuft schneller ab. Die Lage der Seitenketten in den Peptiden ist nicht, wie das Peptidrückgrat, starr festgelegt, sondern sie sind flexibel und können nach außen, also vom Molekül abgewandt, oder nach innen gewandt sein. Deshalb läßt sich nicht genau sagen, ob sie das Umklappen des Loops oder die Wanderung des C-Terminus beeinflussen. Da eine Verlängerung des N-Terminus bekanntermaßen zu keiner Stabilisierung der Topoisomeren führt, muß der C-Terminus der Bereich des Peptides sein, der sich durch die Ebene hindurchbewegen kann. Möglicherweise ist der N-Terminus in der A-Form durch Wasserstoffbrückenbindungen derart fixiert, daß er relativ starr vorliegt und sich nicht durch die Ebene hindurchbewegen kann. Hierfür sprechen



die räumlichen Nähen zwischen den Amidwasserstoffatomen von Ala<sup>108</sup> und Glu<sup>105</sup> mit dem Carbonyl-Kohlenstoff des Thr<sup>103</sup>.

Ein derartiges Verhalten der Interkonversion zwischen zwei Isoformen, die über den C-Terminus gesteuert wird, konnte bislang bei keinem anderen Peptid gezeigt werden. Die biologische Funktion der B-Formen von Guanylin und Uroguanylin *in vitro* ist bisher völlig unklar. Es werden allerdings mehrere Spekulationen angestellt:

- Die B-Form könnte ein Reservoir für die A-Form darstellen, die in die korrespondierende biologisch aktive Komponente überführt wird.
- Die B-Form wirkt an einem anderen Rezeptor.
- Die B-Form entsteht nur aus strukturellen Gründen.

Es bleibt aber bezüglich der biologischen Bedeutung festzuhalten, daß kurze Guanylinmoleküle, gleich ob 14, 15 oder 16 Aminosäuren, grundsätzlich als zwei topologische Stereoisomere in einem Verhältnis von etwa 1:1 vorkommen. Im Gegensatz dazu ist für die verschieden großen Varianten von Uroguanylin aufgrund ihrer signifikant erhöhten Stabilität unklar, ob die GC-C-inaktive B-Isoform überhaupt natürlich vorkommt.

### **Struktur-Aktivitäts-Relation von GC-C-aktivierenden Peptiden**

Über die Struktur-Aktivitäts-Relation von endogenen Liganden der Guanylatzyklase-C sind bereits einige wichtige Informationen bekannt. Es wurde gezeigt, daß von den beiden vorkommenden Isoformen der natürlichen Liganden nur das A-Isomer die GC-C aktiviert [63, 65]. Dies gilt sowohl für Uroguanylin, bei dem diese Isoformen stabilisiert sind, als auch für Guanylin, das zur Stabilisierung eine C-terminale Elongation benötigt [63, 65]. Die A-Isoformen ähneln in ihrer räumlichen Struktur derjenigen der toxischen Domäne des hitzestabilen Enterotoxins STa, das zu einer effektiveren Aktivierung von GC-C in der Lage ist [62]. Beide Disulfidbrücken in einer 1-3/2-4-Anordnung sind essentiell für die Aktivierung der Guanylatzyklase-C. Lineare und monozyklische Derivate von Guanylin und Uroguanylin sind nicht aktiv [40, 86]. Die Bedeutung einiger Aminosäuren für die Aktivität der Peptide ist aus früheren Arbeiten bekannt. So sind die Aminosäuren Thr<sup>103</sup> im Guanylin und Asp<sup>99</sup> im Uroguanylin von essentieller Notwendigkeit für die Rezeptoraktivierung [40]. Ein Austausch von YA gegen GG im Guanylin resultierte ebenfalls im Verlust der Aktivität des Peptides, so daß diesem Segment eine entscheidende Rolle bei der Interaktion mit der GC-C beigemessen wird [40]. In der Literatur wurde Guanylin-(100-115) der Ratte aus 16 Aminosäuren als nicht aktiv im T84-Assay beschrieben [82]. Dieser Befund konnte nicht bestätigt werden.

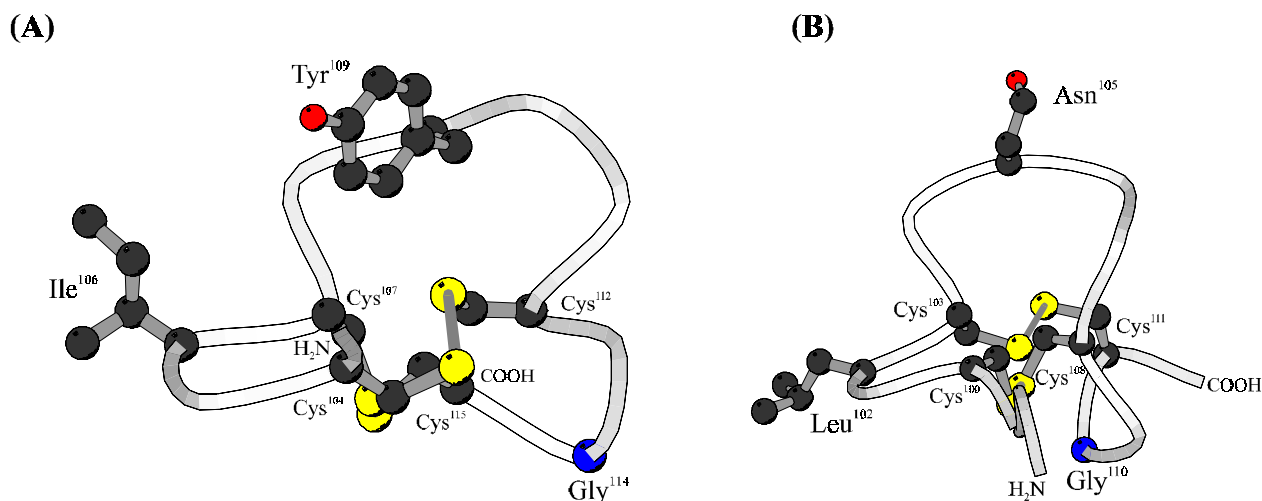
Synthetisches Guanylin-(100-115) der Ratte war im Bioassay ebenso aktiv wie das kürzere Rattenguanylin-(101-115). Dieses Ergebnis scheint auch plausibel, da es bei menschlichem Guanylin keinen Unterschied zwischen Guanylin-(99-115) und Guanylin-(101-115) in der Aktivität gibt [40]. Der von der oben erwähnten Arbeitsgruppe durchgeführte T84-Bioassay war demnach mit Fehlern behaftet.

Um die Bedeutung einzelner Seitenketten Guanylins und Uroguanylins für die Aktivierung von GC-C zu ermitteln, wurde von beiden Peptiden ein systematischer L-Alaninscan durchgeführt. Anschließend wurde die biologische Aktivität der synthetisch dargestellten Peptide im T84/cGMP-Bioassay und zusätzlich in Rezeptorbindungsstudien an Membranpräparationen von 293T-Zellen überprüft. Dabei zeigte sich, daß beim Guanylin die Aminosäuren Gly<sup>114</sup>, Ile<sup>106</sup> und Tyr<sup>109</sup> essentiell für die Rezeptoraktivierung und -bindung sind. Der Austausch dieser Aminosäuren gegen L-Alanin resultierte in einem vollständigen Verlust des biologischen Potentials bezüglich der Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels. Beim Uroguanylin führten die Substitutionen Gly110Ala, Leu112Ala sowie Asn105Ala zum Verlust der Bioaktivität. Die B-Formen aller getesteten Uroguanylinderivate besaßen, wie erwartet, nur ein sehr stark vermindertes Potential zur GC-C-Aktivierung. Die so identifizierten essentiellen Aminosäuren für die Rezeptoraktivierung und -bindung befinden sich an identischen Sequenzpositionen innerhalb der aktiven Domänen beider Peptide, so daß angenommen werden kann, daß sie gleichsinnig an den Rezeptor andocken. Durch Substitutionsversuche an STa wurden die hier identifizierten Aminosäureseitenketten ebenfalls als essentiell für die Potenz des STa verantwortlich gemacht [16]. Weitergehend wurde die Toleranz des zentralen Asn gegenüber Asp, His, Gln und Tyr untersucht. Diese Substitutionen wurden allesamt toleriert, was sich in einer ähnlichen Toxizität dieser ST-Mutanten, verglichen mit Wildtyp-STa, zeigte [109]. Substitutionen, die die räumliche Orientierung des Peptidrückgrates verändern, z.B. D-Aminosäure-Austausche, hatten einen größeren senkenden Einfluß auf die Toxizität des STa [16]. Der Verlust der Aktivität der Tyr109Ala-Mutante des Guanylins kann mit der herabgesetzten Aktivität eines 3,5-Diiodotyrosin-Guanylins korreliert werden [63]. Ebenso würde ein am Tyrosin <sup>125</sup>I-markiertes Guanylin mit einem verminderten Potential an den Rezeptor binden. Deshalb können Bindungskinetiken, die mit in dieser Weise markiertem Guanylin durchgeführt würden, streng genommen nicht als exaktes Experiment akzeptiert werden. Für den Austausch von Gly<sup>114</sup> bei Guanylin sowie Gly<sup>110</sup> bei Uroguanylin gegen Ala kann spekuliert werden, daß der Einbau einer zusätzlichen Methylgruppe am C-Terminus der Liganden dazu führt, daß diese nicht mehr ausreichend mit dem Rezeptor wechselwirken können und somit die

Bindung/Aktivierung schwächer wird. Die kleine Aminosäure Gly könnte also eine dirigierende Wirkung in Richtung einer Bindetasche des Rezeptors haben. Die Mutation der Ile106-Seitenkette beim Guanylin und der Leu102-Seitenkette beim Uroguanylin gegen L-Alanin führen zu einem vollständigen Verlust der Bioaktivität. Deren hydrophobe Seitenketten sind chemisch sehr ähnlich. Es kann daher angenommen werden, daß sie eine gleichsinnige hydrophobe Wechselwirkung mit dem Rezeptor eingehen. Die chemische Natur der dritten essentiellen Aminosäure für die Interaktion mit GC-C scheint sehr unterschiedlich zu sein. Beim Guanylin ist die Anwesenheit einer aromatischen Seitenkette notwendig, beim Uroguanylin dagegen das Vorhandensein eines Carbonsäureamides. Beide Gruppen verfügen allerdings über  $\pi$ -Systeme, die in der Lage sind, mit dem Rezeptor zu interagieren. STa verfügt ebenfalls über diese essentiellen Strukturmerkmale. Die Identifizierung der Ligandenbindungsregion der GC-C wurde mittels eines [ $^{11}\text{C}$ ]STa-(4-17)-Derivates erreicht [79]. In diesem Derivat wurde Asn11 von STa gegen *p*-Azido-phenylalanin ausgetauscht. Dementsprechend bewirkt die Substitution von Asn gegen eine aromatische Seitenkette keine grundsätzliche Veränderung des Bindungsverhaltens von STa. Die höhere Potenz von STa bezüglich der GC-C-Aktivierung muß also in der zusätzlich vorhandenen dritten Disulfidbrücke gesucht werden, die das Molekül sehr starr macht. Die Toleranz des zentralen Asn gegenüber Aminosäuren, die ein  $\pi$ -System beinhalten, zeigt an, daß für die Aktivierung der GC-C wahrscheinlich diese Doppelbindungen (Wasserstoff-Akzeptoren) notwendig sind [109]. Allerdings scheint ein weiterer Faktor, wie etwa die Länge der Seitenkette, ebenfalls einen Einfluß zu haben. Die chimere Peptide aus Guanylin, Uroguanylin und STa zeigen alle, bis auf das Gua-Uro-Hybrid, eine ähnliche GC-C-Aktivierung wie die korrespondierenden Wildtyp-Peptide. Der Grund, warum das Hybrid aus Guanylin und Uroguanylin nicht vollständig potent ist, könnte in der dirigierenden Wirkung der Isopropyl-Seitenketten des Valins im Zusammenspiel mit der Leu-Seitenkette im originalen Uroguanylin gesucht werden. Eine kooperative Wirkung mehrerer Seitenketten scheint zwingend notwendig, damit ein Ligand an GC-C andocken kann. Zur weiteren Klärung dieser Frage könnten chimere Peptide mit folgenden Aminosäuresequenzen nützlich sein: NDDCEICAYAACTGCL und PGTCELCVNVACTGC. Auch die Punktmutationen Tyr109Asn im Guanylin oder Asn105Tyr im Uroguanylin könnten weiteres Licht bezüglich der Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor bringen.

Durch die Identifizierung der Bindestelle der GC-C für STa, die kürzlich von Hasegawa *et al.* publiziert wurde [36], werden neue Möglichkeiten geschaffen, um das System

Guanylatzyklase-C/STa/Guanylin/Uroguanylin weiter zu charakterisieren. Die Ligandenbindungsstelle ist über viele Spezies extrem stark konserviert. Durch die strukturelle Aufklärung der extrazellulären Domäne in Anwesenheit des Liganden könnte es somit zukünftig möglich werden, durch molekulares Modellieren GC-C-Antagonisten zu entwerfen und ihr klinisches Potential zu untersuchen.



**Abbildung 25:** Strukturmodell des Pharmakophors von Guanylin und Uroguanylin mit den identifizierten Merkmalen. (A) Molscript-Darstellung der A-Form von Guanylin (Brookhaven Protein Data Bank, 1GNA); (B) Molscript-Darstellung der A-Form von Uroguanylin (1UYA). Die essentiellen Seitenketten sowie die Cysteine sind eingezeichnet. Die Lage der gezeigten Seitenketten ist nur durch eine mögliche Orientierung repräsentiert. Gelb = Schwefelatom, rot = Sauerstoffatom, schwarz = Kohlenstoffatom, blau = Glycin-C $\alpha$ .

Hilfreich wären in diesem Zusammenhang auch die Durchführungen von QSAR-Studien (Quantitative-Struktur-Aktivitäts-Relationen), die ausgehend von den in Abbildung 25 dargestellten Pharmakophoren ein quantitatives Bild der Ligand-Rezeptor-Interaktion liefern könnten. Ebenfalls sollten detailliertere Bindungsstudien mit allen Liganden unter Verwendung eines exozyklischen  $^{125}\text{I}$ -Tyr-Tyr<sup>109</sup>Phe-Guanylinderivates durchgeführt werden. *Cross-linking*-Studien mit Pap<sup>109</sup>-Guanylin, Pap<sup>105</sup>-Uroguanylin oder ähnlichen photosensitiven Derivaten wären eine sinnvolle Ergänzung zur Identifizierung der Bindungsstelle der humanen Liganden mit ihrem Rezeptor.

Basierend auf den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen, insbesondere der erstmaligen Definition eines GC-C-Pharmakophors, können zukünftige experimentelle Arbeiten unter umfassenden Strukturvariationen von Guanylin und Uroguanylin - Einbau verschiedener aromatischer Derivate, die Verkürzung des Abstandes zwischen den Cysteinresten oder

---

Einbau unnatürlicher Aminosäurederivate - wesentlich gezielter durchgeführt werden. Auf diesem Wege könnte eine Blockade von GC-C und damit ein Antagonist bakterieller, enterotoxinvermittelter sekretorischer Diarrhöen entwickelt werden.

Die hier vorgestellten Arbeiten sind aber auch geeignet, um das grundsätzliche Verständnis der Funktion membranständiger Rezeptorguanylatzyklen mit ihren Liganden, darunter medizinisch so relevante wie die natriuretischen Peptide, zu verbessern. Eine höchst aktuelle Relevanz erhalten die Arbeiten dadurch, daß kürzlich ein inhibitorischer Effekt von Uroguanylin auf die Bildung intestinaler Polypen, vermutlich durch Induktion apoptotischer Mechanismen, berichtet wurde [110].

## 7. Zusammenfassung

Der Rezeptor Guanylatzyklase-C (GC-C) ist mit seinen endogenen Liganden, den Peptidhormonen Guanylin und Uroguanylin, an der Regulation des intestinalen Elektrolyt- und Wasserhaushaltes wesentlich beteiligt. Durch Enterotoxine pathogener Bakterienstämme wird GC-C ebenfalls stimuliert, so daß schwere sekretorische Diarrhöen verursacht werden können, was den Rezeptor zu einem pharmakologisch wichtigen Zielprotein für eine antagonistische Blockierung macht.

Ein Hauptziel dieser Arbeit war daher, durch eine differentielle Struktur-Aktivitäts-Relation essentielle Aminosäuren in den Peptidgerüsten von Guanylin und Uroguanylin für die Rezeptoraktivierung und -bindung zu identifizieren. Die hierfür benötigten Peptide wurden durch Festphasensynthese unter Anwendung der Fmoc-Schutzgruppentechnik dargestellt. Die Einführung der für die biologische Aktivität der Peptide absolut notwendigen Disulfidbrücken in einer relativen 1-3/2-4-Verbrückung erfolgte selektiv unter Verwendung des orthogonalen Cystein-Schutzgruppenpaares Trt/Acm. Durch positionales L-Alaninscanning beider Peptide, bei dem systematisch alle variablen Aminosäuren der Peptide gegen L-Alanin ausgetauscht wurden, konnten jeweils drei Aminosäuren identifiziert werden, die für die Bindung an den Rezeptor GC-C essentiell sind. Beim Uroguanylin sind dies Gly<sup>110</sup>, Asn<sup>105</sup> und Leu<sup>102</sup>, beim Guanylin Gly<sup>114</sup>, Tyr<sup>109</sup> sowie Ile<sup>106</sup>. Die synthetischen Peptide, bei denen eine dieser Aminosäuren gegen L-Alanin substituiert wurde, waren nicht mehr in der Lage, die katalytische Domäne von GC-C in T84-Zellen zu aktivieren und radioaktiv markiertes STa von der extrazellulären Domäne der GC-C zu verdrängen. Die identifizierten essentiellen Aminosäuren beider Peptide befinden sich an identischen Sequenzpositionen bezogen auf das von den vier Cysteinen gebildete Peptidgerüst, so daß davon ausgegangen werden kann, daß beide Peptide gleichsinnig mit der GC-C wechselwirken. Chimere Peptide aus Guanylin, Uroguanylin und STa, bei denen jeweils der mittlere Bereich des Peptides durch den eines der anderen Peptide substituiert wurde, waren ebenfalls in der Lage, cGMP in T84-Zellen zu generieren. Allerdings war die Aktivität des Gua-Uro-Chimeren um etwa 50% herabgesetzt. Damit ist zusammen mit der bereits bekannten räumlichen Struktur ein GC-C-bindendes Pharmakophor definiert, dessen nicht essentielle Sequenzpositionen durch molekulare Variationen für die Entwicklung peptidischer Guanylinmimetika zur Verfügung stehen.

Guanylin und Uroguanylin bilden jeweils zwei in einem dynamischen Gleichgewicht miteinander korrespondierende, topologische Stereoisomere. Beim Uroguanylin sind diese Isomeren durch die natürliche C-terminale Elongation derart stabil, daß eine separate

Charakterisierung möglich ist. Guanylin fehlt diese C-terminale Verlängerung, weshalb seine Isomeren sehr schnell interkonvertieren und nur als Mischung analysierbar sind. Die in dieser Arbeit synthetisch dargestellten Peptide wurden bezüglich des Einflusses der Sequenzvarianten auf das Phänomen der topologischen Isomerie untersucht. Dadurch konnte ein modellhafter Mechanismus der Interkonversion aufgestellt werden, dessen Geschwindigkeit hauptsächlich durch den sterischen Einfluß der exocyclischen Aminosäure gesteuert wird. Intramolekulare Wasserstoffbrücken spielen mit großer Sicherheit eine stabilisierende Rolle bei der Umwandlung der Guanylinisoformen. Das aufgestellte Modell des rein konformativen Umwandlungsmechanismus beruht auf einer Wanderung des C-Terminus durch die Molekülebene hindurch in Richtung N-Terminus, wobei der zentrale Loop simultan über den C-Terminus hinwegklappt.

Im Gegensatz zu den meisten Peptidhormonen wird Guanylin hauptsächlich als Prohormon aus 94 Aminosäuren sekretiert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß das ursprünglich aus intestinalem Gewebe isolierte Guanylin aus 15 Aminosäuren durch chemische Spaltung der Asp-Pro-Amidbindung in Proguanylin gebildet werden kann, wobei ein sinkender pH-Wert und steigende Temperatur die Spaltung begünstigen. Es ist daher nicht gerechtfertigt, Guanylin-(101-115) als natürliches Peptid zu bezeichnen.

Guanylin enthält zwei Disulfidbrücken, die für die Rezeptoraktivierung absolut notwendig sind. Reduziertes Guanylin aus 15 Aminosäuren war nicht in der Lage, während einer oxidativen Faltung die native Disulfidverbrückung wiederherzustellen. Im Gegensatz dazu bildete reduziertes Proguanylin bei der disulfidgekoppelten Faltung fast ausschließlich das Isomer mit der nativen Disulfidverbrückung wieder aus. Guanylin-(63-115), dem die ersten 31 Aminosäuren der Prosequenz fehlen, war dazu nicht fähig, es entstanden fast ausschließlich die beiden nicht nativen Isomere. Es muß in funktioneller Hinsicht gefolgert werden, daß die N-terminale Region von Proguanylin signifikant dazu beiträgt, die native Disulfidverbrückung auszubilden. Durch NMR-spektroskopische Strukturanalysen wurde eine direkte Nachbarschaft von N- und C-Terminus in Proguanylin eindeutig nachgewiesen. Es erscheint, daß diese Interaktionen eine wichtige Rolle für das Ausbilden der korrekten Disulfidverbrückung haben. Diese räumliche Nähe erklärt ebenso, daß in Proguanylin der N-Terminus den C-Terminus abschirmen könnte, um so GC-C vor einer Aktivierung durch Proguanylin zu schützen.

**Stichwörter:** Guanylatzyklase C, Peptide, Struktur-Aktivitäts-Beziehung

## 8. Literaturverzeichnis

- [1] Vaupel, P. und Ewe, K. (1995) Funktionen des Magen-Darm-Kanals. In: Schmidt, R.F., Thews, G. (Hrsg.): *Physiologie des Menschen*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 806-848.
- [2] Wilson, K.H. (1991) The gastrointestinal microflora. In: Yamada T. (Hrsg.): *Textbook of Gastroenterology*, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, New York, Basel, Cambridge, Band 1, 532-543.
- [3] Snyder, J.D. und Merson, M.H. (1982) The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease: a review of active surveillance data. *Bull. WHO* **60**, 605-613.
- [4] Gianella, R.A. (1981) Pathogenesis of acute bacterial diarrhoeal disorders. *Annu. Rev. Med.* **32**, 341-357.
- [5] Field, M. und Semrad, C.E. (1993) Toxigenic diarrheas, congenital diarrheas, and cystic fibrosis: disorders of intestinal ion transport. *Annu. Rev. Physiol.* **55**, 631-655.
- [6] Chu, S.H.W. und Walker, A. (1993) Bacterial toxin interaction with the developing intestine. *Gastroenterology* **104**, 916-925.
- [7] The World Health Report (1995) *World Health Forum* **16**, 377-385.
- [8] WHO Fact Sheets (1996) No. **109**.
- [9] Farthing, M.J.G. (1994) Travellers diarrhoea. *Gut* **35**, 1-4.
- [10] Orndorff, G.R., Sadjimin, T., Simanjuntak, C.H., O'Hanley, P., Punjabi, N.H., Tjokrosonto, S., Carwin, A., Dibley, M., Lebron, C.I. und Echeverria, P. (1996) Enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea in children less than five years of age in central Java. *Am J. Trop. Med. Hyg.* **55**, 449-451.
- [11] Field, M., Graf, L.H. Jr., Laird, W.J. und Smith, P.L. (1978) Heat-Stable enterotoxin of *Escherichia coli*: In vitro effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 2800-2804.
- [12] Schulz, S., Green, C.K., Yuen, P.S. und Garbers, D.L. (1990) Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell* **63**, 941-948.
- [13] Hidaka, Y., Kubota, H., Yoshimura, S., Ito, H., Takeda, Y. und Shimonishi, Y. (1988) Disulfide linkages in a heat-stable enterotoxin (STp) produced by a porcine strain of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **61**, 1265-1271.
- [14] Shimonishi, Y., Hidaka, Y., Koizumi, M., Hane, M., Aimoto, S., Takeda, T., Miwatani, T. und Takeda, Y. (1987) Mode of disulfide bond formation of a heat-stable enterotoxin (STh) produced by a human strain of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **215**, 165-170.
- [15] Yoshimura, S., Ikemura, H., Watanabe, H., Aimoto, S., Shimonishi, Y., Hara, S., Takeda, T., Miwatani, T. und Takeda, Y. (1985) Essential structure for full enterotoxigenic activity of heat-stable enterotoxin produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **181**, 138-142.
- [16] Carpick, B.W. und Gariépy, J. (1991) Structural characterization of functionally important regions of the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin ST1b. *Biochemistry* **33**, 4803-4809.
- [17] Yamasaki, S., Sato, T., Hidaka, Y., Ozaki, H., Ito, H., Hirayama, T., Takeda, Y., Sugimura, T., Tai, A. und Shimonishi, Y. (1990) Structure-activity relationship of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin: role of Ala residue at position 14 in toxin-receptor interaction. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **63**, 2063-2070.



- 
- [18] Kubota, H., Hidaka, Y., Ozaki, H., Ito, H., Hirayama, T., Takeda, Y. und Shimonishi, Y. (1989) A long-acting heat-stable enterotoxin analog of enterotoxigenic *Escherichia coli* with a single D-amino acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 229-235.
- [19] Yamasaki, S., Hidaka, Y., Ito, H., Takeda, Y. und Shimonishi, Y. (1988) Structural requirements for the spatial structure and toxicity of heat-stable enterotoxin (STh) of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **61**, 1701-1706.
- [20] Gariépy, J., Judd, A.K. und Schoolnik, G.K. (1987) Importance of disulfide bridges in the structure and activity of *Escherichia coli* enterotoxin ST1b. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8907-8911.
- [21] Ozaki, H., Sato, T., Kubota, H., Hata, Y., Katsube, Y. und Shimonishi, Y. (1991) Molecular structure of the toxic domain of heat-stable enterotoxin produced by a pathogenic strain of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**, 5934-5941.
- [22] Gariépy, J., Lane, A., Frayman, F., Wilbur, D., Robien, W., Schoolnik, G.K. und Jardetzky, O. (1986) Structure of the toxic domain of the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin ST I. *Biochemistry* **25**, 7854-7866.
- [23] Ozaki, H., Kubota, H., Sato, T., Hidaka, Y., Tamaoki, H., Kobayashi, Y., Kyogoku, Y., Sugimura, T., Tai, A. und Shimonishi, Y. (1991) Conformation in solution of the fully toxic domain of heat-stable enterotoxin (STp) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **64**, 1136-1144.
- [24] Hirayama, T., Wada, A., Iwata, N., Takasaki, S., Shimonishi, Y. und Takeda, Y. (1992) Glycoprotein receptors for a heat-stable enterotoxin (STh) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **60**, 4213-4220.
- [25] Vaandrager, A., Schulz, S., DeJonge, H. und Garbers, D. (1993) Guanylyl cyclase C is an N-linked glycoprotein receptor that accounts for multiple heat-stable enterotoxin-binding proteins in the intestine. *J. Biol. Chem.* **268**, 2174-2179.
- [26] Garbers, D. (1991) The guanylyl cyclase receptor family. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **69**, 1618-1621
- [27] Drewett, J.G. und Garbers, D.L. (1994) The family of guanylyl cyclase receptors and their ligands. *Endocr. Rev.* **15**, 135-162.
- [28] Schulz, S., Lopez, M.J., Kuhn, M. und Garbers, D.L. (1997) Disruption of the guanylyl cyclase-C gene leads to a paradoxical phenotype of viable but heat-stable enterotoxin-resistant mice. *J. Clin. Invest.* **100**, 1590-1595.
- [29] Mann, E.A., Jump, M.L., Wu, J., Yee, E. und Gianella, R.A. (1997) Mice lacking the guanylyl cyclase-C receptor are resistant to STa-induced intestinal secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **239**, 463-466.
- [30] Pfeifer, A., Aszódi, A., Seidler, U., Ruth, P., Hofmann, F. und Fässler, R. (1996) Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science* **274**, 2082-2086.
- [31] Gianella, R.A. (1995) *Escherichia coli* heat-stable enterotoxins, guanylyns, and their receptors: What are they and what they do? *J. Lab. Clin. Med.* **125**, 173-181.
- [32] Laney, D.W., Mann, E.A., Dellon, S.C., Perkins, D.R., Gianella, R.A. und Cohen, M.B. (1992) Novel sites of expression of an *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin receptor in the developing rat. *Am. J. Physiol.* **263**, G816-G821.

- [33] Li, Z. und Goy, M.F. (1993) Peptide-regulated guanylate cyclase pathways in rat colon: *in situ* localization of GC-A, GC-C and guanylin mRNA. *Am. J. Physiol.* **265**, G394-G402.
- [34] Kämpf, U., Kruhøffer, M., Bargsten, G., Grube, D. und Forssmann, W.G. (1996) Guanylin and its receptor (guanylyl cyclase C): expression and cell-specific localization in the gastrointestinal tract. *Regul. Pept.* **64** (Suppl.), 85.
- [35] Forte, L.R., Krause, W.J. und Freeman, R.H. (1989) *Escherichia coli* enterotoxin receptors: localized in opossum kidney, intestine and testis. *Am. J. Physiol.* **257**, F874-F881.
- [36] Hasegawa, M., Hidaka, Y., Matsumoto, Y., Sanni, T. und Shimonishi, Y. (1999) Determination of the binding site on the extracellular domain of guanylyl cyclase C to heat-stable enterotoxin. *J. Biol. Chem.* **274**, 31713-31718.
- [37] Vaandrager, A.B., van der Weil, E., Hom, M.L., Luthjens, L.H. und de Jonge, H.R. (1994) Heat-stable enterotoxin receptor/guanylyl cyclase C is an oligomer consisting of functionally distinct subunits, which are non-covalently linked in the intestine. *J. Biol. Chem.* **269**, 16409-16415.
- [38] Schulz, S. und Waldman, S.A. (1999) The guanylyl cyclase family of natriuretic peptide receptors. *Vitam. Horm.* **57**, 123-151.
- [39] Currie, M.G., Fok, K.F., Kato, J., Moore, R.J., Hamra, F.K., Duffin, K. und Smith, C.E. (1992) Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 803-808.
- [40] Klodt, J., Kuhn, M., Marx, U.C., Martin, S., Rösch, P., Forssmann, W.G. und Adermann, K. (1997) Synthesis, biological activity and isomerism of guanylate cyclase C-activating peptides guanylin and uroguanylin. *J. Peptide Res.* **50**, 222-230.
- [41] Kuhn, M., Adermann, K., Jähne, J., Forssmann, W.G. und Rechkemmer, G. (1994) Segmental differences in the effects of guanylin and *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin on Cl<sup>-</sup> secretion in human gut. *J. Physiol. (London)* **479**, 433-440.
- [42] Schulz, S., Chrisman, T.D. und Garbers, D.L. (1992) Cloning and expression of guanylin; its existence in various mammalian tissues. *J. Biol. Chem.* **267**, 16019-16021.
- [43] Wiegand, R.C., Kato, J., Huang, M.D., Fok, K.F., Kachur, J.F. und Currie, M.G. (1992) Human guanylin: cDNA isolation, structure and activity. *FEBS Lett.* **311**, 150-154.
- [44] De Sauvage, F.J., Keshav, S., Kuang, W.J., Gillett, N., Henzel, W. und Goeddel, D.V. (1992) Precursor structure, expression and tissue distribution of human guanylin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9089-9093.
- [45] Kuhn, M., Raida, M., Adermann, K., Schulz-Knappe, P., Gerzer, R., Heim, J.M. und Forssmann, W.G. (1993) The circulating bioactive form of human guanylin is a high molecular weight peptide (10.3 kDa) *FEBS Lett.* **318**, 205-209.
- [46] Nakazato, M., Yamaguchi, H., Shiomi, K., Date, Y., Fujimoto, S., Kangawa, K., Matsuo, H. und Matsukura, S. (1994) Identification of 10-kDa proguanylin as a major guanylin molecule in human intestine and plasma and its increase in renal insufficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, 1966-1975.
- [47] Garcia, K.C., de Sauvage, F.J., Struble, M., Henzel, W., Reilly, D. und Goeddel, D.V. (1993) Processing and characterisation of human proguanylin expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268**, 22397-22401.

- [48] Martin, S., Adermann, K., Forssmann, W.G. und Kuhn, M. (1999) Regulated, site-directed secretion of proguanylin from isolated rat colonic mucosa. *Endocrinology* **140**, 5022-5029.
- [49] Lewis, L.G., Witte, D.P., Laney, D.W., Currie, M.G. und Cohen, M.B. (1993) Guanylin mRNA is expressed in villous enterocytes of the rat small intestine and superficial epithelia of the rat colon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 553-560.
- [50] Hamra, F.K., Forte, L.R., Eber, S.L., Pidhorodeckyj, N.V., Krause, W.J., Freeman, R.H., Chin, D.T., Tomkins, J.A., Fok, K.F., Smith, C.E., Duffin, K.L., Siegel, N.R. und Currie, M.G. (1993) Uroguanylin: structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10464-10468.
- [51] Kita, T., Smith, C.E., Fok, K.F., Duffin, K.L., Moore, W.M., Karabatsos, P.J., Kachur, J.F., Hamra, F.K., Pidhorodeckyj, N.V., Forte, L.R. und Currie, M.G. (1994) Characterization of human uroguanylin: a member of the guanylin peptide family. *Am. J. Physiol.* **35**, F342-F348.
- [52] Hess, R., Kuhn, M., Schulz-Knappe, P., Raida, M., Fuchs, M., Klodt, J., Adermann, K., Kaefer, V., Cetin, Y. und Forssmann, W.G. (1995) GCAP-II: isolation and characterization of the circulating form of human uroguanylin. *FEBS Lett.* **374**, 34-38.
- [53] Miyazato, M., Nakazato, M., Yamaguchi, H., Data, Y., Kojima, M., Kangawa, K., Matsuo, H. und Matsukura, S. (1996) Cloning and characterization of a cDNA encoding a precursor for human uroguanylin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **219**, 644-648.
- [54] Whitaker, T.L., Witte, D.P., Scott, M.C. und Cohen, M.B. (1997) Uroguanylin and guanylin: distinct but overlapping patterns of messenger RNA expression in mouse intestine. *Gastroenterology* **113**, 1000-1006.
- [55] Fan, X., Hamra, F.K., Freeman, R.H., Eber, S.L., Krause, W.J., Lim, R.W., Pace, V.M., Currie, M.G. und Forte, L.R. (1996) Uroguanylin: Cloning of preprouroguanylin cDNA, mRNA expression in the intestine and heart and isolation of uroguanylin and prouroguanylin from plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **219**, 457-462.
- [56] Hamra, F.K., Eber, S.L., Chin, D.T., Currie, M.G. und Forte, L.R. (1997) Regulation of intestinal uroguanylin/guanylin receptor-mediated responses by mucosal acidity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2705-2710.
- [57] Mägert, H.J., Hill, O., Zucht, H.D., Martin, S., Meyer, M., Forssmann, W.G. und Adermann, K. (1999) Porcine guanylin and uroguanylin: cDNA sequences, deduced amino acid sequences, and biological activity of the chemically synthesized peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **259**, 141-148.
- [58] Greenberg, R.N.M., Crytzer, J., Krause, W.J., Eber, S.L., Hamra, F.K. und Forte, L.R. (1997) Comparison of effects of uroguanylin, guanylin, and *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STa in mouse intestine and kidney. *J. Investig. Med.* **45**, 276-283.
- [59] Fonteles, M.C., Greenberg, R.N., Monteiro, H.S.A., Currie, M.G. und Forte, L.R. (1998) Natriuretic and kaliuretic activities of guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.* **275**, F191-F197.

- [60] Forte, L.R., Eber, S.L., Fan, X., London, R.M., Wang, Y., Rowland, L.W., Chin, D.T., Freeman, R.H. und Krause, W.J. (1999) Lymphoguanylin: Cloning, characterization of a unique member of the guanylin peptide family. *Endocrinology* **140**, 1800-1806.
- [61] Mao, B. (1989) Molecular topology of multiple-disulfide polypeptide chains. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 6132-6136.
- [62] Skelton, N.J., Garcia, C., Goeddel, D., Quan, C. und Burnier J.P. (1994) Determination of the solution structure of the peptide hormone guanylin: observation of a novel form of topological stereoisomerism. *Biochemistry* **33**, 13581-13592.
- [63] Schulz, A., Escher, S., Marx, U., Meyer, M., Rösch, P., Forssmann, W.G. und Adermann, K. (1998) Carboxy-terminal extension stabilizes the topological stereoisomers of guanylin. *J. Peptide Res.* **52**, 518-525.
- [64] Escher, S. (1997) Synthese, biologische Aktivität und Dynamik stabilisierter Derivate der topologischen Stereoisomere des Peptidhormones Guanylin. *Diplomarbeit*, Universität Hannover.
- [65] Marx, U.C., Klodt, J., Meyer, M., Gerlach, H., Rösch, P., Forssmann, W.G. und Adermann, K. (1998) One peptide, two topologies: structure and interconversion dynamics of human uroguanylin isomers. *J. Peptide Res.* **52**, 229-240.
- [66] Chino, N., Kubo, S., Miyazato, M., Nakazato, M., Kangawa, K. und Sakakibara, S. (1996) Generation of two isomers with the same disulfide connectivity during disulfide bond formation of human uroguanylin. *Lett. Pept. Sci.* **3**, 45-52.
- [67] Klodt, J. (1997) Untersuchungen zur Moleküldynamik und Struktur-Aktivitätsbeziehung der Peptidhormone Guanylin und Uroguanylin. *Dissertation*, Universität Hannover.
- [68] Beck-Sickinger, A.G. und Jung, G. (1995) Structure-activity relationships of neuropeptide Y analogues with respect to Y<sub>1</sub> and Y<sub>2</sub> receptors. *Biopolymers (Peptide Science)* **37**, 123-142.
- [69] Jureus, A. und Bartfai, T. (1997) L-Ala-substituted rat galanin analogs distinguish between hypothalamic and jejunal galanin receptor subtypes. *J. Peptide Res.* **49**, 195-200.
- [70] Schrader, M., Jürgens, M., Hess, R., Schulz-Knappe, P., Raida, M. und Forssmann, W.G. (1997) Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry guided purification of human guanylin from blood ultrafiltrate. *J. Chromatogr. A* **776**, 139-145.
- [71] Schlägger, H. und von Jagow, G. (1987) Tricin-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-397.
- [72] Edman, P. (1950) Method for determination of the amino acid sequence in polypeptides. *Acta Chem. Scand.* **4**, 283-293.
- [73] Lottspeich, F. (1981) Identification of the phenylthiohydantoin derivatives of amino acids by high pressure liquid chromatography, using a ternary, isocratic solvent system. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **361**, 1829-1832.
- [74] Schulz, A., Marx, U.C., Hidaka, Y., Shimonishi, Y., Rösch, P., Forssmann, W.G. und Adermann, K. (1999) Role of the prosequence of guanylin. *Protein Sci.* **8**, 1850-1859.
- [75] Wüthrich, K. (1986) *NMR of proteins and nucleic acids*. John Wiley & Sons, New York.

- 
- [76] Singh, S., Singh, G., Heim, J.M. und Gerzer, R. (1991) Isolation and expression of guanylate cyclase-coupled heat-stable enterotoxin receptor cDNA from human colonic cell line T84. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 1455-1463.
- [77] Kaefer, V. und Resch, K. (1985) Are cyclic nucleotides involved in the initiation of mitogenic activation of human lymphocytes? *Biochem. Biophys. Acta* **846**, 216-225.
- [78] Wada, A., Hirayama, T., Kitaura, H., Fujisawa, J.I., Hasegawa, M., Hidaka, Y. und Shimonishi, Y. (1996) Identification of ligand recognition sites in heat-stable enterotoxin receptor, membrane-associated guanylyl cyclase C by site directed mutational analysis. *Infect. Immun.* **64**, 5144-5150.
- [79] Hasegawa, M., Kawano, Y., Matsumoto, K., Hidaka, Y., Sato, T. und Shimonishi, Y. (1997) Identification of a binding region on *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin to intestinal guanylyl cyclase C. *Lett. Pep. Sci.* **4**, 1-11.
- [80] Merrifield, R.B. (1963) Solid phase peptide synthesis I. Synthesis of a tetrapeptide *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149-2154.
- [81] Kamber, B., Hartmann, A., Eisler, K., Riniker, B., Rink, H., Sieber, P. und Rittel, W. (1980) The synthesis of cysteine peptides by iodine oxidation of S-Trityl-cysteine and S-Acedamidomethyl-cysteine peptides. *Helv. Chim. Acta* **63**, 899-915.
- [82] Yamaguchi, H., Nakazato, M., Miyazato, M., Kangawa, K., Matsuo, H. und Matsukura, S. (1995) Two novel rat guanylin molecules, guanylin-94 and guanylin-16, do not increase cyclic CMP production in T84 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **214**, 1204-1210.
- [83] Kowit, J.D. und Maloney, J. (1982) Protein cleavage by boiling in sodium dodecyl sulfate prior to electrophoresis. *Anal. Biochem.* **123**, 86-93.
- [84] Rittenhouse, J. und Marcus, F. (1984) Peptide mapping by polyacrylamide gel electrophoresis after cleavage at aspartyl-prolyl peptide bonds in sodium dodecyl sulfate-containing buffers. *Anal. Biochem.* **138**, 442-448.
- [85] Hamra, F.K., Fan, X., Krause, W.J., Freeman, R.H., Chin, D.T., Smith, C.E., Currie, M.G. und Forte, L.R. (1996) Prouroguanylin and proguanylin: Purification from colon, structure, and modulation of bioactivity by proteases. *Endocrinology* **137**, 257-265.
- [86] Forte, L.R. und Currie, M.G. (1995) Guanylin: a peptide regulator of epithelial transport. *FASEB J.* **9**, 643-650.
- [87] Greenfield, N. und Fasman, G.D. (1969) Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* **8**, 4108-4116.
- [88] Schmid, F.X. (1989) Optical spectroscopy to characterize protein conformation. In: Creighton, T.E. (Hrsg.) *Protein Structure: A practical approach*. Oxford, UK: IRL press, 251-285.
- [89] Rost, B. und Sander, C. (1994) Combining evolutionary information and neutral networks to predict protein secondary structure. *Proteins* **19**, 55-72.
- [90] Rost, B. und Sander, C. (1993) Prediction of protein secondary structure at better than 70 % accuracy. *J. Mol. Biol.* **232**, 584-599.

- 
- [91] Gibrat, J.F., Garnier, J. und Robson, B. (1987) Further developments of protein secondary structure prediction using information theory. New parameters and consideration of residue pairs. *J. Mol. Biol.* **198**, 425-443.
- [92] Levin, J.M. und Garnier, J. (1988) Improvements in secondary structure prediction method based on a search for local sequence homologies and its use as a model building tool. *Biochim. Biophys. Acta* **955**, 283-295.
- [93] Deleage, G. und Roux, B. (1987) An algorithm for protein secondary structure prediction based on class prediction. *Protein Eng.* **1**, 289-294.
- [94] Geourjon, C. und Deleage, G. (1995) SOPMA: Significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput. Appl. Biosci.* **11**, 681-684.
- [95] Sreerama, N. und Woody, R.W. (1993). A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem.* **209**, 32-44.
- [96] Wishard, D.S., Sykes, B.D. und Richards, F.M. (1991) Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shifts and protein secondary structure. *J. Mol. Biol.* **222**, 311-333.
- [97] Wuyts, A., Govaerts, C., Struyf, S., Lenaerts, J.P., Put, W., Conings, R., Proost, P. und van Damme J. (1999) Isolation of the CXC chemokines ENA-78, Groalpha and Grogamma from tumor cells and leucocytes reveals NH<sub>2</sub>-terminal heterogeneity. *Eur J. Biochem.* **260**, 421-429.
- [98] Kita, T., Smith, C.E., Duffin, K.L., Fok, K.F. und Currie, M.G. (1995) Characterization of bioactive guanylin released from rat small intestine. *FASEB J.* **9**, A 632.
- [99] Kumagaye, S.I., Kuroda, H., Nakajima, K., Watanabe, T.X., Kimura, T., Masaki, T. und Sakakibara, S. (1988) Synthesis and disulfide structure determination of porcine endothelin: an endothelium-derived vasoconstricting peptide. *Int. J. Pept. Protein Res.* **32**, 519-526.
- [100] Price-Carter, M., Gray, W.R. und Goldenberg, D.P. (1996) Folding of  $\omega$ -conotoxins. 1. Efficient disulfide-coupled folding of mature sequences in vitro. *Biochemistry* **35**, 15537-15546.
- [101] Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223-230.
- [102] Hidaka, Y., Ohno, M., Hemmasi, B., Hill, O., Forssmann, W.G. und Shimonishi, Y. (1998) In vitro disulfide-coupled folding of guanylyl cyclase-activating peptide and its precursor protein. *Biochemistry* **37**, 8498-8507.
- [103] Hidaka, Y., Ohno, M., Okumura, N., Forssmann, W.G. und Shimonishi, Y. (1999) Precious role of the propeptide in the folding of uroguanylin. In: Peptides 1998. Bajusz, S. und Hedecsz, F. (Hrsg.), Akadémiai Kiadó, Budapest, 358-359.
- [104] Shinde, U. und Inouye, M. (1993) Intramolecular chaperones and protein folding. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 442-446.
- [105] Dawson, P.E., Muir, T.W., Clark-Lewis, I. und Kent, S.B.H. (1994) Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* **266**, 776-779.
- [106] Pegoraro, S., Fiori, S., Rudolph-Böhner, S., Watanabe, T.X. und Moroder, L. (1998) Isomorphous replacement of cystine with selenocystine in endothelin: oxidative refolding, biological and conformational properties of [Sec<sup>3</sup>, Sec<sup>11</sup>, Nle<sup>7</sup>]-endothelin-1. *J. Mol. Biol.* **284**, 779-792.

- 
- [107] Maslennikov, I.V., Sobol, A.G., Gladky, K.V., Lugovskoy, A.A., Ostrovsky, A.G., Tsetlin, V.V., Ivanov, V.T. und Arseniev, A.S. (1998) Two distinct structures of  $\alpha$ -conotoxin GI in aqueous solution. *Eur. J. Biochem.* **254**, 238-247.
- [108] Favreau, P., Krimm, I., Le Gall, F., Bobenrieth, M.J., Lamthanh, H., Bouet, F., Servent, D., Molgo, J., Ménez, A., Letourneux, Y. und Lancelin, J.M. (1999) Biochemical characterization and nuclear magnetic resonance structure of novel  $\alpha$ -conotoxins isolated from the venom of *Conus consors*. *Biochemistry* **38**, 6317-6326.
- [109] Okamoto, K., Okamoto, K., Yuki take, J. und Miyama, A. (1988) Reduction of enterotoxic activity of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin by substitution for an asparagine residue. *Infect. Immun.* **56**, 2144-2148.
- [110] Shailubhai, K., Forte, L.R., Yu, H.H., Karunanandaa, K., Wang, J.Y., Eber, S.L., Wang, Y., Joo, N.S., Kim, H.D., Miedema, B.W., Abbas, S.Z., Boddupalli, S.S. und Currie, M.G. (1999) Oral administration of uroguanylin inhibits polyps formation in APC<sup>min/+</sup> mouse by a novel mechanism involving induction of apoptosis in epithelial cells of the intestine mucosa. *Clin. Cancer Res.* **5** (Suppl.), im Druck.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Axel Schulz  
Geburtsdatum: 14.04.1972  
Geburtsort: Celle  
Eltern: Dieter Schulz, Industriekaufmann  
Annegret Schulz (geb. Ahlvers)  
Bruder: Ingo Schulz  
Familienstand: ledig  
Anschrift: Schneiderberg 11  
30167 Hannover

### Ausbildung:

1977 - 1982 Grundschule Eschede  
1982 - 1984 Orientierungsstufe Eschede  
1984 - 1991 Hölty-Gymnasium Celle  
Mai 1991 Abschluß: Abitur  
Juli 1991 - Zivildienst beim Malteser Hilfsdienst Celle  
Oktober 1992  
Oktober 1992 Beginn des Hochschulstudiums an der Universität Hannover im Studiengang Chemie (Diplom)  
September 1994 Diplomvorprüfungen im Studiengang Chemie  
Oktober 1995 - Auslandsaufenthalt am Imperial College of Science,  
April 1996 Technology and Medicine, London, England  
Januar 1997 Diplomhauptprüfungen im Studiengang Chemie  
Januar 1997 - Diplomarbeit am Niedersächsischen Institut für Peptid-Forschung  
August 1997 Abschluß: Diplom-Chemiker  
November 1997 Beginn der Promotion am Niedersächsischen Institut für Peptid-Forschung  
November 1997 - Stipendiat im Graduiertenkolleg "Charakterisierung von regulatorischen  
Oktober 1998 Peptiden und ihrer Zielproteine"  
seit Oktober 1998 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in einem vom BMBF geförderten Forschungsvorhaben  
seit 1999 Mitglied der "American Peptide Society" und der "Protein Society"



# Publikationsliste

## Originalveröffentlichungen

**Schulz A**, Escher S, Marx UC, Meyer M, Rösch P, Forssmann WG & Adermann K (1998) Carboxy-terminal extension stabilizes the topological stereoisomers of guanylin. *Journal of Peptide Research* 52: 518-526

**Schulz A**, Marx UC, Hidaka Y, Shimonishi Y, Forssmann WG, Rösch P & Adermann K. (1999) Role of the Prosequence of Guanylin. *Protein Science* 8: 1850-1859

## Buchbeiträge

**Schulz A**, Marx UC, Rösch P, Forssmann WG & Adermann K (1999) Isolation, purification and characterization of human proguanylin: Comparison of the native and recombinant protein. In: *Peptides 1998*. Sándor Bajusz and Ferenc Hedecsz (Eds.), Akadémiai Kiadó, Budapest (1999), 326-327

Escher S, **Schulz A**, Marx UC, Rösch P, Forssmann WG & Adermann K (1999) Structure-activity relationship and design of stabilized guanylin stereoisomers. In: *Peptides 1998*. Sándor Bajusz and Ferenc Hedecsz (Eds.), Akadémiai Kiadó, Budapest (1999), 416-417

Hidaka Y, Ohno M, Shimono C, Okamura M, **Schulz A**, Adermann K, Forssmann WG & Shimonishi Y (1999) The mechanism of the propeptide-mediated folding of guanylyl cyclase activating peptides. In: *Peptides 1999: Proceedings of the 16<sup>th</sup> American Peptide Symposium, Minneapolis, (im Druck)*

Marx UC, Adermann K, **Schulz A**, Meyer M, Forssmann WG & Rösch P. Structures of human peptide hormones in solution. In: *NATO ASI Series: Dynamics, Structure and Function of Biological Macromolecules*. Jardetzky O (Ed.), (im Druck)

## Kongressbeiträge

**Schulz A**, Marx UC, Rösch P, Forssmann WG & Adermann K (1998) Isolation, purification and characterization of human proguanylin: Comparison of the native and recombinant protein. 25<sup>th</sup> European Peptide Symposium, Budapest, 30.08.-04.09.1998

Escher S, **Schulz A**, Marx UC, Rösch P, Forssmann WG & Adermann K (1998) Structure-activity relationship and design of stabilized guanylin stereoisomers. 25<sup>th</sup> European Peptide Symposium, Budapest, 30.08.-04.09.1998

Adermann K, Escher S, Klodt J, Marx UC, **Schulz A** (1999) Connecting diarrhoea and stereochemistry: Structure-function analysis of the guanylyl cyclase-activating peptide hormones guanylin and uroguanylin. 2<sup>nd</sup> Lower-Saxony-Israel Symposium on the Life Sciences, Jerusalem, 20.02-26.02.1999

Hidaka Y, Ohno M, Shimono C, Okamura M, **Schulz A**, Adermann K, Forssmann WG & Shimonishi Y (1999) The mechanism of the propeptide-mediated folding of guanylyl cyclase activating peptides. 16<sup>th</sup> American Peptide Symposium, Minneapolis, 26.06-01.07.1999

**Schulz A**, Marx UC, Hidaka Y, Shimonishi Y, Rösch P, Forssmann WG, and Adermann K (1999) Functional Role of the prosequence of guanylin. Third European Symposium of the Protein Society, Garmisch-Partenkirchen, 19.-22.09.1999

Marx UC, **Schulz A**, Escher S, Klodt J, Forssmann WG, Rösch P & Adermann K (1999) Structure, stability and interconversion of human guanylin and uroguanylin isomers. Third European Symposium of the Protein Society, Garmisch-Partenkirchen, 19.-22.09.1999