

STD – NMR – Spektroskopie

zur Untersuchung der Bindungsspezifität

des integralen Membranproteins Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$

auf Liposomen und auf intakten Thrombozyten

Dissertation

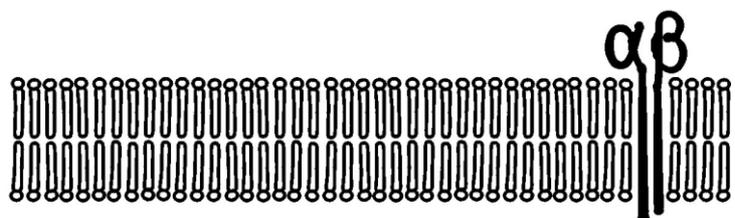
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

von

Robert Meinecke

aus Hamburg

August 2003



- 1. Gutachter: Prof. Dr. B. Meyer**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. H. Paulsen**

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 15. September 2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1999 bis August 2003 am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg angefertigt.

Herrn Prof. Dr. B. Meyer danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, für die wertvolle und freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit und die sehr anregende Zeit in seiner Gruppe.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	11
1.1. Biologische Membranen und Membranproteine.....	11
1.2. Siebentransmembranproteine	14
1.3. Aufklärung der 3D-Struktur bei Membranproteinen	15
1.4. Funktion und Spezifität von Membranrezeptoren	17
1.5. Integrine.....	20
1.6. Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$	29
1.7. Thrombozyten und Blutgerinnung.....	30
1.8. Antikoagulantien.....	32
1.9. Tumorwachstum und Neoangiogenese.....	34
1.10. Liposomen und Rekonstitution von Membranproteinen	35
1.11. NMR-Screeningmethoden	38
1.12. Sättigungstransferdifferenz-NMR-Spektroskopie	39
2. Problemstellung	48
3. Ergebnisse und Diskussion	49
3.1. Liposomenpräparation.....	49
3.1.1. Der Anteil an DMPG im Lipidgemisch.....	49
3.1.2. Rekonstitution des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ in Liposomen.....	50
3.2. NMR-Experimente mit Liposomen.....	50
3.2.1. NMR-Hüllkurve der Liposomen.....	51
3.2.2. Cyclo(RGDfV)-Bindung und Titration mit cyclo(RGDfV)	55
3.2.3. Inhibitionsexperimente mit cyclo(RGDfV), RGD und RGDS	64
3.2.4. Bindungsepitop des Peptids cyclo(RGDfV).....	68

3.2.5.	Titration mit cyclo(RGDfV), PS-Hyp-GDW und cyclo-S-Ac-yRGDC.....	73
3.3.	NMR-Experimente mit humanen Thrombozyten	80
3.3.1.	Die Stabilität linearer und cyclischer Peptide	80
3.3.2.	Sättigungsaufbau für thrombozytenspezifische NMR-Signale	81
3.3.3.	Aufbau des NMR-Sättigungstransfers für cyclo(GRGDSPA)	85
3.3.4.	NMR-Experimente mit Thrombozyten in TBS-Puffer	89
3.3.5.	NMR-Experimente mit Thrombozyten in CPD-Plasma	93
4.	Zusammenfassung	98
5.	Summary	101
6.	Experimenteller Teil	104
6.1.	Vorbereitung der NMR-Lösungen und NMR-Proben	104
6.2.	Umpufferung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$	105
6.3.	Liposomenpräparation.....	106
6.4.	Umpufferung der humanen Thrombozyten in TBS-Puffer.....	107
6.5.	NMR-Proben mit humanen Thrombozyten in CPD-Plasma	108
6.6.	NMR-Messungen mit Liposomen, Thrombozyten und Peptiden.....	109
6.7.	Sicherheitshinweise.....	111
7.	Literatur	112
8.	Anhang	126
8.1.	Pulsprogramme	126

Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
1D, 2D, 3D	Ein-, zwei-, dreidimensional
7TM	7-Transmembransegmentrezeptor
AEBSF-HCl	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid-Hydrochlorid
AS	Aminosäure
BIA	Biomolekulare Interaktionsanalyse
CD	<i>cluster of differentiation</i>
clogP	<i>calculated n-octanol/water partition coefficient</i>
CPD	Citrat, Phosphat, Dextrose
CPG	<i>controlled-pore glass</i>
CSA	<i>chemical shift anisotropy</i>
cyclo(RGDfV)	Cyclo(1,5)-arginyl-glycinyl-aspartyl-D-phenylalanyl-valin
DAPC	Diacylphosphatidylcholin
DAPE	Diacylphosphatidylethanolamin
DAPG	Diacylphosphatidylglycerin
DHPC	1,2-dicaproyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DMPG	Dimyristoylphosphatidylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOPC	Diiolelylphosphatidylcholin, 1,2-diiolelyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPC	Dodecylphosphocholin
DPFGSE	<i>double pulsed field gradient spin echo</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EDTA-Na ₂	Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EM	Extrazelluläre Matrix
ES	<i>excitation sculpting</i>
FID	<i>free induction decay</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
GPIIb/IIIa	Thrombozyten Glycoprotein IIb/IIIa, Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

HF	Hochfrequenz
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRMAS	<i>high resolution magic angle spinning</i>
HTS	<i>high throughput screening</i> , Hochdurchsatzscreening
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration, die zu 50 % verminderter Aktivität führt
K _D	Dissoziationskonstante
K _A	Assoziationskonstante
K _I	Inhibitionskonstante
k _{off}	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante
k _{on}	Assoziationsgeschwindigkeitskonstante
k _{sat}	Sättigungsgeschwindigkeitskonstante
LUV	<i>large unilamellar vesicles</i>
MAS	<i>magic angle spinning</i>
MD	<i>molecular dynamics</i>
MeDOPE	Dioleylphosphatidyl-(N-methyl)-ethanolamin
MLV	Multilamellare Vesikel
MW	Molekulargewicht
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerin
PEG	Polyethylenglycol
PES	Polyethersulfon
ppm	<i>parts per million</i>
PTFE	Polytetrafluorethylen
RT	Raumtemperatur
RCA ₁₂₀	<i>Ricinus communis agglutinin</i> , 120 kDa
SAR	<i>structure activity relationship</i> (Struktur-Wirkungs-Beziehung)
SCCS	<i>surface-connected canalicular system</i> (offenes kanalikuläres System)
SDS	<i>sodium dodecylsulphate</i>
STD	<i>saturation transfer difference</i> (Sättigungstransferdifferenz)
SPR	<i>surface plasmon resonance</i> (Oberflächenplasmonenresonanz)
SUV	<i>small unilamellar vesicles</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
<i>t</i> BuOH	<i>tert</i> -Butanol, 1,1-Dimethylethanol

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TIRFM	<i>total internal reflection fluorescence microscopy</i>
T ₁ , T ₂	Longitudinale-, transversale Relaxationszeit
T _{1ρ}	Spin-Gitter-Relaxationszeit im rotierenden Koordinatensystem
T _c	Phasenübergangstemperatur Sol-Flüssigkristallin
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
TPL-NH ₂	H-Thr-Pro-Leu-NH ₂ , Threonyl-prolinyl-leucincarboxamid
TPPI	<i>time proportional phase incrementation</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-d ₁₁	Perdeutero-tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
trNOE	<i>transferred nuclear Overhauser effect</i>
TROSY	<i>transverse relaxation optimized spectroscopy</i>
vWF	von Willebrand Faktor
WATERGATE	<i>watersuppression by gradient tailored excitation</i>
Water-LOGSY	<i>water-ligand observation with gradient spectroscopy</i>
WGA	<i>Wheat germ agglutinin</i> , Weizenkeimagglutinin
γ	Gyromagnetisches Verhältnis
ρ	Direkte dipolare Relaxationsrate
τ _b	Aufenthaltsdauer im gebundenen Zustand
τ _c	Korrelationszeit
σ	Kreuzrelaxationsrate

Unnatürliche Aminosäuren und Aminosäurederivate

Abkürzung	Aminosäure
Chg	L-Cyclohexylglycin
f	D-Phenylalanin
Har	L-Homoarginin, N ⁶ -(Aminoiminomethyl)-L-Lysin
Hyp	4-Hydroxy-L-prolin
mamb	m-(Methylamino)benzoesäure, 3-(Methylamino)-benzoesäure
Mpr	3-Mercaptopropionsäure, Desamino-L-cystein
Mty	O-Methyl-L-tyrosin, 4-Methoxy-L-phenylalanin
Nal	3-(2-Naphtyl)-L-alanin
N(Me)V	N-Methyl-L-valin
Nle	L-Norleucin
Nva	L-Norvalin
Tle	L- <i>tert</i> -Leucin

Natürliche Aminosäuren

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

1. Einleitung

1.1. Biologische Membranen und Membranproteine

Biomembranen begrenzen die Zelle nach außen. Sie dienen dem Zweck, den Stofftransport zu beschränken und zu spezialisieren.¹ Zellen eukaryotischer Organismen enthalten außerdem intrazelluläre Membranen wie z.B. das endoplasmatische Retikulum (ER) und verschiedene, membranumschlossene Organellen wie Zellkern, Mitochondrien und Vesikel. Diese Organellen teilen das Zellinnere in verschiedene Kompartimente auf. Der laterale Diffusionskoeffizient der Membranlipide ist mit ca. 10^{-8} cm²/s relativ hoch; die Biomembran wird deshalb auch als zweidimensionale Flüssigkeit beschrieben. Biomembranen besitzen die Tendenz zur Selbstorganisation und können Strukturdefekte oft spontan reparieren.

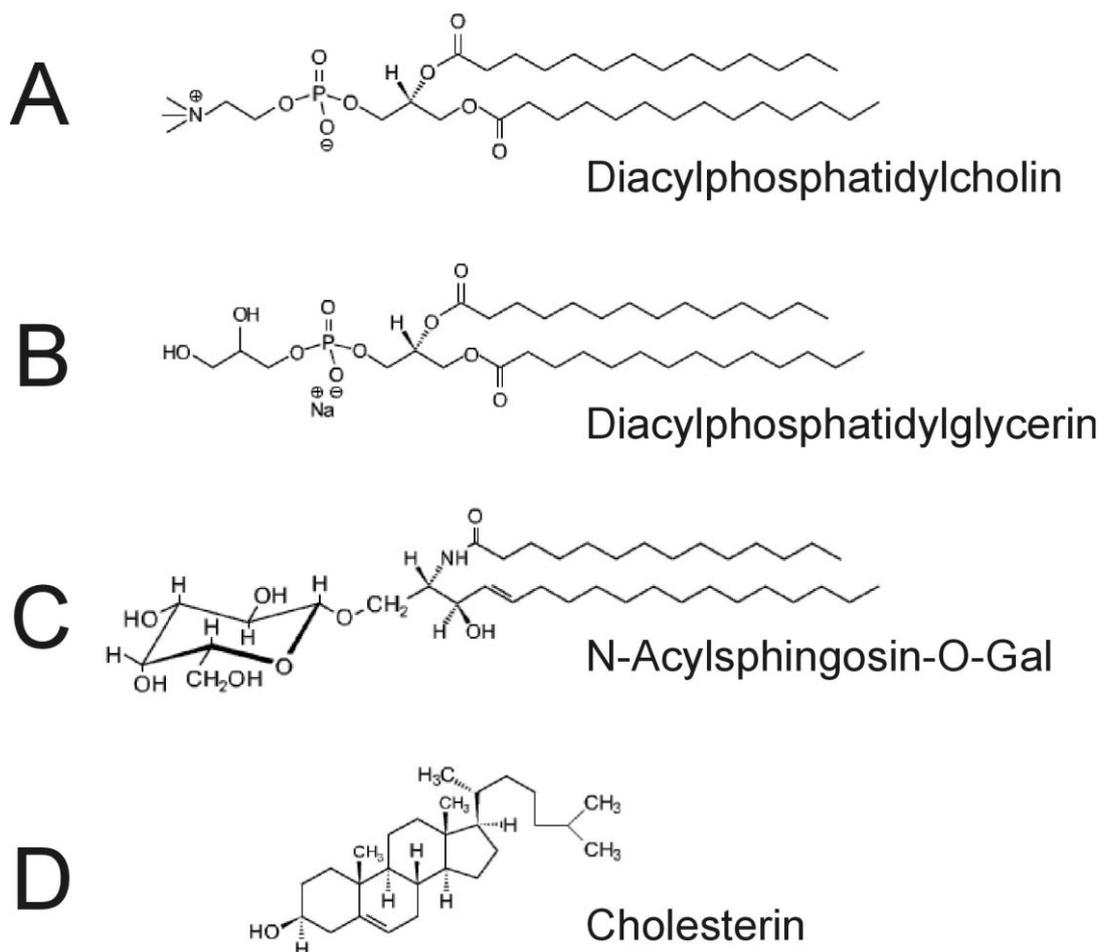


Abbildung 1 Amphiphile Moleküle in biologischen Membranen.

Die Zusammensetzung biologischer Membranen ist strukturbestimmend für das jeweilige Membransystem und charakteristisch für die Art des Organismus, sowie für den jeweiligen Zelltyp. Membranen bestehen überwiegend aus Phospholipiden (Phosphoglyceriden), also amphiphilen Lipidmolekülen. Die Alkoholkomponente der Phospholipide kann durch Cholin (Abbildung 1A), terminal verknüpftes Glycerin (Abbildung 1B), Ethanolamin, Serin oder myo-Inositol gebildet sein. Phosphatidylinositol, verknüpft mit einem Oligosaccharid, tritt oft als Anker für Membranproteine auf (Glycosylphosphatidylinositolanker, GPI). Der lipophile Teil eines Sphingoglycolipides (Abbildung 1C) besteht aus dem langkettigen Aminoalkohol Sphingosin und einem aminoverknüpften Acylrest. Dieses Grundgerüst aller Sphingolipide wird als Ceramid bezeichnet. Bei Cerebrosiden wird die Glycokomponente durch ein Monosaccharid gebildet; Ganglioside weisen bis zu acht linear oder verzweigt verknüpfte Zuckerreste auf. Sie tragen mindestens ein Molekül Sialinsäure und stellen charakteristische Merkmale für Zellerkennungsprozesse dar. Bei den Sphingophospholipiden ist die Hydroxygruppe eines Ceramides über eine Phosphodiesterbrücke mit einer weiteren polaren Alkoholkomponente verbunden, wie sie auch in den Phospholipiden (Abbildung 1A und B) zu finden ist. Diese Sphingomyeline bilden den Hauptbestandteil der isolierenden Nervenscheiden. Neben den typischen Membranlipiden ist Cholesterin (Abbildung 1D) in den Zellmembranen aller eukaryotischen Zellen enthalten. Das Sterangerüst lagert sich parallel zu den Alkylresten in die Doppelschicht. Cholesterin reguliert die Fluidität und die Flexibilität der Lipiddoppelschicht indem es sowohl die kristalline Packung der Lipide bei niedrigen Temperaturen als auch eine zu große Beweglichkeit der Alkylketten bei höheren Temperaturen verhindert. Eine weitere Klasse der Glycolipide, die Cholesteringlycoside nutzen Cholesterin als Membrananker.

Eine Lipidmembran stellt für Ionen wie Na^+ , K^+ , Cl^- , Phosphat oder Cholin ein fast unüberwindliches Hindernis dar. Ihre Durchlässigkeit für polare Moleküle wie Wasser, Harnstoff, Glucose oder Glycerin ist gering. Neutrale Moleküle mit unpolaren Resten hingegen durchdringen die Lipiddoppelschicht besser.

Die selektive Permeabilität von Biomembranen beruht auf membrangebundenen Kanal- und Transportproteinen (Pumpen). Wasser kann über ein geöffnetes Kanalprotein (Aquaporin) die Biomembran praktisch ungehindert durchdringen. Weitere wichtige Funktionen werden von membranständigen Enzymen und Rezeptoren übernommen. Diese führen chemische Reaktionen aus, bzw. dienen der molekularen Erkennung. Signalkaskaden im Zellinneren ermöglichen einen bidirektionalen Informationsaustausch. Der Proteinanteil in biologischen Membranen beträgt typischerweise 50 % der Membranmasse. Je nach Membrantyp beträgt der Wert zwischen 20 und 80 %.

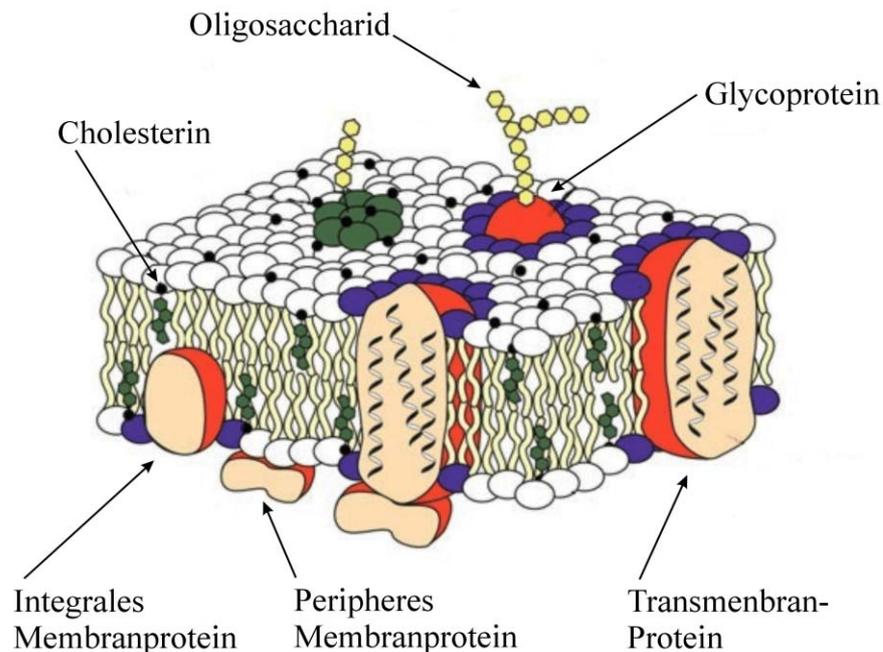


Abbildung 2 Schematische Darstellung verschiedener Membranproteine.

Bei den integralen Membranproteinen tauchen hydrophobe Domänen in die Membran ein und sorgen für eine feste Verankerung des Proteins (siehe Abbildung 2). Transmembranproteine besitzen mindestens ein membrandurchspannendes Segment. Periphere Membranproteine können über das flexible Oligoglycan eines GPI-Ankers mit der Membran verbunden sein und einen größeren Abstand zur Membranoberfläche einnehmen. Diese und andere Ankergruppen werden posttranslational angefügt. Einige periphere Membranproteine sind lediglich durch elektrostatische Anziehung und Wasserstoffbrückenbindungen mit der Membran oder einem integralen Membranprotein assoziiert, ohne in die Lipiddoppelschicht einzudringen. Teilweise dienen aber kovalent gebundene Lipide als zusätzlicher Membrananker.

Die Lipidmembran wirkt als zweidimensionales Lösungsmittel für Membranproteine (*fluid mosaic*).² Die laterale Diffusionsgeschwindigkeit von Proteinen, die in der Lipiddoppelschicht eingebettet sind, beträgt etwa ein Zehntel der Beweglichkeit der Phospholipidmoleküle. Ausnahmen bilden Membranproteine, deren zytoplasmatische Domäne am Zytoskelett fixiert ist, oder die in einem Verbund (*raft*) mit anderen Membranproteinen organisiert sind. Die spontane Rotation eines Proteinmoleküls von einer Membranseite zur anderen (transversale Diffusion oder *flip-flop*) ist extrem selten. Seine Orientierung in der Membran ist also definiert (vektorielle Anordnung), und die Membranasymmetrie bleibt über längere Zeit erhalten. Deshalb kann durch aktiven Stofftransport ein transmembranaler Konzentrationsgradient, z. B. ein pH-Gradient oder ein

elektrisches Membranpotential, aufgebaut werden. Die Glycankomponente in Glycoproteinen und Glycolipiden ist hoch solvatisiert und voluminös. Sie verringert deshalb die *flip-flop*-Wahrscheinlichkeit der Membranbestandteile, stabilisiert die Asymmetrie und spielt bei der interzellulären Erkennung eine wichtige Rolle.

1.2. Siebentransmembranproteine

Eine der größten Superfamilien von Membranrezeptoren sind die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs). Ihr gemeinsames Strukturmerkmal sind sieben membrandurchspannende α -Helices. Sie werden daher auch als 7-Transmembransegmentrezeptoren (7TMS) oder 7-Transmembranrezeptoren (7TM) bezeichnet und besitzen 230 bis 400 Aminosäuren. Das an der zytoplasmatischen Seite des Rezeptors assoziierte, heterotrimere G-Protein leitet die Information über weitere Botenstoffe weiter, die als *second messengers* bezeichnet werden. Die Wahrnehmung exogener Reize wie Licht, Pheromone, Geschmacks- und Geruchsstoffe wird durch die chemosensorischen GPCRs oder csGPCRs vermittelt, einer Hauptklasse von Rezeptoren. Die chemische Vielfalt der endogenen Liganden ist ebenfalls sehr groß und schließt neben Peptiden und Proteinen auch die Substanzklassen Nucleotide, Lipide, Neurotransmitter und Ionen ein. In diesem Zusammenhang wird auch von endoGPCRs gesprochen, unter denen sich viele pharmakologisch bedeutende *targets* finden. In Genomanalysen können durch Sequenzvergleiche 6 Familien von GPCRs unterschieden werden, die untereinander keine Sequenzhomologien aufweisen.³ Teilweise wird auch die Unterteilung in die Klassen A, B, C, D und S/F vorgenommen.⁴ Bisher sind nur etwas mehr als 100 humane GPCRs genauer untersucht worden, aber durch Strukturvergleiche innerhalb des humanen Genoms sind allein 350 GPCRs mit Peptidspezifität identifiziert worden.⁵ Bei dieser Clusteranalyse des Humangenoms wurde das 7TMS Motiv über 1300 mal aufgefunden. Dies deutet auf einen Anteil der GPCR-Gene von über 1 % im gesamten Humangenom hin. Andere Schätzungen belaufen sich auf bis zu 5 %. Für etwa 200 genomisch eindeutig identifizierte humane GPCRs sind bisher keine Liganden bekannt (*orphan GPCRs*).

Das aus Archebakterien isolierte Bacteriorhodopsin ist das erste 7-Transmembranhelixprotein (7TM), bei dem die 3D-Struktur durch hochauflösende Elektronenmikroskopie bestimmt werden konnte.⁶ Für diese Methode muss das Protein als kristallines 2D-Array in der Membran vorliegen also eine regelmäßige Packung in der Membran bilden.

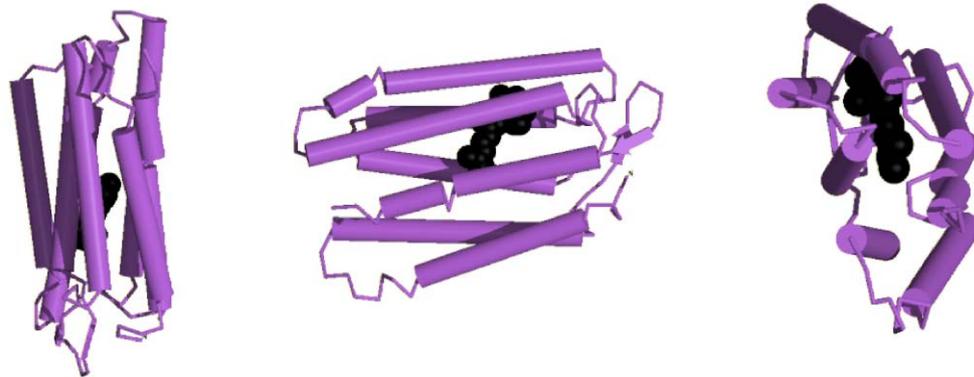


Abbildung 3 Die dreidimensionale Struktur des Bacteriorhodopsins wurde zuerst von Richard Henderson *et al.* durch Einkristallelektronenbeugung und hochauflösende Elektronenmikroskopie bestimmt.⁷ Es sind drei orthogonale Ansichten gezeigt. Eingeschlossen im Helixbündel ist das Retinalmolekül zu erkennen.

Allerdings ist Bacteriorhodopsin kein GPCR, da es kein G-Protein aktiviert. Es wirkt als Protonenpumpe und dient der Photosynthese. Wie das humane Opsin, ein GPCR der Sehsinneszellen, enthält es Retinal als prosthetische Gruppe. Zu manchen GPCRs, besonders zu einigen anderen Opsinen, besitzt Bacteriorhodopsin eine hohe Sequenzhomologie. Strukturanalysen einiger GPCR höherer Lebewesen zeigten eine ähnliche Topologie des Helixbündels wie im Bacteriorhodopsin. Es diente daher einige Jahre als Modell für GPCRs und als Templat zur Strukturvorhersage von 7TM Proteinen (*homology modelling*). Mittlerweile existieren für das GPCR Rhodopsin aus dem Rind auch Röntgenstrukturanalysen, denen Kristalle von Komplexen des Proteins mit Lipiden zugrunde lagen.⁸ Ebenfalls für die RSA geeignet sind Proteinkomplexe mit einem Detergenz wie n-Octyltetraoxyethylen (Hydroxyethyloxy-tri(ethyloxy)octan). Das Rinderrhodopsin gehört zur Klasse A der GPCRs, die auch die Rezeptoren für Bradikinin, Angiotensin II, Somatostatin, Opioide, Chemokine und Interleukine beinhaltet. Das Rinderrhodopsin ist deshalb als Homologiemodell sehr vielseitig. Die Untersuchungen zur Primärsequenz und der räumlichen Struktur der GPCRs liefern viele Impulse für das Verständnis ihrer Funktion aber auch für die Therapie von Krankheiten.

1.3. Aufklärung der 3D-Struktur bei Membranproteinen

Außer der hochauflösenden Elektronenmikroskopie und der Röntgenstrukturanalyse von Membranproteinen in Detergenz- oder Lipidkomplexen können auch NMR-Methoden zur Strukturaufklärung angewendet werden. Gut aufgelöste NMR-Spektren können jedoch nur von Molekülen erhalten werden, denen eine rasche Rotation und Umorientierung möglich ist. Membrankomponenten wie Lipide oder Proteine können keine schnellen, isotropen Taumel-

bewegungen ausführen, und die richtungsabhängigen Wechselwirkungen wie dipolare Kopplungen sowie chemische Verschiebung werden nicht gemittelt.

Eine Möglichkeit zur Verbesserung der Signalform ist die Präparation von makroskopisch orientierten Proben in denen die Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen einheitlich ausgerichtet sind. Diese Technik ist besonders effektiv bei seltenen Nukliden wie ^{31}P und ^{13}C mit geringem gyromagnetischen Verhältnis γ , bei denen Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (DD) einen geringeren Einfluss auf die Linienverbreiterung besitzen als die Anisotropie der chemischen Verschiebung (*chemical shift anisotropy*, CSA). Festkörper-NMR-Messungen an Peptiden und Proteinen in lamellaren Lipidphasen dienen der Bestimmung einer hochaufgelösten Struktur von Gramicidin A und der Rückgratstruktur einzelner transmembranaler Helices zweier Neurotransmitterrezeptoren.^{9, 10} In geordneten Proben können richtungsabhängige Parameter gemessen und zur Ermittlung der relativen Orientierung einzelner Transmembrandomänen oder auch von Ligandmolekülen bezüglich des Restes des Proteins oder zur Membranebene genutzt werden. Durch Einführung von mindestens zwei Fluoratomen in synthetische Membranpeptide an verschiedenen Positionen der Sequenz, kann in ^{19}F -NMR-Experimenten die Orientierung oder den Abstand der markierten Aminosäuren bestimmt werden.¹¹

Neben der Vermessung statisch orientierter Proben ist *magic angle spinning* (MAS) eine weitere Strategie zur Verringerung der Linienbreite und zur Verbesserung der Auflösung.^{12, 13} Schnelle Rotation der Probe im magischen Winkel von 54.74° zum Magnetfeld führt zu einer Ausmittelung der winkelabhängigen Terme im Tensor für die dipolare Kopplung. Außerdem wird eine Verschlechterung der Linienform durch CSA und durch Inhomogenitäten der magnetischen Suszeptibilität zum großen Teil weggemittelt. An mikrokristallinen, flüssigkristallinen oder auch amorphen Peptidproben können auf diese Weise sehr gut aufgelöste Festkörperspektren erhalten werden. Bei verschiedenen membrandurchspannenden Peptiden von 40 bis 60 Aminosäuren Länge konnten die Resonanzen überwiegend zugeordnet und über Winkel- und Abstandseinschränkungen (*constraints*) die 3D-Strukturen bestimmt werden.¹⁴⁻¹⁶ Die Peptide sind hierzu ^{15}N - und ^{13}C -markiert worden. Die MAS-Technik kann auch auf orientierte Proben angewendet werden, um beide Methoden miteinander zu kombinieren (*magic angle oriented sample spinning*, MAOSS).¹⁷ Bei den Arbeiten von Watts *et al.* standen Studien an Seitenketten von Membranproteinen, prosthetischen Gruppen und Liganden, sowie deren dynamischen Eigenschaften im Vordergrund.^{18, 19} Teilweise wurden in diesen Arbeiten spezifisch markierte Liganden benutzt, um strukturelle, dynamische und elektronische Details des gebundenen Liganden oder der Bindungstasche zu untersuchen.

Speziell die Effizienz der ^1H homonuklearen dipolaren Kopplungen kann in Kreuzpolarisationstransfer-NMR-Experimenten (*polarization inversion spin exchange at magic angle*, PISEMA) unter Anwendung von FSLG-Impulssequenzen (*frequency-switching*

Lee-Goldberg) unterdrückt werden.²⁰ Die Linienbreite kleiner Membranproteine in orientierten, multilamellaren Lipiddoppelschichten konnte dadurch weiter verringert werden.

Kleine Membranproteine mit einer Molmasse von etwa 20 kDa können auch mit einem Detergenz wie Dodecylphosphocholin (DPC), n-Octyl- β -D-glucopyranosid (OG) oder Dodecyl- β -D-maltopyranosid (DM) solubilisiert und in Form gemischter Mizellen unter Lösungs-NMR-Bedingungen strukturell und funktionell untersucht werden.²¹⁻²³

Die Anwendung des TROSY-Verfahrens (*transverse relaxation optimized spectroscopy*) auf Tripelresonanzexperimente wie 3D-HSQC-TOCSY bei der Strukturbestimmung erlaubt die sequenzielle Zuordnung $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -markierter Proteine mit einem Molgewicht von über 100 kDa.²⁴⁻²⁶ Das TROSY-Prinzip beruht auf der Selektion bestimmter Übergänge im I-S-Spinsystem, wobei die transversale Relaxationsgeschwindigkeit besonders für die Signale der ^{15}N - $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Einheiten verringert wird. In TROSY-Spektren liefern Makromoleküle mit einer kurzen Korrelationszeit τ_{C} und trotz der intensiven dipolaren Wechselwirkungen schmale Signale. Die Konformation des Proteins OmpA aus der äußeren Membran von *E. coli* konnte mit dieser Technik bestimmt werden, nachdem es in DHPC-Mizellen rekonstituiert worden war.²⁷

Dipolare Kopplungen über eine Bindung (^1D), besonders im Rückgrat vollständig ^{15}N und ^{13}C -markierter Proteine, liefern sehr wertvolle strukturelle Informationen für die Erstellung des 3D-Modells. Zur Ermittlung der Orientierung von ^1H - ^{15}N -, ^1H - ^{13}C -, ^{13}C - ^{13}C - oder ^{13}C - ^{15}N -Bindungsvektoren aus den jeweiligen dipolaren Kopplungen ^1D werden sehr oft schwach geordnete Proteinproben präpariert. Bei Membranproteinen in Lipidbizellen oder mit einer großen Anisotropie der magnetischen Suszeptibilität tritt diese Orientierung spontan im Magnetfeld auf. Außerdem kann eine Vorzugsorientierung durch Dispersionen stäbchenförmiger Partikel wie Phagen oder kristalline Zellulose aber auch durch komprimiertes Polyacrylamidgel induziert werden.^{28, 29}

1.4. Funktion und Spezifität von Membranrezeptoren

Ebenso wie ihre Struktur ist die Funktion von Membranproteinen sehr viel schwieriger zu untersuchen als es bei löslichen Proteinen der Fall ist. Die unkalkulierbaren Aggregations-eigenschaften von Membranproteinen rufen Probleme bei ihrer Gewinnung, Handhabung bei der Rekonstitution und im Affinitätsassay hervor. Vergleichsweise wenig Informationen sind über Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen verfügbar, die an der Membranoberfläche geschehen, obwohl viele Membranrezeptoren medizinische Bedeutung besitzen. Je nach den zugrundegelegten Daten wirken 30 – 50 % aller pharmazeutischen Wirkstoffe auf GPCRs.^{4, 30} Chemokinrezeptoren sind beispielsweise für die Zell-Zell-Kommunikation und für die Immunantwort bei Entzündungen und Infektionen wichtig. Lymphozyten werden durch Vermittlung von Chemokinen in das betroffene Gewebe dirigiert (*recruiting*). Die beiden

Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 haben große Bedeutung bei der Untersuchung der HIV-Infektion erlangt. Der erste Schritt im Infektionsmechanismus ist die Virusanheftung an humane Lymphozyten. Dazu sind zwei Wechselwirkungen des Virushüllproteins GP41/GP120 nötig. Der primäre Kontakt wird zum Zellantigen CD4 hergestellt. Die Infektion der Zelle ist aber nur möglich, wenn auch der sekundäre Kontakt zu einem Korezeptor auf dem Lymphozyten erfolgt. Alle bisher isolierten HIV-Varianten benutzen die Korezeptoren CCR5 oder CXCR4. Um Inhibitoren zu entwickeln, die den Korezeptor CCR5 oder CXCR4 blockieren und die Infektion verhindern (HIV Entry-Inhibitoren), wurde 1998 eine Forschungs Kooperation zwischen Roche Discovery (UK) und Progenics Pharmaceuticals Inc. (NY, USA) gegründet. Ein wichtiges Ziel der Forschung ist es, die normale Funktion des Chemokinrezeptors nicht zu stören, sondern nur die Bindung an das GP120 zu inhibieren. Dieses Konzept wird erschwert durch die komplexe Wechselwirkung des Chemokins mit dem Rezeptor.

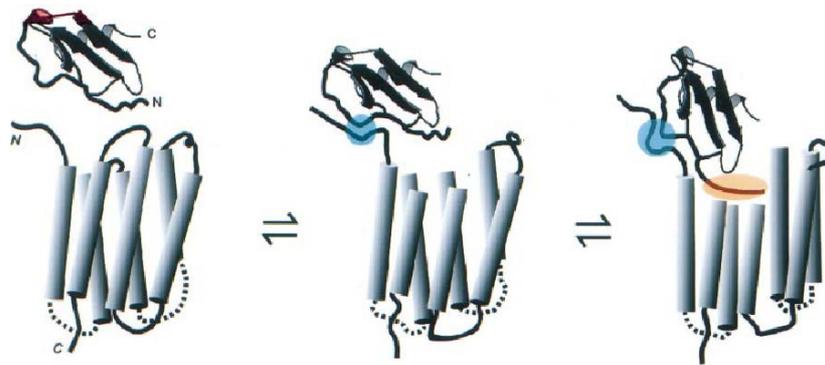


Abbildung 4 Modell für den Bindungsprozess des Chemokins SDF1 an den Rezeptor CXCR4. Crump *et al.* postulieren eine sekundäre Bindungstasche (orange hinterlegt) die erst nach einem primären Kontakt (hellblauer Kreis) und einer Umorientierung des Helixbündels freigelegt wird. Die Konformation des Chemokins wurde durch NMR-Spektroskopie bestimmt.³¹

Dabei heftet sich das Chemokinmolekül SDF1 in einem mehrstufigen Prozess an eine primäre Bindungsstelle an (*docking site*) und verlagert sich dann zur eigentlichen Rezeptorbindungsstasche (*triggering site*). Dies löst eine Umorientierung des Helixbündels und eine Weiterleitung des Signals zur zytoplasmatischen Seite des Rezeptors aus.

Inhibitionsexperimente an Membranproteinen *in vivo* oder an Zellkulturen zur Wirksamkeit von Liganden orientieren sich meist an einer beobachtbaren Funktion des Organismus oder des Stoffwechsels. Diese Funktionsassays sind oft durch andere zelluläre Prozesse überlagert und repräsentieren die tatsächliche Bindungsaffinität an den Rezeptor nicht richtig. Deswegen sind für Ligandscreening oder SAR-Studien (*structure activity relationship*) gut reproduzierbare Bindungsassays an isolierten und standardisierten Membranproteinen außerordentlich wichtig. Die Untersuchung der Ligandwechselwirkungen für ein Membran-

protein in Anwesenheit eines nicht-denaturierenden Detergenzes ist möglich, führt aber zu veränderten Bindungsaffinitäten und Bindungsspezifitäten. Manche Membranproteine sind in einer prozessierten Form ohne den Membrananteil verfügbar. Diese löslichen Proteine können allerdings in Affinitätsassays stark veränderte Ligandbindungseigenschaften aufweisen. Bei GPCRs ist diese Technik allerdings prinzipiell nicht möglich, da meist mehrere auf dem Helixbündel exponierte Schleifen gemeinsam eine sequenziell diskontinuierliche Bindungsdomäne bilden und von den Membransegmenten nicht ohne Verlust der Aktivität abtrennbar sind.

Die biophysikalischen Einflüsse der Membranumgebung auf Ligand und Rezeptor sind vielfältig. Parameter wie elektrische Feldstärke, Elektrolytzusammensetzung und die Gesamtionenstärke sind in unmittelbarer Membrannähe drastisch anders als im isotropen, extrazellulären Medium. Für Bindungsstudien werden Membranproteine deshalb bevorzugt in Lipiddoppelschichten eingebettet. Es kommen dafür Lipidvesikel, scheibenförmigen Bizellen oder planare Filme in Frage. Diese Modellmembranen können aus Mischungen natürlicher oder künstlicher Lipide aufgebaut sein. Bei einer hohen Expression des Rezeptors oder mit einem ausreichend sensitiven und selektiven Test können auch native Zellen oder entleerte Zellen, sogenannte *ghosts*, untersucht werden.

Das Prinzip der inneren Totalreflektion eines LASER-Strahls an der Grenzfläche zum Probenpuffer kann in der Mikroskopie (*total internal reflection fluorescence microscopy*, TIRFM) für die Detektion von Bindungsereignissen eingesetzt werden.^{32, 33} Im Volumen der Eindringtiefe der evaneszierende Welle werden fluoreszenzmarkierte Liganden sichtbar, und ihre Bindung an Proteine in planaren und vesikulären Lipiddoppelschichten sowie in der Membran intakter Zellen nachgewiesen. Durch Konkurrenz mit markierten Inhibitoren können auch Liganden ohne Fluoreszenzmarkierung untersucht werden. Bei der Oberflächenplasmonenresonanz (*surface plasmon resonance*, SPR) werden kleinste Änderungen des Brechungsindex registriert. Das aktive Probenvolumen ist wie bei der TIRF-Mikroskopie durch die Reichweite einer evaneszierenden Welle gegeben. Diese wird bei der Totalreflektion eines planar polarisierten Lichtstrahls hervorgerufen. Mit der SPR können die Ligandbindungseigenschaften von Membranproteinen in Liposomen charakterisiert werden. Dudley H. Williams *et al.* entwickelten eine Methode zur Immobilisierung von intakten Lipidvesikeln auf Sensorchips, die eine alkykettenmodifizierte Dextranmatrix tragen.³⁴ Die aus dem Darmepithel von Insekten isolierte Aminopeptidase N (APN) wurde über ihren GPI-Anker in Liposomen eingebettet und auf dem Chip fixiert. Die Affinität und Bindungskinetik von APN bezüglich des insektizid wirksamen, bakteriellen Endotoxins Cry1A(c) konnte mittels SPR bestimmt werden. Bei der Fixierung von Liposomen an hydrophob modifiziertem Dextran können diese, je nach Lipidzusammensetzung der Doppelschicht, geöffnet werden. Konformation und Bindungsaffinität von Membranproteinen werden dadurch nicht beeinträchtigt. Werden hingegen Sensorchips

eingesetzt, deren Goldfilm direkt durch Selbstorganisation mit einem hydrophoben Alkylthiol beschichtet worden sind, bilden sich planare Lipidmonoschichten beim Kontakt mit unilamellaren Vesikeln.³⁵ Das hydrophile Ende der Lipidmoleküle weist dabei zur Lösung. GPI-verankerte Proteine wie APN konnten in diesem System untersucht werden, aber die Integration von Transmembranproteinen mit voluminösen Domänen beiderseits der Lipiddoppelschicht ist nicht möglich. Durch zweistufige Modifikation der Goldoberfläche mit amphiphilen Molekülen kann eine Lipiddoppelschicht imitiert werden, in die Membranrezeptoren wie Integrine direkt eingebettet werden können.

Eine intakte Immobilisierung von biotinmodifizierten Liposomen für SPR-Studien von Membranproteinen ist ebenfalls an Sensorchips mit kovalent verknüpftem Streptavidin auf der Dextranmatrix möglich.³⁶

Enzym Immunoassays wie ELISA, der *scintillation proximity*-Assay (SPA)^{37, 38} sowie Radioassays wie RIA³⁹ (*radio immuno assay*) und RRA⁴⁰ (*radioreceptor assay*) nutzen das breit angewandte Prinzip der kompetitiven Bindung und lassen sich für die Studien an Membranrezeptoren adaptieren. Diese Tests erfordern aber immer mindestens einen Liganden, der mit einem Enzym oder einer Fluoreszenzmarkierung kovalent verknüpft ist, bzw. erfordern einen radioaktiv markierten Liganden oder Rezeptor.

Viele der in Kapitel 1.3 beschriebenen NMR-Methoden können neben den Daten zur 3D-Struktur des Membranrezeptors auch Informationen zu Konformation, Orientierung, Dynamik und damit auch zum Bindungs epitop des gebundenen Liganden liefern. Der generelle Vorteil der NMR-Techniken liegt in der geringeren Störung des Rezeptor-Ligand-Systems. So ist zum Beispiel eine chemische Markierung des Liganden meistens unnötig. Weitere NMR-Bindungsassays werden, mit besonderem Augenmerk auf die Eignung zum Screening, in Kapitel 1.11 beschrieben.

1.5. Integrine

Die Integrine bilden eine Familie heterodimerer Zelladhäsionsrezeptoren. Sie vermitteln Wechselwirkungen zu Nachbarzellen und zu extrazellulären Matrixproteinen (EM-Proteine). Es handelt sich um transmembranale Glycoproteine, die aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen.^{41, 42} Sowohl für die Dimerisierung der beiden Untereinheiten als auch für die Ligandbindungseigenschaft des Komplexes sind zweiwertige Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+} oder Mn^{2+}) essenziell.

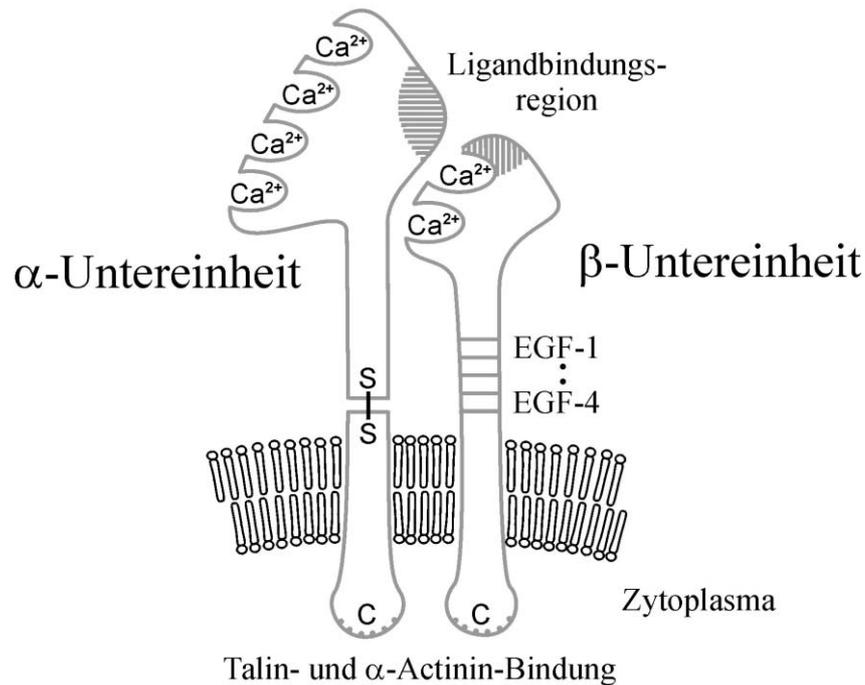


Abbildung 5 Schematische Darstellung des Integrinheterodimers. Die Ligandbindungsstelle liegt in der Kopfregion und wird durch beide Untereinheiten gebildet. Die gebundenen zweiwertigen Metallkationen sind für die Struktur und die Aktivität essenziell. Die C-terminalen zytosolischen Domänen beider Untereinheiten sind über Talin und α -Actinin mit den Actinfilamenten des Zytoskeletts verbunden.

Die größere α -Untereinheit enthält 1000 bis 1150 Aminosäuren und ist aus zwei unterschiedlich langen Proteinketten zusammengesetzt, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Die Kopfregion im extrazellulären Teil ist durch vier Ca^{2+} -Bindungsstellen von je 12 – 15 Aminosäuren Länge gekennzeichnet. Die β -Untereinheit besteht aus 730 bis 800 Aminosäuren und enthält zwei weitere Ca^{2+} -Bindungsmotive. Die Stammregion wird im Wesentlichen durch vier hochkonservierte, jeweils ca. 40 Aminosäuren lange, cysteinreiche Domänen im extrazellulären Teil gebildet. Diese werden als EGF-1 bis EGF-4 (*epidermal growth factor*) bezeichnet. Beide Untereinheiten haben eine kurze, membrandurchspannende Region (20 – 30 Aminosäuren) und am C-Terminus eine zytosolische Domäne (20 – 50 Aminosäuren).⁴³ Diese sind über die intrazellulären Proteine Talin, Vinculin und α -Actinin an die Aktinfilamente des Zytoskeletts assoziiert.

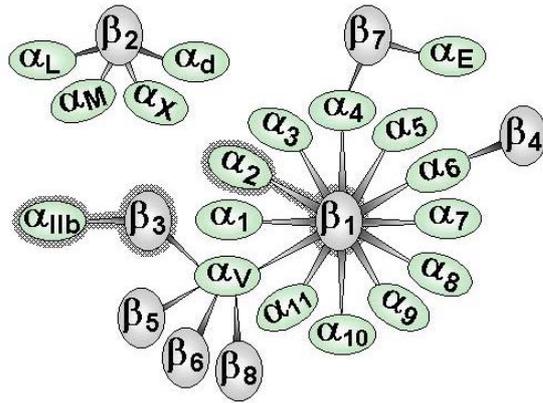


Abbildung 6 Bisher identifizierte α - und β -Untereinheiten der Integrine und deren bekannte Kombinationen.⁴⁴

Bisher sind beim Menschen 18 α -Untereinheiten und 8 β -Untereinheiten bekannt, die sich jeweils in ihrer Primärstruktur unterscheiden. Beide Untereinheiten sind an der Bildung der Ligandbindungstasche beteiligt und bestimmen Affinität und Spezifität der Wechselwirkung. Nicht alle möglichen Kombinationen treten auf; es wurden bisher etwa 24 Integrine beschrieben und untersucht. Sie werden, je nach der enthaltenen β -Untereinheit, in Subfamilien eingeteilt. Beispielsweise sind Integrine der β_1 -Subfamilie auf sehr vielen Zelltypen, besonders aber auf Leukozyten vorhanden. Die β_1 -Integrine spielen eine zentrale Rolle bei der Extravasation von Leukozyten in beschädigtes Gewebe, aber auch bei der Organisation und Regeneration von Muskel-, Nerven-, Endothel- und Epithelzellen. Dabei binden die β_1 -Integrine an die extrazellulären Matrixproteine (EM) Laminin und Kollagen. Sie strukturieren die Zellvermehrung, um einen Zellverband und damit neues Gewebe aufzubauen. Weiterhin vermitteln die Integrine $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ und $\alpha_7\beta_1$ der äußeren Zellschicht beim Säugetier-Embryo (Trophoblast) dessen Implantation in die Uterusschleimhaut.⁴⁵ Dieser Prozess wird durch die Adhäsion an Laminin eingeleitet und führt später zur Differenzierung der Trophoblast-Zellen in plazentales Gewebe.

Die Integrine $\alpha_{11b}\beta_3$ und $\alpha_v\beta_3$ bilden die β_3 -Subfamilie. Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ befindet sich auf vielen Zelltypen und bindet an Vitronectin und Osteopontin aber auch an viele andere EM-Proteine. Es beeinflusst die Zellwanderung bei Entwicklungs-, Wachstums- und Regenerationsvorgängen. Diese Funktionen sind bei der Embryonalentwicklung und bei der Wundheilung wichtig. Es ist außerdem an pathogenen Prozessen des Tumorwachstums beteiligt. Auch das Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ bindet an verschiedene EM-Proteine, bevorzugt aber an Fibronectin und Fibrinogen. Da das Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ eine zentrale Rolle in dieser Arbeit spielt, werden seine Besonderheiten im nächsten Abschnitt (Kapitel 1.6) genauer beschrieben. Aminosäuresequenzen wie das Tripeptid Arg-Gly-Asp (RGD) in einer bestimmten strukturellen Umgebung dienen den Integrinen als Bindungssepitop.⁴⁶ Außer der β_3 -Subfamilie

binden auch die Integrine $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$ und $\alpha_8\beta_1$ an Proteinsegmente mit dem RGD-Motiv.

Über Kontakte zelleigener Proteine mit den zytoplasmatischen Domänen der Integrine kann die Ligandaffinität der Rezeptormoleküle aktiviert oder deaktiviert werden (*inside-out-signalling*).^{47, 48} Die Proteine Talin, α -Actinin und Vinculin ermöglichen darüberhinaus die Verknüpfung der Integrinmoleküle mit den Actinfilamenten des Zytoskeletts und dadurch eine Clusterung der Rezeptoren (siehe Abbildung 7 rechts). Die Avidität der Wechselwirkung wird durch Bildung dieser sogenannten Fokalkontakte stark erhöht; eine effektive Zelladhäsion findet erst dadurch statt. Sowohl die Vergrößerung des Clusters durch Einbindung weiterer Integrin-Moleküle als auch der Abbau der Fokalkontakte unterliegen einer komplexen Regulation.⁴⁹⁻⁵¹ Die Dissoziation von Fokalkontakten ist wiederum die Basis für viele Zellmigrationsprozesse und hat eine große Bedeutung für die Entwicklung, die Regeneration und die Pathogenabwehr, aber auch für die Auflösung von Thrombozytenaggregaten. Die Zellform ist ebenfalls abhängig von der Balance bei der Bildung von Fokalkontakten.

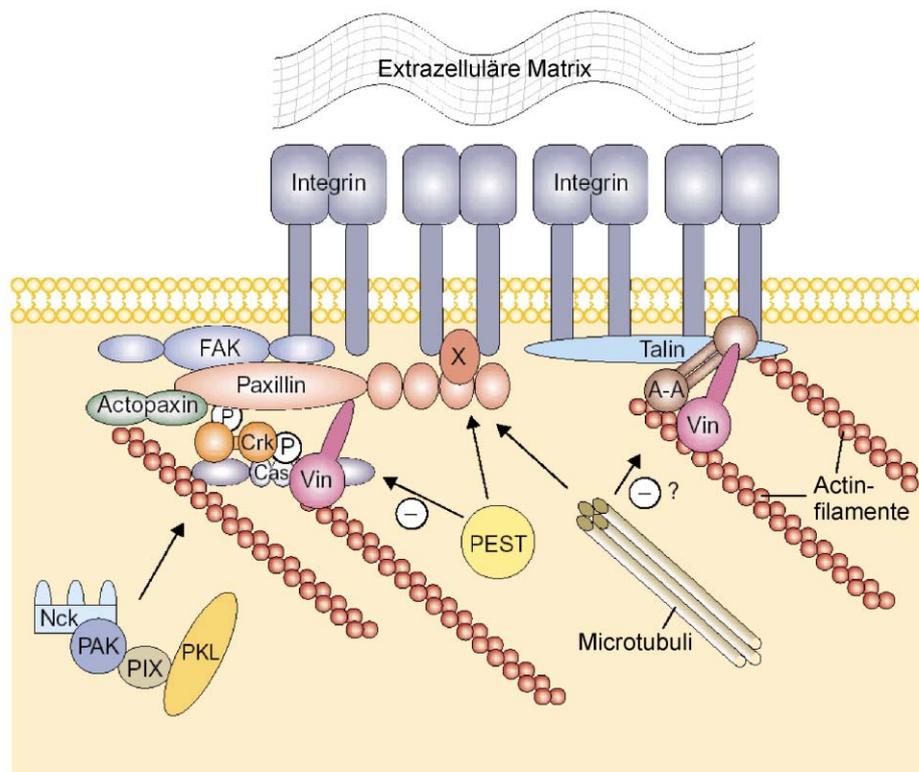


Abbildung 7 Vereinfachtes Schema von Regulation und Reizweiterleitung bei Zelladhäsion und Zellmigration.⁵¹ Die Proteine Talin, α -Actinin (A-A), Vinculin (Vin) und Actopaxin ermöglichen die Clusterung von Integrinen auf der Zelloberfläche durch Verknüpfung mit dem Actin-Zytoskelett. Der Aufbau und Abbau dieser Fokalkontakte wird hauptsächlich über Tyrosin- aber auch Serin/Threonin-Phosphorylierung des Adapterproteins Paxillin durch die *focal adhesion kinase* (FAK) und die *p21-activated kinase* (PAK) reguliert.

Die Vielzahl der beteiligten Adapterproteine und regulatorischen Enzymkaskaden ist in Abbildung 7 schematisch vereinfacht dargestellt. Das Adapterprotein Paxillin ist regulatorisch besonders wichtig. Es kann über die verbrückend wirkenden Proteine Actopaxin und Vinculin (Vin) an das Actin-Zytoskelett gebunden sein. Je nach Integrintyp steht Paxillin direkt oder über die *focal adhesion kinase* (FAK) mit den zytoplasmatischen Domänen der α - und β -Untereinheiten des Integrins in Kontakt. Neben der *p21-activated kinase* (PAK) wirken auch andere Tyrosinkinasen und Serin-/Threoninkinasen auf den Phosphorylierungsgrad und damit auf die Aktivität von Paxillin. Diese Regelkreise leiten außerdem die Information der Ligandbindung an Integrin-Rezeptoren ins Zellinnere weiter (*outside-in-signalling*). In den Integrinuntereinheiten β_{1A} , β_3 , β_5 , und β_7 wurde eine stark homologe, zytoplasmatische Domäne identifiziert, die in einer β -Schleife die Konsensaminosäuresequenz NPLY oder NPIY enthält.⁵² Diese wird durch das in vielen bei der Signalübertragung und in der Bildung von Fokalkontakten beteiligten Proteinen enthaltene sogenannte PTB-Modul (*phosphotyrosine-binding*) erkannt. Neben Talin und ICAP-1 α (*β_1 integrin cytoplasmic domain associated protein*)⁵³, die bekanntermaßen an die zytoplasmatische Domäne der Integrin β -Untereinheiten binden, sind weitere an der Integrinbindung beteiligte Proteine wie Dok-1 (*docking protein 1, downstream of tyrosine kinase 1*) und Numb gefunden worden. Das Protein Numb wird bei der Zellteilung aktiv und ist an der Zelldifferenzierung beteiligt. Die Zellstimulation durch andere extrazelluläre Signale wie lösliche Wachstumsfaktoren und Cytokine ist teilweise verflochten mit den Proteinarrays der Fokalkontakte.

Im Herbst 2001 veröffentlichten J.-P. Xiong *et al.* eine Röntgenstrukturanalyse des extrazellulären Segmentes des Integrins $\alpha_v\beta_3$ (PDB ID 1jv2).⁵⁴ Das Protein wurde in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen kristallisiert. Die korrigierte Struktur des heterodimeren Proteins (Abbildung 8B) enthält alle extrazellulären Teile. Allerdings wurde bei beiden Untereinheiten die Transmembranregion und die zytoplasmatische Region entfernt. Die unkorrigierte Struktur hat einen Knick im Bereich der flexiblen Linker 1 und 3 innerhalb des Stamms, der mit dem Fehlen der Membran erklärt wird. Wegen der weitreichenden Homologien wird diese Struktur als Modell für alle Integrine angesehen.

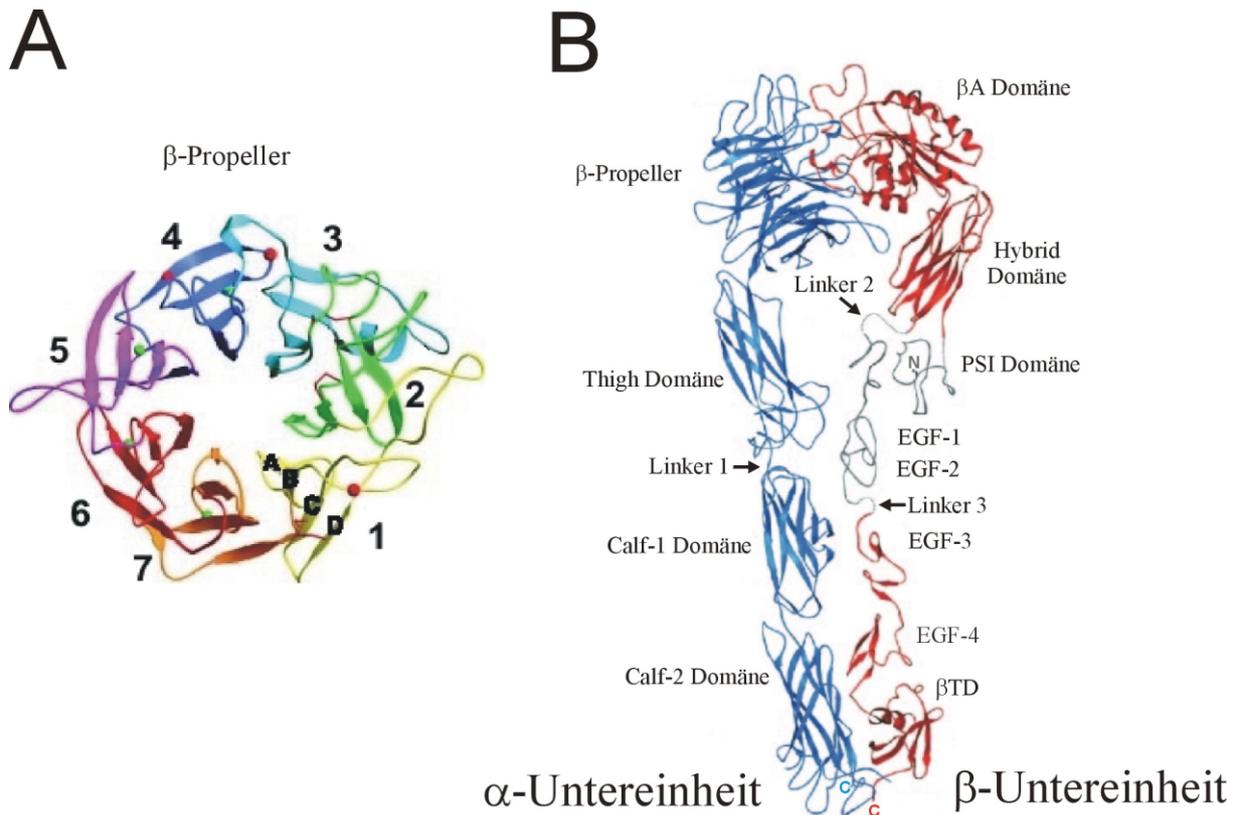


Abbildung 8 (A) Siebenblättriger β -Propeller. (B) Korrigierte Röntgenstruktur des extrazellulären Teils des Integrins $\alpha_v\beta_3$ (PDB ID 1jv2).⁵⁴ Der β -Propeller der α_v -Untereinheit und die βA -Domäne der β_3 -Untereinheit bilden gemeinsam die Ligandbindungsstasche.

Ein siebenblättriger β -Propeller bildet den N-terminalen Kopf der α_v -Untereinheit. Jeder Flügel besteht jeweils aus einer Wiederholung von 60 – 70 Aminosäuren und bildet ein viersträngiges, antiparalleles β -Faltblatt (Abbildung 8A). Die sieben Propellerblätter sind pseudosymmetrisch um eine Achse angeordnet und bilden eine torusförmige Domäne. Nur die α -Untereinheiten α_1 , α_2 , α_L und α_M enthalten zwischen dem zweiten und dem dritten Propellerblatt ein eingefügtes 180 – 200 Aminosäuren langes Segment (*inserted domain*, αI oder αA). Es bildet gemeinsam mit dem β -Propeller die Kopfregeion dieser Integrine. In allen übrigen Integrinen, also auch beim Integrin- $\alpha_{IIb}\beta_3$ und $-\alpha_v\beta_3$, wird die Funktion der αA -Domäne durch die *inserted domain* der β -Untereinheit (βI oder βA) übernommen. Der β -Propeller assoziiert mit der βA -Domäne zu dem ligandbindenden, eiförmigen Kopf des Rezeptors mit den Ausdehnungen $9 \text{ nm} \times 6 \text{ nm} \times 4.5 \text{ nm}$. Diese Einheit und die Kontaktfläche zwischen den Domänen zeigt starke strukturelle Homologie zu den G-Proteinen. Die $G\alpha$ - und $G\beta$ -Kette, ebenfalls ein β -Propeller, interagieren analog.⁵⁵ Diese strukturelle Ähnlichkeit ist überraschend, da G-Proteine der Signalübermittlung im Zellinneren dienen und im Gegensatz zu den Integrinen löslich sind. Die Propellerblätter 4 bis 7 des α_v -Moleküls enthalten auf der Seite, die der βA -Domäne gegenüberliegt, vier lösungsmittelzugängliche Ca^{2+} Bindungsstellen. Die Ligandbindungsstelle befindet sich auf der Oberseite der β -Propellers an der

Kontaktfläche zur β A-Domäne der β_3 -Untereinheit. In der β A-Domäne befinden sich zwei Motive für metallionenabhängige Bindungsstellen (*metal ion-dependent adhesion site* MIDAS und *additional metal ion-dependent adhesion site* ADMIDAS). Direkt an der Ligandbindung beteiligt sind die MIDAS-Region – eine Ca^{2+} -Koordinationsstelle wird durch den Aspartat-Rest des RGD-Motivs gebildet – sowie Blatt 2 und 3 des Propellers. Die ersten 54 aminoterminalen Aminosäuren der β_3 -Untereinheit zeigen starke Homologie zu den Plexinen und Semaphorinen (*plexins-semaphorins-integrins*, PSI). Die Proteinkette der β A-Domäne ist in die Sequenz der *hybrid domain* inseriert und scharnierartig mit dieser verbunden. Vier EGF-Domänen (EGF-1 bis EGF-4) und eine membrannahe Domäne (*tail domain*, β TD) bilden den Stamm der β_3 -Untereinheit. In der α_V -Untereinheit tragen die drei linear angeordneten β -Sandwich-Domänen *Thigh*, *Calf-1* und *Calf-2* den β -Propeller und sind parallel zum Stamm der β_3 -Untereinheit angeordnet.

Die Aminosäuretriade RGD ist in der Sequenz vieler EM-Proteinen enthalten und fungiert als zentrales Erkennungsmotiv für das Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$. In Fibrinogen sind beispielsweise in der α -Kette die Sequenzen RGDF (Arg95 – Phe98) und RGDS (Arg572 – Ser575) als Bindungsepitope identifiziert worden.⁵⁶ Außerdem wirkt das C-terminale Fragment HHLGGAKQAGDV in der γ -Kette (His400 – Val411, γ -12 Sequenz) als weitere Erkennungsregion.⁵⁷ Auch einige Strukturproteine des Bindegewebes wie Kollagen, Laminin und Osteopondin sind Integrinliganden und enthalten RGD-Sequenzen.

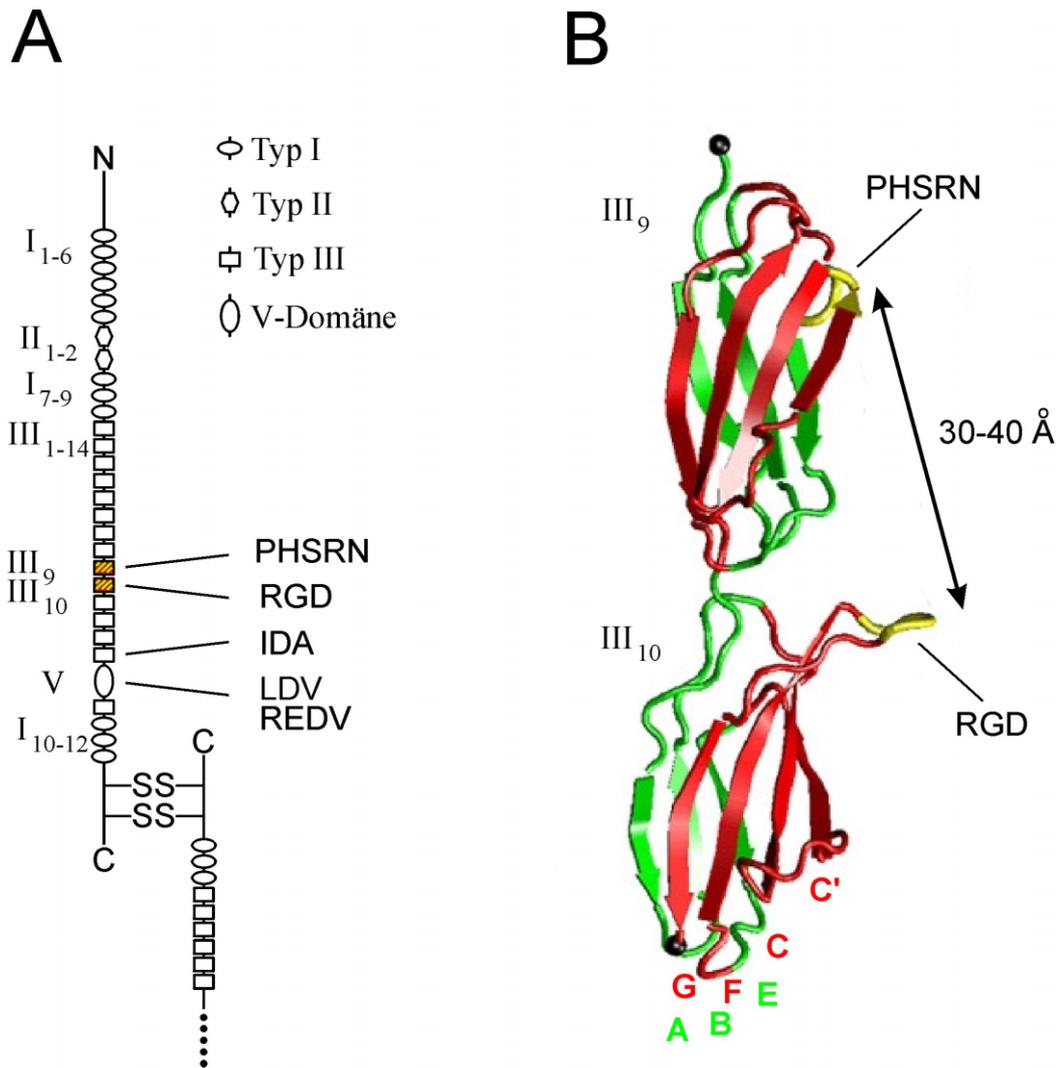


Abbildung 9 Integrinbindungssequenzen im modular aufgebauten Fibronektin. (A) Schema der Typ I-, Typ II- und Typ III-Domänen im Fibronektin (I₁ – I₁₂, II₁ – II₂, III₁ – III₁₄) und der V-Domäne (V). (B) Ausschnitt aus der Röntgenstruktur des Fibronektinfragments III₇ – III₁₀ (PDB ID 1fnf).⁵⁸ Die grün gefärbten β-Stränge A, B und E sowie die rot gefärbten β-Stränge G, F, C und C' bilden jeweils ein antiparalleles β-Faltblatt. Die beiden Bindungssequenzen PHSRN und RGD sind gelb eingefärbt und sind jeweils in den Schleifen zwischen Strang C' und E der Domäne III₉ bzw. zwischen Strang F und G der Domäne III₁₀ lokalisiert.

Fibronektin ist ein modular aufgebautes Adhäsionsprotein, das in den meisten Gewebearten des Körper auftritt und durch seine Bivalenz der Verbrückung und Vernetzung von Zellen dienen kann. Es besteht aus zwei über Disulfidbrücken verbundenen Proteinketten, die bis auf die V-Domäne identisch sind und jeweils eine Molmasse von 220 kDa besitzen. Die etwa 30 linear angeordneten Adhäsionsdomänen werden in drei homologe Typen klassifiziert (Abbildung 9A). Die zehnte Typ-III-Domäne (Domäne III₁₀) enthält das RGD-Motiv in der Sequenz GRGDSPASSKP (Gly1492 – Pro1502) die der integrin-vermittelten Zelladhäsion dient.⁵⁹ Durch Mutationsexperimente wurde in der neunten Domäne

eine Synergieregion mit der Sequenz PHSRN (Pro1376 – Asn1380) lokalisiert, die zusätzlich zum RGD-Motiv (Arg1493 – Asp1495) vom Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und vom Integrin $\alpha_5\beta_1$ erkannt wird.^{60, 61} Die V-Domäne ist aus den Segmenten CS1 und CS5 (*connecting segment*) aufgebaut und präsentiert die Integrinerkennungssequenzen LDV und REDV. Allerdings sind die Domänen III₁₄, V und I₁₀ nicht in allen Spleißvarianten des Fibronektins enthalten. Die Röntgenstrukturuntersuchung des Fibronektinfragments III₇ – III₁₀ (PDB ID 1fnf) zeigt das RGD-Motiv in einer etwa 10 Å von der kompakten Oberfläche der Domäne III₁₀ exponierten, haarnadelähnlichen Schleife (Abbildung 9B).⁵⁸ Die Entfernung der GRGDSP-Schleife von der Synergieregion PHSRN in der neunten Domäne beträgt nur 30 – 40 Å und kann durch Integrinrezeptoren überspannt werden.

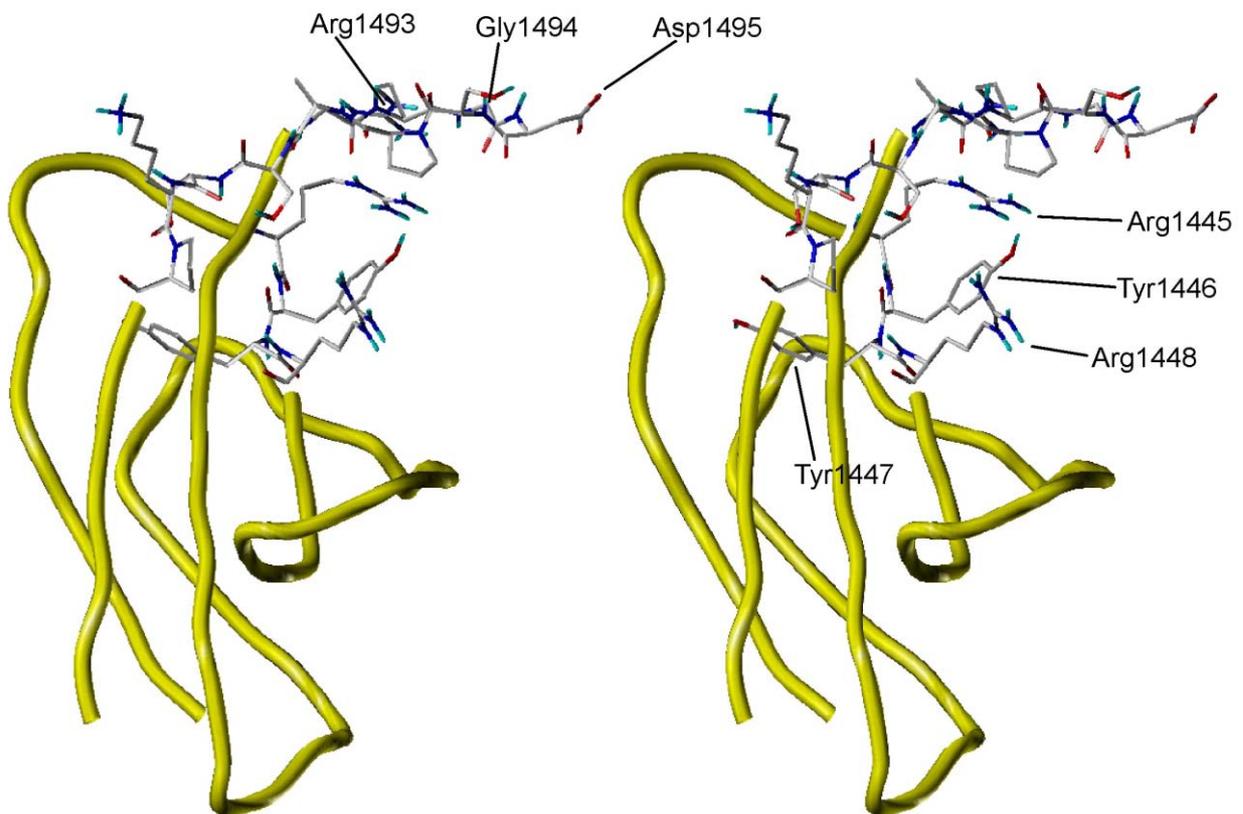


Abbildung 10 Stereodarstellung (*crossed eye*) der Domäne III₁₀ des humanen Fibronektins (Ausschnitt aus der Röntgenstruktur des Fragments III₇ – III₁₀, PDB ID 1fnf).⁵⁸ (A) Die Aminosäuresequenzen RYYR (Arg1445 – Arg1448) und GRGDSPASSKP (Gly1492 – Pro1502) sind in der *capped stick*-Darstellung hervorgehoben. Die Reste von Arg1445, Tyr1446 und Arg1448 weisen in die gleiche Richtung wie die Schleife mit dem RGD-Motiv und nehmen zu diesem einen Abstand von 10 – 20 Å ein.

Eine weitere Tetrapeptidsequenz in der Domäne III₁₀ des humanen Fibronektins ist an der Integrinbindung beteiligt. Die Aminosäuresequenz RYYR (Arg1445 – Arg1448) befindet sich in der Übergangsregion zwischen der Schleife B – C und dem N-terminalen Ende des

β -Stranges C. (siehe Abbildung 9 und Abbildung 10). Die Reste der Aminosäuren Arg1445, Tyr1446 und Arg1448 weisen in die gleiche Richtung wie die Schleife GRGDSP und nehmen einen Abstand von 10 – 20 Å zum RGD-Motiv ein. Sie können also über die RGD-Bindungstasche oder in eine benachbarte Bindungstasche an ein Integrin binden. Auf die Aminosäure Tyr1447 trifft dies nicht zu, da ihr aromatischer Ring im Inneren des β -Sandwiches verborgen ist. Um den Beitrag der Tetrapeptidsequenz RYYR in einem diskontinuierlichen Epitop zu untersuchen, hat Britta Schulte die Bindungseigenschaften der beiden linearen Peptide GRGDSPASSKP und RYYRGGGRGDSPASSKP verglichen.⁶² Der GG-Linker (Gly5/Gly6) ermöglicht den beiden Teilsequenzen eine Orientierung analog zur nativen Domäne III₁₀. Für die Bindungsstudien wurde humanes Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in Liposomen rekonstituiert^{63, 64}, mit den Peptiden gemischt und jeweils in STD-NMR-Messungen untersucht. B. Schulte fand für das Peptid RYYRGGGRGDSPASSKP in einem *epitope mapping* die stärksten STD-Effekte für die Regionen YY und RGD. Bei GRGDSPASSKP wurden nur sehr schwache STD-Effekte beobachtet. Dies ist auf eine langsame Dissoziationskinetik zurückzuführen.

Anhand von Zellen, die das Integrin $\alpha_5\beta_1$ exprimieren, zeigten Redick *et al.* in Adhäsionsassays ebenfalls die Bedeutung der RYYR Sequenz und der PHSRN-Sequenz.⁶⁵ Durch einen sogenannten Alanin-*scan* wurde für Arg1445 in RYYR und Arg1379 in PHSRN ein starker Einfluss auf die Zelladhäsion festgestellt. Es war dazu eine künstliche Alaninmutagenese an verschiedenen Positionen der Fibronectinsequenz durchgeführt worden.

1.6. Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$

Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ wird auf Megakaryozyten und den von ihnen abstammenden Zellen wie den Blutplättchen exprimiert. Es wurde früher als Glycoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) oder auch als CD41/CD61 bezeichnet. Die α_{IIb} - und β_3 -Untereinheiten besitzen ein Molekulargewicht von jeweils 125 kDa, bzw. 108 kDa (SDS-PAGE). Mit einer Zahl von etwa 40000 bis 80000 Kopien pro Zelle ist es, neben CD42b (GPIb-V-IX) und kleinen Anteilen an Integrin $\alpha_2\beta_1$ (CD49b/CD29) und $\alpha_v\beta_3$ das häufigste Rezeptormolekül auf Thrombozyten.⁶⁶⁻⁶⁹ Allerdings sind nur etwa 80 % der Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Moleküle zugänglich. Der Rest ist im offenen kanalikulären System (*surface-connected canalicular system*, SCCS) und in den α -Granula verborgen. Dieser Anteil wird erst nach Aktivierung und Adhäsion der Zelle exponiert. Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ gehört, wie auch das Integrin $\alpha_v\beta_3$, der β_3 -Subfamilie an und bindet über das RGD-Motiv an verschiedene EM-Proteine im Blutplasma wie Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin, Thrombospondin und den von-Willebrand-Faktor (vWF) mit unterschiedlicher Affinität.^{70, 71} Die Interaktionen der Blutplättchenintegrine spielen eine wesentliche Rolle bei der primären und sekundären Hämostase. Dabei aggregieren die Thrombozyten an der verletzten Gefäßwand, werden über Fibrinogenmoleküle miteinander

vernetzt und bilden einen Pfropf. Patienten mit einer Punktmutation der β_3 -Untereinheit (Arg 214/Trp 214) leiden an einer starken Unterexpression des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und an einer Störung der Blutgerinnung.⁷² Die Krankheit wird als Glanzman's Thrombasthenie bezeichnet.

Für die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_{IIb}\beta_3$ wurde eine Konformationsänderung nachgewiesen, die bei Ligandbindung eintritt und vermutlich der Regulation der Bindungsaffinität dient. Monoklonale Antikörper binden spezifisch an sogenannte ligandinduzierte Bindungsstellen (LIBS) die in Abwesenheit des Integrinliganden nicht erkannt werden.⁷³ Das Integrin zirkulierender Thrombozyten wird über Interaktionen mit dem Zellinneren in einen konformationellen Zustand geringer Affinität versetzt. Erst durch Kontakt mit Proteinen der EM werden zusätzliche Bindungsstellen auf dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ freigelegt. Durch Mutationsexperimente und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) konnte gezeigt werden, dass Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ im inaktiven Zustand in einer geknickten Konformation vorliegt, in der die Untereinheiten zwar parallel zueinander, aber die extrazellulären Stammregionen abgewinkelt vorliegen.⁷⁴ Dabei wurde auch beobachtet, dass mit der Aktivierung und Clusterung der Integrinrezeptoren die Bildung von Homodimeren und -trimeren korreliert ist. Durch diese Aktivierung wird die Thrombozytenaggregation eingeleitet.

Neben den nativen RGD-Domänen in Proteinen binden auch kleinere Fragmente, synthetische Oligopeptide und Cyclopeptide mit dem RGD-Motiv an das Integrin und inhibieren dadurch die Zellaggregation. Dabei haben die flankierenden Aminosäuren und die Konformation der RGD-Sequenz großen Einfluss auf die Affinität und Selektivität.⁷⁵⁻⁷⁷

Auf der Suche nach therapeutisch verwendbaren Integrinantagonisten wurde die Struktur-Wirkungs-Beziehung für viele disulfidcyclisierte Peptide und Semipeptide sowie für peptidomimetische Benzodiazepinderivate untersucht.^{78, 79}

1.7. Thrombozyten und Blutgerinnung

Thrombozyten oder Blutplättchen besitzen eine discoide Form mit einem Durchmesser von 2 – 4 μm und einer Dicke von 0.75 μm .⁴⁴ In einem Liter Blut befinden sich $1.50 - 3.0 \times 10^{11}$ Thrombozyten. Sie werden im Knochenmark aus den Megakaryozyten gebildet, haben keinen Zellkern und zirkulieren ungefähr sieben Tage im Blut, bis sie durch das retikuläre System der Leber und der Milz abgebaut werden. Thrombozyten enthalten charakteristische Organellen, die α -Granula, in denen adhäsive Proteine wie Fibrinogen, Fibronectin, vWF, Thrombospondin und Vitronectin sowie membrangebundenes Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ enthalten sind. Das SCCS dient als Transportroute zwischen dem externen Medium und den α -Granula. Der Verschluss eines verletzten Blutgefäßes verläuft in zwei Phasen.^{49, 80} In der primären Hämostase wird die Blutung schnell durch einen provisorischen Thrombozytenpfropf gestillt (siehe Abbildung 11). Unter dem Endothel, das die Gefäßwand auskleidet, liegt die aus Kollagen und anderen EM-Proteinen aufgebaute Basalmembran

(Subendothel). Durch Verletzungen wird diese freigelegt und Thrombozyten lagern sich unter Beteiligung des von-Willebrand-Faktors an. Auch das kollagenhaltige Subendothel der verletzten Haut oder Schleimhaut startet die Thrombozytenaggregation. Die Wechselwirkung von Kollagen mit dem Integrin $\alpha_2\beta_1$ ist besonders wichtig für die Aktivierung der Thrombozyten und führt zu weiterer Abflachung und kaskadenartiger Aggregation der Zellen.

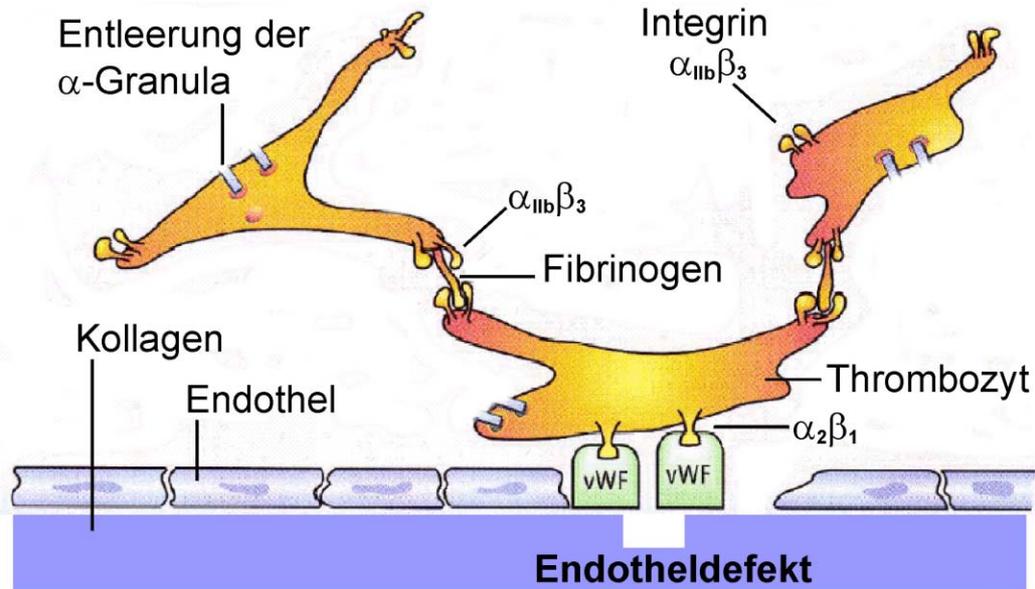


Abbildung 11 Schematische Darstellung der Thrombozytenaggregation an einem Defekt der Gefäßwand. Der von-Willebrand-Faktor (vWF) vermittelt die primäre Wechselwirkung des Integrins $\alpha_2\beta_1$ an die verletzte Gefäßwand. Die Thrombozyten werden durch das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ über Fibrinogen und Fibronectin verbrückt. Die Ausschüttung der α -Granula aktiviert weitere Thrombozyten.

Die Thrombozytenaktivierung und -aggregation unterliegt einer komplexen Regelung, bei der die Integrinmoleküle der bidirektionalen Signalübertragung dienen und der ADP/ATP- sowie der Ca^{2+} -Haushalt der Zelle beeinflusst werden.^{49, 81, 82} Im Verlauf dieser Prozesse werden die Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Moleküle in eine hochaffine Konformation versetzt und über die Verankerung am Zytoskelett zu Fokalkontakten gruppiert.^{50, 51} Die Bindung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ an bivalente Adhäsionsmoleküle wie Fibrinogen und Fibronectin vernetzt schließlich die Thrombozyten. Zur Beschleunigung der Aggregation und zur Vergrößerung des Blutgerinnsel werden Thrombospondin und Fibronectin aus den α -Granula der Thrombozyten ausgeschüttet. Zur Festigung des Thrombozytenpfropfes wird die sekundäre Hämostase, also das plasmatische Gerinnungssystem aktiviert. Ziel ist die Polymerisation von Fibrinogen, einem dimeren, tripelhelikalen Protein. Durch die enzymatische Abspaltung des Fibrinopeptid A und B vom freien Serumfibrinogen entsteht zunächst lose vernetztes,

lösliches Fibrin. Durch weitere Fibrinpolymerisation werden die Thrombozyten in ein Netzwerk von festen Fibrinfasern eingebunden. Mit einer kontrollierten Gegenreaktion, der Fibrinolyse, wird die Fibrinbildung gestoppt, oder das Fibringerinnsel nach einer bestimmten Zeit wieder aufgelöst. Mindestens 15 Gerinnungsfaktoren und -enzyme sind in vier Regelzyklen allein an der plasmatischen Gerinnungskaskade beteiligt. Im Zusammenspiel mit der Fibrinolyse stellt sich das sogenannte hämostatische Gleichgewicht ein. Störungen der Hämostase können zu Blutungen oder zu Thrombosen wie Herzinfarkt oder Schlaganfall führen. Wird ein Thrombus vom Blutstrom losgerissen, droht Verstopfung distaler Blutgefäße und eine Lungenembolie.

Bei Störungen der zellulären Blutgerinnung kann eine Transfusion humaner Thrombozyten durchgeführt werden. Diese therapeutische Anwendung erfolgt in Form eines Thrombozytenkonzentrates. Dazu werden Vollblutspenden direkt bei der Entnahme mit einer konzentrierten Lösung von Natriumcitrat, Zitronensäure, Natriummonohydrogenphosphat und Glucose (Dextrose) versetzt (CPD-Lösung). Die Menge beträgt etwa 14 % des Blutvolumens. Dadurch wird eine Endkonzentration von etwa 13 mM Gesamtcitrat, 1,75 mM Gesamtphosphat und 17,4 mM Glucose erreicht. Die Thrombozyten werden vom Hersteller durch fraktionierte Zentrifugation abgetrennt. Ein verwendungsfertiges Thrombozytenkonzentrat enthält die vereinigten Thrombozyten von fünf Vollblutspenden in 310 mL bis 320 mL in CPD-Plasma. Die Zellzahl wird mit mindestens $2,5 \times 10^{11}$ angegeben. Dies entspricht einem Gehalt von $7,96 \times 10^8$ Thrombozyten pro Milliliter. Ein Thrombozytenkonzentrat wird bei 22 °C in einem sauerstoff- und CO₂-durchlässigem Beutel gelagert und darf bis einschließlich des fünften Tages nach der Entnahme zur Transfusion angewendet werden. Die Thrombozyten verlieren nach dieser Zeitspanne zum Teil ihre Gerinnungsaktivität. Etwa bis zum fünften Tag ist mit dem bloßen Auge das sogenannte *swirling*-Phänomen zu beobachten. Die Thrombozyten sind noch vollständig abgeflacht und rufen durch die bevorzugt parallele Orientierung eine schlierenartige Lichtstreuung hervor. Am sechsten Tag nach der Blutentnahme gilt das Thrombozytenkonzentrat als überlagert und kann bei der Blutbank zu Forschungszwecken abgeholt werden.

1.8. Antikoagulantien

Natürliche, exogene Antikoagulantien treten in den Sekreten vieler Organismen auf. In Schlangengiften wurden Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Antagonisten entdeckt, die aufgrund ihrer starken Homologie zur Klasse der Disintegrine zusammengefasst wurden.^{83, 84} Über 40 dieser cysteinreichen, 50 – 80 Aminosäuren langen Peptide sind bisher charakterisiert und sequenziert worden. Teilweise treten Homodimere oder -trimere auf. Schlangenarten, die Disintegrine sezernieren, sind weltweit verbreitet, darunter finden sich verschiedene Ottern- und Vipernarten sowie eine große Zahl Klapperschlangen. Typisch für Disintegrine ist eine

disulfidstabilisierte Haarnadelschleife, die das Aminosäuremotiv RGDW, RGDN oder KGDW präsentiert. Typische Sequenzen dieser Schleife sind CRVARGDW~~ND~~DDTC oder CRRARGDNPDDRC wobei die beiden Cys-Reste über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ bindet an dieses Epitop mit hoher Affinität; die Bindungskonstante liegt oft im Bereich $K_D = 10^{-8} - 10^{-7}$ M. Besonders gut untersucht ist das von der Otternart *Echis carinatus* produzierte Echistatin (49 AS).^{85, 86} Die dreidimensionale Struktur dieses Peptides wurde mit 2D-NOESY-NMR-Experimenten bestimmt und enthält zwei starre, antiparallele Stränge, die mit einer sehr flexiblen Schleife der Sequenz CKRARGDDMDDYC verbunden sind.⁸⁷ Das KGDW-Motiv im Disintegrin Barbourin (73 AS) aus dem Gift der Klapperschlange *Sistrurus m. barbouri* diente bei der Entwicklung des Wirkstoffes cyclo(S,S)-Mpr-Har-GDWPC-NH₂ (Eptifibatide) als Leitstruktur.⁸⁸ Diese Substanz ist über eine Disulfidbrücke zum 3-Mercaptopropionylrest (Mpr) cyclisiert, enthält L-Homoarginin in einem Har-GDW-Motiv und erlangte unter dem Namen Integrilin (Cor Therapeutics) klinische Bedeutung. Ebenfalls von Forschungsergebnissen zu den Disintegrinen angeregt, führten Hayashi, Katada *et al.* ausgehend von der Sequenz PSRGDW umfangreiche SAR-Studien durch.^{89, 90} Eine besonders gute Inhibition der Thrombozytenaggregation ($IC_{50} = 0.4 \mu\text{M}$) zeigte dabei PS-Hyp-GDW. Dieses lineare Peptid trägt einen 4-Hydroxy-L-prolinrest an der Arg-Position und weist in ELISA-Bindungsstudien eine über 5500-fach höhere Selektivität für das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ gegenüber dem Integrin $\alpha_V\beta_3$ auf.

Andere Organismen wie der Blutegel *Macrobdeella decora* oder die Zecke *Dermacentor variabilis* produzieren antithrombotische RGD-Peptide, die allerdings keine Homologie zu den Disintegrinen besitzen.^{91, 92} Decorsin (39 AS) und Variabilin (47 AS) enthalten jeweils die Sequenzen PRGDAD bzw. PRGDTP. Die IC_{50} -Werte bezüglich der Thrombozytenaggregation sind im nanomolaren Bereich. Die antithrombotische Wirkung von Calin aus dem medizinischen Blutegel *Hirudo medicinalis* beruht auf der Inhibition und Maskierung des Kollagens der Basalmembran.

Zur Entwicklung moderner Antikoagulantien wurden monoklonale Antikörper, Peptide und Peptidomimetika als therapeutisch einsetzbare Inhibitoren des Thrombozytenintegrins getestet. Neben dem humanisierten, monoklonalen Antikörperfragment aus der Maus Abciximab (ReoPro von Centrocort/Eli/Lilly) sind erste niedermolekulare Wirkstoffe wie das Cyclopeptid Eptifibatide oder das Peptidomimetikum Tirofiban (Aggrastat von Merck) auf dem Markt.⁹³⁻⁹⁵ Diese Medikamente können nur parenteral angewendet werden, und Nebenwirkungen wie Blutungen sind häufig. Ein Anwendungsgebiet sind die koronaren Herzerkrankungen. Das extrem hohem Herzinfarktisiko nach Operationen an den Herzkranzgefäßen erfordert eine besondere Thromboseprävention. Speziell bei Eingriffen wie Ballondilatation oder Stentimplantation profitieren die Patienten signifikant durch die Behandlung mit Integrinantagonisten.⁹⁶

1.9. Tumorwachstum und Neoangiogenese

Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ ist ein vielversprechendes *target* bei der Suche nach Wirkstoffen gegen Krebs. Die Tendenz zur Metastasierung und zum invasiven Wachstum in umgebendes Gewebe sind Kriterien für die Bösartigkeit (Malignität) eines Tumors. Diese Eigenschaft ist sehr oft mit einer starken Überexpression des Integrins $\alpha_v\beta_3$ korreliert. Dieser Rezeptor dient der Tumorzelle dazu, in einen Zellverband einzudringen und sich anzusiedeln. Durch eine selektive Blockade des Integrins kann die Metastasierung gebremst werden.

Ein weiterer Effekt ist die Inhibition der Neoangiogenese. Tumorwachstum erfordert wegen des erhöhten Nähr- und Sauerstoffbedarfes die Neubildung von Blutgefäßen. Dabei sind sowohl die $\alpha_v\beta_3$ Integrinmoleküle auf den Tumorzellen als auch auf den Zellen der Gefäßwand beteiligt und machen dieses Integrin zum idealen Angriffspunkt. Eine Therapie mit $\alpha_v\beta_3$ Antagonisten kann also den Tumor aushungern und schrumpfen lassen, durch Kreuzreaktivität mit dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ besteht aber die Gefahr von unkontrollierten Blutungen. Mit dem Ziel, die Selektivität für das $\alpha_v\beta_3$ Integrin zu erhöhen wurden viele RGD-Peptide und Peptidomimetika untersucht. H. Kessler *et al.* ersetzten bei einem 'räumlichen Screening' in dem Peptid cyclo(RGDFV) alle Aminosäurepositionen sukzessive durch die D-Form.⁹⁷ Diese Verbindungen zeichnen sich neben einer hohen Proteasestabilität besonders durch eine starre und sehr charakteristische Konformation aus. In SAR-Untersuchungen wurden die relative Inhibition der $\alpha_v\beta_3$ Integrin- und der Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -vermittelten Zelladhäsion für jedes stereoisomere Peptid verglichen. Dabei zeigte cyclo(RGDfV) eine über 800-fache Selektivität für das Integrin $\alpha_v\beta_3$ und diente als Leitstruktur für die Entwicklung nichtpeptidischer, selektiver Antagonisten für das Integrin $\alpha_v\beta_3$.⁹⁸ Wegen seiner mikromolaren IC_{50} -Werte bezüglich des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ ist cyclo(RGDfV) auch für Bindungsstudien mit diesem Rezeptor als Referenzsubstanz gut geeignet. Die dreidimensionale Struktur der einzelnen stereoisomeren Peptide wurde durch NMR-Spektroskopie und Moleküldynamikrechnungen untersucht. Es stellte sich heraus, dass alle Moleküle eine stark geknickte γ -Schleife enthalten, deren exponierte Aminosäure immer an der Position $i+3$ bezüglich der D-Aminosäure liegt. Bei cyclo(RGDfV) bildet genau das RGD-Motiv die Triade der γ -Schleife mit Glycin als zentrale Aminosäure. Der Abstand der C^α -Atome der Aminosäuren Arg und Asp ist in dieser Konformation relativ klein. Der Ansicht der Autoren nach passt das geknickte Peptidrückgrad im Bereich des RGD-Motives besonders gut in die Bindungstasche des Integrin $\alpha_v\beta_3$. Sie begründen so die hohe Selektivität. In Zusammenarbeit mit der Firma Merck in Darmstadt wurden verschiedene Derivate des Moleküls untersucht. Der Austausch von Valin gegen N-Methylvalin führte zu einer vielversprechenden Substanz (EMD 121974, Merck KGaA), mit der klinische Tests durchgeführt wurden.⁹⁹ Parallel zu den Studien an linearen und cyclischen RGD-Peptiden werden auch peptidomimetische Tumorwirkstoffe entwickelt und untersucht.¹⁰⁰

1.10. Liposomen und Rekonstitution von Membranproteinen

Amphiphile Moleküle, besonders aber Phospholipide tendieren im wässrigen Medium zur Selbstorganisation. Dabei bilden sich bimolekulare Schichten und geschlossene Strukturen, die als Lipidvesikel oder Liposomen bezeichnet werden (siehe Abbildung 12).¹⁰¹ Sie treten in biologischen Systemen auf und können auch künstlich hergestellt werden. Man unterscheidet verschiedene Arten synthetischer Vesikel. Multilamellare Vesikel (MLV) bestehen aus mehreren konzentrischen Lipiddoppelschichten. Unilamellare Vesikel werden oberhalb eines Durchmessers von 100 nm als "groß" klassifiziert (*large unilamellar vesicles*, LUV); bei einem geringeren Durchmesser spricht man von *small unilamellar vesicles* (SUV). Optimale physikalische Stabilität der Liposomen wird bei einem Durchmesser von 80 – 200 nm beobachtet.

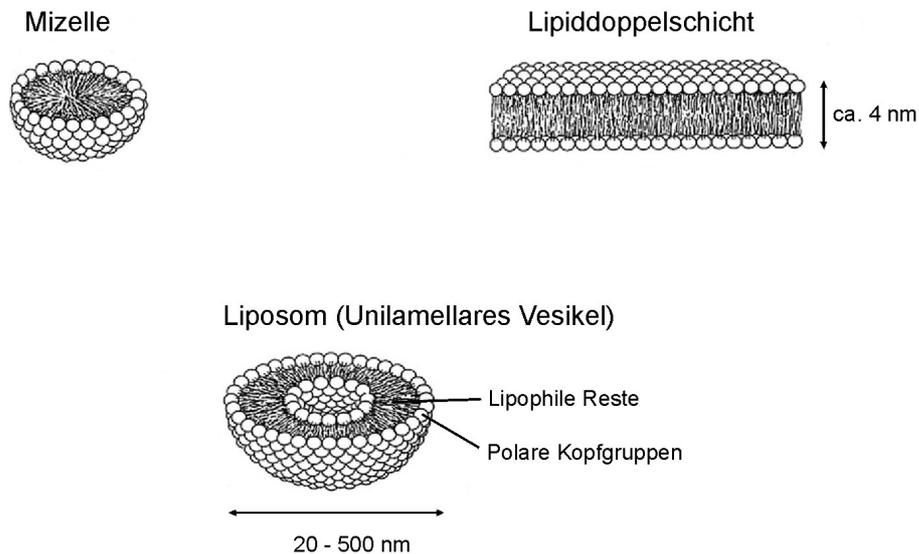


Abbildung 12 Schematische Darstellung verschiedener Aggregationsformen amphiphiler Moleküle im wässrigen Medium: Mizelle, planare Doppelschicht und unilamellares Vesikel (Liposom). Es sind jeweils die lipophilen Alkylketten zueinander orientiert und die polaren Kopfgruppen weisen in die wässrige Phase.

Die gemittelte Dichte eines Liposoms entspricht aufgrund des kleinen Masseanteils der Lipiddoppelschicht etwa der Dichte der eingeschlossenen Lösung. Sind die Dichte des intra- und des extravasikulären Puffers gleich, sedimentieren die Liposomen praktisch nicht. Für die meisten Untersuchungsmethoden können Liposomen deshalb wie eine homogene Lösung eingesetzt werden. Eine physikalische Trennung ist allerdings durch Ultrazentrifugation in einem Saccharosegradienten möglich. Beispielsweise können multilamellare Vesikel so entfernt werden.

Eine künstliche Lipidmembran ist für Ionen und für kleine, geladene Moleküle praktisch undurchlässig. Auch viele Proteine und andere Biopolymere können die wässrige Phase des

Vesikelinneren kaum verlassen. Für kleine neutrale Moleküle zeigt sich mit abnehmender Polarität eine nennenswerte Permeabilität. Liposomen wurden intensiv untersucht als Modell für natürliche Zellmembranen aber auch als Transportsystem für pharmakologische Wirkstoffe.¹⁰² Besonders die in natürlichen Zellmembranen auftretenden Phospholipide wie Diacylphosphatidylcholin (PC, DAPC), Diacylphosphatidylglycerin (PG, DAPG) und Diacylphosphatidylethanolamin (PE, DAPE) auf Basis der gesättigten und ungesättigten C14-, C16- und C18-Carbonsäuren werden häufig für die Liposomenpräparation verwendet. Dabei muss allerdings die Hydrolyseempfindlichkeit der Phosphodiester und die Oxidationsempfindlichkeit der ungesättigten Lipide beachtet werden. Die mittlere Dicke einer Lipiddoppelschicht beträgt 4 nm (3.7 – 4.6 nm); darin besetzt ein Phospholipidmolekül eine Fläche von 0.7 nm^2 ($7 \times 10^{-19} \text{ m}^2$).¹⁰³ Je nach Größe bilden 2×10^3 bis 1×10^6 Lipidmoleküle die Membran eines Vesikels. Bei einer typischen Molekülanzahl von 2×10^5 entspricht die Masse eines Liposoms über 130 MDa ohne das enthaltene Wasser. Um die Oberflächenladung der Lipiddoppelschicht an natürliche Membransysteme anzugleichen und die Stabilität der Liposomen zu erhöhen, werden oft die anionischen Phosphatidylglycerine in einem Anteil von 5 – 50 mol% eingesetzt. Die Wahrscheinlichkeit von Fusion oder Kollaps der Vesikel wird durch elektrostatische Abstoßung und durch die Bildung von stark solvatisierten Ionenpaaren in der Kopfregion der Lipide verringert. Über die nukleophile Aminogruppe kann DAPE kovalent modifiziert und die Oberflächenbeschaffenheit des Liposoms beeinflusst werden. Wird DAPE mit dem Oligosaccharid Sialyl Lewis^x (sLe^x) verknüpft und mit einem Anteil von 3 – 13 mol% in Liposomen integriert, erhält man z. B. polyvalente E-Selectin Liganden.¹⁰⁴ Wird in der Vesikelpräparation 1 – 10 mol% polyethylenglycolverknüpftes (MW = 1 – 5 kDa) DAPE eingesetzt, erhöht sich durch sterische Stabilisierung die *in vivo* Halbwertszeit der Liposomen deutlich.¹⁰⁵⁻¹⁰⁸ Phospholipide bilden in reiner Form aber auch in fein verteilten, wässrigen Dispersionen smektische Mesophasen. Wichtig für die Präparation und Anwendung von Liposomen ist die Übergangstemperatur T_c der verwendeten Lipide. Unterhalb T_c liegt eine geordnete, feste Gelphase vor, und die Lipidmoleküle bilden ein zweidimensionales, hexagonales Gitter. Oberhalb der Übergangstemperatur zeigen Lipide eine flüssigkristalline Struktur. Die Nahordnung wird aufgebrochen, die Lipiddoppelschicht wird flexibel und kann als zweidimensionale Flüssigkeit angesehen werden. Die in synthetischen Liposomen häufig eingesetzten Phospholipide DMPC und DMPG haben beispielsweise jeweils eine Übergangstemperatur von $T_c = 23 \text{ °C}$.^{109, 110} Die Übergangstemperatur der Vesikelmembran zeigt, je nach Lipid, eine schwache Abhängigkeit von pH-Wert und Calciumionengehalt der wässrigen Phase. Zweiwertige Ionen (Ca^{2+} , Mg^{2+}) erhöhen die Umwandlungstemperatur, hingegen führt die Erhöhung des pH-Wertes zu einer Erniedrigung der Umwandlungstemperatur. Bei einem Cholesterinanteil von 30 – 50 mol% in einem Lipidgemisch verschwindet die sprungartige Phasenumwandlung bei T_c . Die Flexibilität der Lipiddoppelschicht nimmt zu, aber die Langzeitstabilität der Liposomen wird schlechter.¹¹¹

Für die meisten Verfahren zur Präparation von Liposomen werden Lipide in einem organischen Lösungsmittel gelöst und durch Einengung im Rotationsverdampfer als dünner Film auf der Gefäßwand abgeschieden. Fein verteilte Lipide können auch aus einer Lösung in Cyclohexan durch Gefriertrocknung erhalten werden. Durch Schütteln oder Ultraschalleinwirkung bei einer Temperatur über T_c in Wasser oder Puffer werden die Lipide dann dispergiert und hydratisiert. Die so hergestellten Liposomen sind überwiegend multilamellar und weisen eine breite Größenverteilung auf. Durch mehrfache Extrusion durch eine mikroporöse Polycarbonatmembran mit einer Porenweite von 100 nm werden LUV mit einer einheitlichen Größenverteilung erhalten.¹¹² Sehr effektiv und verbreitet ist die Liposomenpräparation durch Detergenzabreicherung aus wässrigen Lipid-Detergenz-Mischungen. Zur Bildung gemischter Mizellen werden zunächst Lipide in Gegenwart von Detergenzien wie Natriumcholat, Octylglucosid oder Triton X-100 solubilisiert. Dabei werden für das molare Verhältnis von Detergenz und Lipid meist Werte im Bereich von 0.5 bis 2 gewählt. Bei Entfernung des Detergenz durch Dialyse, Gelfiltration oder Absorption bilden sich LUV mit sehr guter Homogenität. Charakteristisch für verschiedene Detergenzien ist ihre kritische Mizellenbildungskonzentration (KMK oder CMC). Bei hoher Verdünnung geht das Detergenz in monomolekularer Form in Lösung. Beim Überschreiten der CMC, die bei ionischen Tensiden bei 10^{-2} M und bei nichtionischen bei 10^{-4} M liegt, assoziiert es zu den mizellären Molekülverbänden. Erhöht man die Konzentration einer wässrigen Lösung einer amphiphilen Verbindung wesentlich über ihre CMC hinaus, so entstehen aus den sphärischen Mizellen zylinderförmige Gebilde. Bei noch höheren Konzentrationen lagern sich diese Zylinder zusammen und bilden Mesophasen (nematische Phasen, Flüssigkeitskristalle), deren Zustand zwischen dem von isotropen Flüssigkeiten und dem von festen Kristallen liegt.

Um Proteine in die Lipidmembran zu integrieren, werden Vesikel aus dem gemischten Solubilisat von Lipiden und gereinigtem Membranprotein hergestellt. Für diese Rekonstitution solubilisierter Membranproteine ist die Detergenz-Abreicherung durch Gelfiltration oder Absorption besonders geeignet, weil in diesem relativ schnellen Prozess wenig Protein durch Aggregation verloren geht. Als Adsorbens sind makroporöse Styrol-Divinylbenzol-Kopolymere wie Bio-Beads SM-2 von BioRad geeignet. Die höchste Bindungskapazität wird für Moleküle mit einer Molmasse unter 2 kDa erreicht.

Die Rekonstitution funktionell aktiver Membranproteine aus gereinigten Komponenten ist eine wichtige Methode zur Untersuchung von Membranprozessen wie Stofftransport, Zelladhäsion oder Signalübertragung. Viele Membranproteine, darunter auch GPCRs unterschiedlicher Organismen, sind bisher in Liposomen rekonstituiert worden.^{34, 36, 113-118} Die Funktionalität bzw. Aktivität dieser Rezeptoren und Enzyme ist durch Adhäsionsassays, SPR, Immunoassays, Bestimmung der Enzymprodukte oder durch Kryoelektronenmikroskopie (cryo-EM) nachgewiesen worden.

1.11. NMR-Screeningmethoden

Für die Entwicklung von Wirkstoffkandidaten in der pharmazeutischen Forschung ist die rasche Identifikation von Liganden für das Zielprotein essenziell. Neben dem reinen Screening auf Bindungsaffinität sind auch Aussagen über das Bindungsepitop am Liganden oder am Rezeptor sowie über den Mechanismus wichtig, um die Wirkstoffsuche zielgerichtet durchzuführen. In den letzten 6 – 7 Jahren sind etliche NMR-basierte Methoden entwickelt worden, um Bindungsprozesse aufzuklären.¹¹⁹ Das NOE-Screeningverfahren von Meyer, Peters *et al.* beruht auf dem Transfer-NOE.¹²⁰⁻¹²² Kleine Moleküle, die reversibel an einen makromolekularen Rezeptor binden, erfahren einen Vorzeichenwechsel der NOEs. Diese Methode gibt nicht nur Auskunft darüber, ob die Substanz bindungsaktiv ist, sondern sie kann unter geeigneten Bedingungen sogar die 3D-Struktur des Liganden im gebundenen Zustand liefern.^{123, 124} In Mischungen kann die bindende Komponente direkt durch die Strukturinformation aus dem NOESY-Spektrum identifiziert werden. Es besteht keine obere Molekulargewichtsgrenze, sondern die Signifikanz der Methode steigt mit der Proteingröße sogar an.

Die Arbeiten von Fesik *et al.* haben in der pharmazeutischen Forschung nennenswerte Bedeutung erreicht. Die *SAR by NMR*-Methode basiert auf der Beobachtung von Unterschieden in der ¹⁵N-chemischen Verschiebungen für die Proteinresonanzen bei Anbindung von Liganden.^{125, 126} Es werden dafür ¹⁵N-markierte Proteine benötigt. Die Verschiebungsdifferenzen im ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum ermöglichen nicht nur die Detektion von Bindungsaktivität. Nach Zuordnung der Proteinresonanzen kann auch die Bindungsdomäne des Rezeptorproteins lokalisiert werden. Ein entscheidender Nachteil dieser Methode ist, dass nur Proteine oder Proteinfragmente bis zu einer Größe von 30 kDa geeignet sind. Membranständige Proteine können nicht praktikabel untersucht werden. Durch Anwendung der TROSY-Technik wurde diese Grenze hin zu größeren Proteinen verschoben.^{24, 127} Selektive ¹³C-Markierung der Proteinmethylgruppen ermöglicht die Aufnahme von ¹H-¹³C-HSQC-Spektren mit einer dramatisch verringerten Signalüberlagerung bei großen Proteinen.

Das *Water-LOGSY*-Experiment (*water-ligand observation with gradient spectroscopy*) zur Detektion von Bindungsaffinität basiert auf dem negativen NOE des auf gebundenen kleinen Molekülen adsorbierten Wassers im Gegensatz zum positiven Vorzeichen für den NOE zwischen Wasser und freien kleinen Molekülen.¹²⁸ Bindende und nichtbindende Moleküle haben somit im NMR-Spektrum unterschiedliche Vorzeichen und können so unterschieden werden. *Water-LOGSY* kann prinzipiell auch für solubilisierte oder rekonstituierte Membranproteine eingesetzt werden, erfordert aber eine starke Solvatisierung der Bindungstasche und des Liganden.

Das *reverse NOE pumping* Experiment (RNP) hingegen überträgt Magnetisierung von bindenden Molekülen auf den makromolekularen Rezeptor.^{129, 130} Es handelt sich hierbei um

ein Differenzexperiment; bei einem der Experimente wird ein Relaxationsfilter verwendet, so dass die Proteinmagnetisierung wieder im Gleichgewicht ist und daher Magnetisierung vom Liganden auf den Rezeptor übertragen werden kann. Durch Subtraktion von einem Referenzexperiment werden die bindenden Komponenten sichtbar.

Neben der Korrelationszeit, der chemischen und der magnetischen Umgebung ändert sich auch das Diffusionsverhalten eines Moleküls bei der Bindung an den Rezeptor. Dieser Effekt wird in diffusionseditierten NMR-Experimenten unter Anwendung von Gradientenimpulsen (PFG) ausgenutzt.¹³¹⁻¹³³ Weil das selektierte Signal einen gemittelten Diffusionskoeffizienten der gebundenen und freien Ligandmoleküls repräsentiert, liefert die Methode nur für kleine Ligandüberschüsse gegenüber dem Protein verlässliche Werte. Außerdem sollten sich Ligand und Rezeptor im Diffusionsverhalten stark unterscheiden. Diese Bedingung ist mit Membranproteinen generell leichter zu erfüllen als mit kleinen Proteinen.

Die NMR-Bindungsstudien wurden in dieser Arbeit mit der Sättigungstransferdifferenz-NMR-Methode durchgeführt (STD-NMR). Die Grundlagen und Besonderheiten dieser Methode werden im nächsten Abschnitt (Kapitel 1.12) ausführlich beschrieben.

1.12. Sättigungstransferdifferenz-NMR-Spektroskopie

Der Sättigungstransfer zwischen verschiedenen Molekülen oder molekularen Zuständen ist zunächst für den langsamen chemischen Austausch beschrieben worden.¹³⁴⁻¹³⁹ Gemessen an der Differenz der NMR-spektroskopischen Resonanzfrequenzen $\Delta\omega$ zweier Zustände, ist die Umwandlungsgeschwindigkeit in den untersuchten Systemen gering, und es treten diskrete Signale für zwei Konformationen oder Bindungszustände des beobachteten Moleküls auf. Die Autoren konnten über die Kreuzrelaxationsrate die Geschwindigkeitskonstante für die Konformationsänderung bestimmen. Außerdem wurden durch Sättigungstransferexperimente für Protein-Ligand-Wechselwirkungen mit langsamer Kinetik die Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} für Assoziation und Dissoziation approximiert. Diese Publikationen beziehen sich auf frühe Arbeiten von Forsén und Hoffman und behandeln nur den Sättigungstransfer zwischen zwei Zuständen eines Moleküls.^{140, 141}

Ist hingegen der Austausch des Liganden an der Rezeptorbindungsstelle schnell in Relation zur NMR-Zeitskala, kann der intermolekulare Sättigungstransfer vom Protein auf bindende Liganden gezielt zum Screening von Substanzbibliotheken ausgenutzt werden.^{142, 143} Anhand von Gemischen verschiedener Mono- und Oligosaccharide zusammen mit pflanzlichen Lektinen wie dem Weizenkeimlektin (*Wheat germ agglutinin*, WGA) oder dem Ricinuslektin (*Ricinus communis agglutinin*, RCA₁₂₀) zeigte M. Mayer erstmals die Detektion der jeweiligen bindungsaktiven Zuckermoleküle durch Sättigungstransferdifferenz-NMR-Experimente (STD-NMR).¹⁴⁴

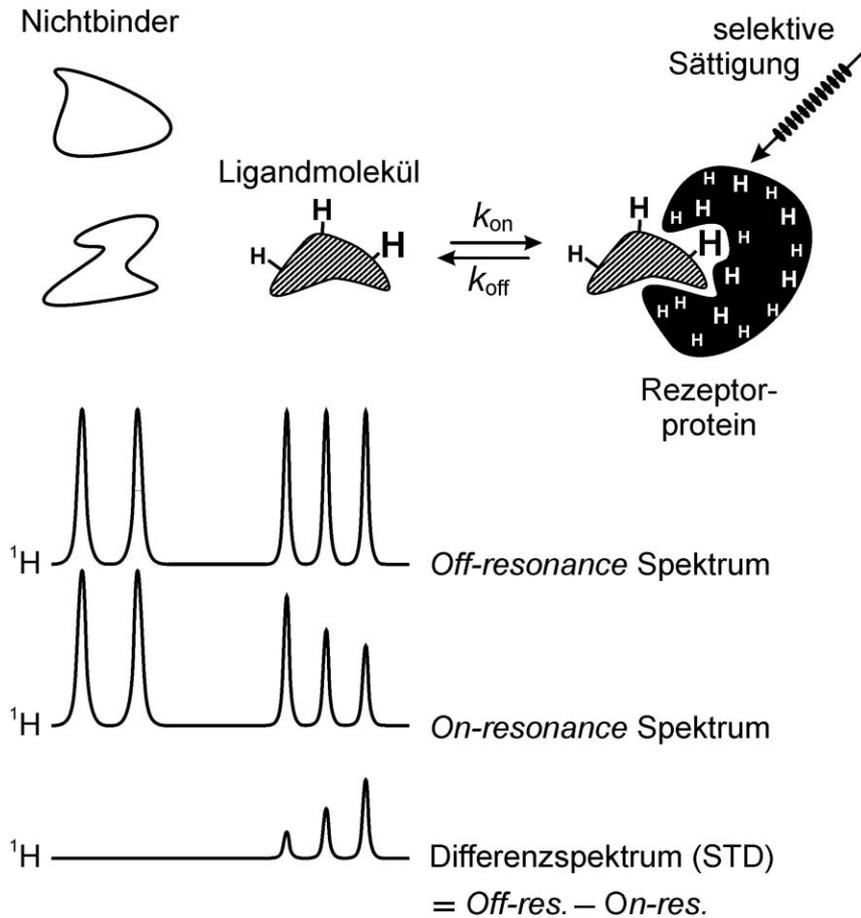


Abbildung 13 STD-NMR-Spektroskopie mit einem löslichen Lektin und einer Substanzbibliothek. Durch Einstrahlung eines selektiven *On-resonance*-Hochfrequenzimpulses auf die Proteinresonanzen wird Sättigung über intermolekulare Spindiffusion auf den bindenden Liganden übertragen. Seine Signale zeigen im *On-resonance*-Spektrum daher abgeschwächte Intensität. Im Differenzspektrum erscheinen nur die Signale des Liganden. Ligandprotonen mit direktem Kontakt zum Protein werden stärker gesättigt und zeigen größere STD-Signale als Protonen, die indirekte Sättigung durch Spindiffusion innerhalb des Liganden vermittelt bekommen. Die *Off-resonance*-Einstrahlung erfolgt z. B. bei 80 ppm, wo keine Proteinprotonen gesättigt werden.

Die Voraussetzung für STD-NMR-Spektroskopie ist die selektive Sättigung des Rezeptorproteins. Starke dipolare Kopplungen und schnelle T_2 -Relaxation führen dazu, dass Proteine im ^1H -NMR-Spektrum eine Hüllkurve aus sehr breiten Resonanzen besitzen, deren Ausläufer weit außerhalb des normalen spektralen Bereichs von 0 – 10 ppm liegen. Einstrahlung eines selektiven *On-resonance*-Hochfrequenzimpulses beispielsweise bei – 1 ppm oder bei 12 ppm führt zu einer selektiven Sättigung der Proteinresonanzen (Siehe Abbildung 13 oben). Dieser Prozess wird stark durch Spindiffusion begünstigt, die ab einer Molekülgröße von ca. 10 kDa sehr effektiv wird (*spindiffusion limit*). Die Ursache für DD-Wechselwirkungen und Spindiffusion ist die lange Umorientierungszeit τ_C der Makromoleküle.

Die selektive Sättigung wird auch durch Anisotropieeffekte in starren Proteindomänen begünstigt, die extreme chemische Verschiebungen hervorrufen und zu einer weiteren Ver-

breiterung der Proteinhüllkurve führen. Die Signale der niedermolekularen Verbindungen in der Bibliothek werden nicht gesättigt, sofern sie ein bestimmtes Molekulargewicht nicht überschreiten und keine Spindiffusion aufweisen.

Meist wird zur Sättigung eine Kaskade von Gauss-Impulsen mit einer jeweiligen Dauer von 50 ms verwendet; dies entspricht einer Halbwertsbreite der Anregung von 30 – 50 Hz. Die gesamte Länge der Gauss-Kaskade beträgt 1 – 2 s wobei schon nach 50 – 200 ms die Sättigung durch Spindiffusion über alle Proteinresonanzen verteilt worden ist. Die Effektivität der Spindiffusion beruht auf der mehrmaligen Weitergabe von Magnetisierung durch Kreuzrelaxation über ein oder mehrere Protonen hinweg. Die Gleichverteilung der Magnetisierung durch Spindiffusion erfolgt umso schneller, je größer das Protein ist.

Über intermolekulare Spindiffusion wird nun auch Sättigung auf den gebundenen Liganden übertragen und kann im freien Zustand nach der Dissoziation beobachtet werden. Der Sättigungseffekt zeigt sich im *On-resonance*-Spektrum in Form von abgeschwächter Intensität der Ligandresonanzen. Im *Off-resonance*-Spektrum mit einer Einstrahlung z. B. bei 80 ppm werden keine Proteinprotonen gesättigt und alle Ligandintensitäten bleiben unverändert. Durch Subtraktion des *On-resonance*-Spektrums enthält das Differenzspektrum nur die Signale des Liganden (Siehe Abbildung 13 unten). Die *Off-resonance*-Einstrahlung unterbindet Subtraktionsartefakte durch Temperatureffekte in der NMR-Probe oder in der Spektrometerelektronik

Ligandprotonen mit direktem Kontakt zum Protein werden stärker gesättigt und zeigen größere STD-Signale als Protonen, die Sättigung durch Spindiffusion innerhalb des Liganden indirekt vermittelt bekommen.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ Die Analyse der STD-Intensitäten individueller Protonen ermöglicht die Charakterisierung des Bindungsepitopes beim Liganden und erlaubt die Lokalisierung pharmakophorer Gruppen bei Leitstrukturen (*group epitope mapping*, GEM). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen bestätigte M. Mayer z. B. durch STD-NMR-Experimente mit dem Lektin RCA₁₂₀, dass die Protonen H2, H3 und H4 des Liganden Methyl-β-D-galactopyranosid in engem Kontakt zum Lektin stehen und für die Bindung essenziell sind. Das STD-NMR-Verfahren kann auch bei immobilisierten Rezeptorproteinen und bei halbfesten NMR-Proben angewendet werden. Als Modell für ein heterogenes Rezeptor-Ligand-System wurde Weizenkeimagglutinin (*Wheat germ agglutinin*, WGA) kovalent an poröse Glaspartikel (*controlled-pore glass*, CPG) gekuppelt und unter HRMAS-Bedingungen mit STD-NMR untersucht.¹⁴⁸ In einer Mischung mit sieben verschiedenen Mono- und Oligosacchariden zeigt nur das Disaccharid Chitobiose Bindungsaktivität im STD-NMR-Spektrum. Die Bindungsspezifität von WGA zu Chitobiose ist gut untersucht und dieses Ergebnis steht in vollem Einklang zur Literatur.

Die gute Empfindlichkeit der STD-NMR-Methode beruht generell auf einem Verstärkungseffekt durch chemischen Austausch. Würde jede Rezeptorbindungsstelle jeweils nur genau ein Ligandmolekül sättigen, erhielte man eine hypothetische, vielfach kleinere

STD-Intensität. Bei ausreichend schneller Dissoziation und genügendem Ligandüberschuss können jedoch in der Lösung vielfach mehr gesättigte Ligandmoleküle vorliegen als Rezeptorbindungsstellen vorhanden sind. Durch T_1 -Relaxation klingt die Sättigung des Liganden in der Lösung relativ langsam wieder ab. Die Intensität des STD-Effekts, der für ein bestimmtes Proton beobachtet wird, hängt deshalb von mehreren Parametern ab. Einige lassen sich durch die Aufnahmebedingungen bzw. die Probenzusammensetzung beeinflussen, während andere sich aus der Kinetik und Thermodynamik der Ligand-Protein-Interaktion und aus den Relaxationszeiten der beteiligten Protonen ergeben.

Die Assoziation des niedermolekularen Liganden L mit dem großen Rezeptorprotein P kann als bimolekulare Reaktion behandelt werden. Dabei wird eine Bindungsstelle je Rezeptormolekül zugrundegelegt (*one-site binding*).



In dieser Reaktionsgleichung sind k_{on} und k_{off} die Geschwindigkeitskonstanten für Bildung und Zerfall des Komplexes PL. Das Massenwirkungsgesetz für die Dissoziationsreaktion enthält die Gleichgewichtskonstante K_D . Außerdem ist in der folgenden Gleichung der Bezug zu den kinetischen Größen k_{on} und k_{off} gegeben.

$$K_D = \frac{[P] \cdot [L]}{[PL]} = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} \quad (2)$$

Die Konzentrationen für Protein [P], Ligand [L] und Protein-Ligand-Komplex [PL] sind jeweils Gleichgewichtskonzentrationen. Die Assoziation ist überwiegend diffusionskontrolliert und ihre Geschwindigkeit k_{on} ist deshalb im Bereich von $10^6 - 10^9 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$. Wenn allerdings eine konformationelle Umorientierung im Rezeptor oder im Ligand während der Assoziation auftritt, wird oft eine drastisch kleinere Assoziationsgeschwindigkeit beobachtet. Bei sehr kleinen Ligandmolekülen hingegen ist die Diffusion und damit die Assoziation deutlich schneller. Für unterschiedliche Ligand-Protein-Systeme variiert k_{on} zwischen $10^4 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ und $10^{10} \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$, und typische Werte für die Dissoziationskonstante K_D liegen im Bereich von 1 nM bis 1 mM. Diese Zahlen können in Gleichung (2) eingesetzt werden, und man erhält als Abschätzung für die Dissoziationsgeschwindigkeit k_{off} Werte zwischen 10^{-5} s^{-1} und 10^7 s^{-1} . Für den oben erwähnten Verstärkungseffekt und eine effektive Beobachtung von STD-Effekten muss die Dissoziationsgeschwindigkeit viel größer als die Relaxationsgeschwindigkeit $1/T_1$ sein, die typischerweise $1 - 10 \text{ s}^{-1}$ beträgt. Für Liganden mit Dissoziationskonstanten K_D im niedrigen nanomolaren Bereich ist diese Bedingung eventuell

nicht mehr erfüllt, genügender Durchsatz an Ligandmolekülen (*turnover*) wird nicht erreicht, und die Intensität der STD-Effekte ist kaum noch beobachtbar.

Neben der absoluten STD-Intensität ist für die Auswertung der Messdaten der relative STD-Effekt im Vergleich zu einem Referenzspektrum wichtig. Er ist definiert als der Quotient aus der Signalintensität im STD-Spektrum und der Intensität des jeweils korrespondierenden Signals im Referenzspektrum. Dieses Experiment wird jeweils mit identischen Akquisitionsparametern, aber ohne Differenzbildung und ohne Sättigung aufgenommen. Seine Scanzahl soll für eine direkte Vergleichbarkeit der Spektren halb so groß wie die Gesamtzahl der Scans beim STD-Experiment sein und entspricht dann der Zahl der *On-Resonance*-Scans.

Zur Quantifizierung des Durchsatzes an Ligandmolekülen dient der sogenannten STD-Amplifikationsfaktor.

$$\text{STD - Amplifikation Faktor} = \frac{I_0 - I_{\text{sat}}}{I_0} \cdot \frac{[\text{L}]_{\text{total}}}{[\text{P}]_{\text{total}}} \quad (3)$$

Es sind:

I_0 \equiv Signalintensität im NMR-Spektrum ohne Sättigung des Proteins.

I_{sat} \equiv Signalintensität im NMR-Spektrum mit Sättigung des Proteins.

$I_0 - I_{\text{sat}}$ \equiv Signalintensität im STD-NMR-Spektrum (Differenzspektrum).

$[\text{L}]_{\text{total}}$ \equiv Anfangs- oder Gesamtkonzentration an Ligand.

$[\text{P}]_{\text{total}}$ \equiv Anfangs- oder Gesamtkonzentration an Protein.

Der STD-Amplifikationsfaktor ist das Produkt aus dem relativen, prozentualen STD-Effekt und Ligandüberschuss $[\text{L}]_{\text{total}} / [\text{P}]_{\text{total}}$. Als ein absolutes Maß für die STD-Intensität ohne eine starke Abhängigkeit vom Ligandüberschuss und von der Proteinkonzentration erlaubt er die Auswertung von Titrations. Außerdem können verschiedene Rezeptor-Ligand-Systeme hinsichtlich ihrer Sättigungstransfereffizienz verglichen werden.

In dieser Arbeit wurden Dissoziationskonstanten näherungsweise durch Scatchard-Analyse ermittelt.¹⁴⁹ Dafür wird zunächst der Anteil r an gebundenem Ligand bezogen auf die Gesamtzahl der Bindungsstellen benötigt und über die Konzentrationen von freiem Protein und Protein-Ligand-Komplex ausgedrückt.

$$r = \frac{[L]_{\text{bound}}}{[P]_{\text{total}}} = \frac{[PL]}{[P]+[PL]} \quad (4)$$

Es sind:

r \equiv Anteil an gebundenem Ligand im Gleichgewicht bezogen auf die Gesamtzahl der Bindungsstellen.

$[L]_{\text{bound}}$ \equiv Die Konzentration des gebundenen Liganden unter Annahme einer homogenen Verteilung auf das Gesamtvolumen der Probe.

Gleichung (4) enthält die Zusammenhänge $[L]_{\text{bound}} = [PL]$ und $[P]_{\text{total}} = [PL] + [P]$. Durch Einsetzen von Gleichung (2) in Gleichung (4) folgt Gleichung (5), welche die Belegung der Bindungsstellen am Protein bei steigender Ligandkonzentration beschreibt. Die graphische Darstellung des Quotienten r in Abhängigkeit von der Ligandkonzentration $[L]$ entspricht einer typischen Isotherme für eine Assoziationsreaktion und zeigt für hohe Ligandkonzentrationen ein Sättigungsverhalten mit abnehmender Steigung.

$$r = \frac{[L]}{K_D + [L]} \quad (5)$$

Diese Funktion ist für eine endliche Anzahl energetisch identischer Bindungsstellen charakteristisch (*One-site binding model*). Bei halbmaximaler Belegung der Bindungsstellen ($r = 0.5$) gilt $[L] = K_D$. Durch Extrapolation der Sättigungskurve auf eine maximale Assayantwort r kann also im Graphen am Schnittpunkt mit $r = 0.5$ die Dissoziationskonstante K_D abgeschätzt werden. Für eine simple Bestimmung von K_D kann Gleichung (5) auch nach Scatchard in die Geradengleichung (6) umgeformt werden.

$$\frac{r}{[L]} = \frac{1}{K_D} - \frac{r}{K_D} \quad (6)$$

Im Falle von n Bindungsstellen an einem multimeren oder multivalenten Rezeptorprotein muss die Zahl 1 durch n ersetzt werden. Die Auftragung des Quotienten $r/[L]$ gegen die Rezeptorbelegung r für verschiedene Konzentrationen liefert einen Scatchard-Graphen. Die durch lineare Regression ermittelte Steigung der Geraden beträgt $-1/K_D$. Der Nachteil der Methode ist allerdings eine Verzerrung der Fehlerbreite über den Verlauf des Graphen. Für die Analyse einer Titrationsreihe kann jede Messgröße aufgetragen werden, die mit der

Belegung r linear korreliert ist. Neben Beispielen wie der Strahlungs-dosis bei einem Radio-assay oder der *resonance units* aus einer SPR-Messung gilt dies näherungsweise auch für den STD-Amplifikationsfaktor beim STD-Experiment. Allerdings steigt dieser durch den Effekt des *turn over* auch bei praktisch vollständiger Rezeptorbelegung noch weiter an, wenn man den Überschuss an Ligand erhöht. Das spätere Erreichen eines Plateaus führt bei dieser Näherung folglich zu Dissoziationskonstanten, die gegenüber den tatsächlichen Werten zu hoch liegen.

Andere Methoden zur Behandlung und Analyse von STD-NMR-Daten berücksichtigen, dass die Intensität des STD-Effekts das Gleichgewicht von Sättigungsfluss zum Liganden und Relaxation repräsentiert. Gleichung 7 beschreibt die Veränderung der Konzentration an noch nicht gesättigtem Ligand $[L]_{\text{unsat}}$ mit der Sättigungszeit t_{sat} in einem rekursiven Ansatz.¹⁵⁰ Dafür gilt die Randbedingung $[L]_{\text{unsat}}(0) = [L]_{\text{total}}$.

$$[L]_{\text{unsat}}(t + 1) = [L]_{\text{unsat}}(t) - \frac{[L]_{\text{unsat}}(t) \cdot [PL]}{[L]_{\text{total}}} \cdot \text{Sat} + \left[[L]_{\text{total}} - [L]_{\text{unsat}}(t) \right] \cdot (1 - \text{Rel}) \quad (7)$$

In Gleichung 7 sind folgende Ausdrücke und Größen verwendet:

$$[PL] = \frac{1}{2} \cdot \left[K_D + [L]_{\text{total}} + [P]_{\text{total}} - \sqrt{K_D^2 + 2 \cdot K_D \cdot [L]_{\text{total}} + 2 \cdot K_D \cdot [P]_{\text{total}} + [L]_{\text{total}}^2 - 2 \cdot [P]_{\text{total}} \cdot [L]_{\text{total}} + [P]_{\text{total}}^2} \right]$$

$$K_D = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}}$$

$$\text{Sat} = 1 - e^{-\frac{R_{\text{sat}} \cdot \ln 2}{k_{\text{off}}}}$$

$$\text{Rel} = e^{-\frac{R_1 \cdot \ln 2}{k_{\text{off}}}}$$

Es sind:

$[L]_{\text{unsat}}(t)$ \equiv Konzentration an ungesättigtem Ligand zur Sättigungszeit t .

$[L]_{\text{unsat}}(t+1)$ \equiv Entsprechend zur inkrementierten Sättigungszeit $(t+1)$.

R_{sat} \equiv Sättigungsrate.

R_1 \equiv Longitudinale Relaxationsrate.

In diesem Ansatz wird der Aufbau der Sättigung rechnerisch in Zeitintervalle unterteilt, die der mittleren Aufenthaltsdauer des Liganden in der Bindungstasche ($\ln 2 / k_{\text{off}}$) entsprechen. Die Menge sättigbarer Liganden ergibt sich als $[PL]$ und hängt somit von K_D und den Konzentrationen an Ligand und Protein ab. Direkt vor der Sättigung des Proteins zum Zeitpunkt $t_{\text{sat}} = 0$ liegen alle Ligandmoleküle ungesättigt vor. Mit Beginn der Einstrahlung auf das Protein wird Sättigung auf Liganden übertragen, die sich in der Bindungstasche des Proteins befinden. Die Sättigung strebt mit der Zeitkonstante $1/R_{\text{sat}}$ ihrem Maximalwert zu, wobei dies umso schneller geschieht, je stärker die dipolare Kopplung zwischen Protein- und Ligandprotonen ist. Nach Ablauf eines Zeitintervalls verlassen die gesättigten Liganden die Bindungstasche. Diese wird dann wieder mit Ligandmolekülen besetzt. Gleichung (7) berücksichtigt dabei durch den Faktor $[L]_{\text{unsat}}(t) / [L]_{\text{total}}$, dass zum Zeitpunkt des Sättigungsprozesses schon Ligandmoleküle gesättigt oder parziell gesättigt vorliegen und nicht mehr so effizient am Sättigungstransfer teilnehmen können wie ungesättigte Moleküle. Durch Erhöhung des Ligandüberschusses gegenüber dem Protein kann man die Wahrscheinlichkeit senken, dass ein Ligandmolekül während einer Sättigungszeit mehrfach in die Bindungstasche gelangt, und erreicht so die maximale Empfindlichkeit des STD-NMR-Experiments. Einmal gesättigte Ligandmoleküle streben wieder ihrer Gleichgewichtsmagnetisierung zu, wenn sie nicht mehr an das Protein gebunden sind. Dieser Prozess verläuft schneller bei einer großen Relaxationsrate R_1 (d. h. kurzem T_1). Eine rekursive Analyse von Gleichung (7) führt zu Gleichung (8), welche die Abhängigkeit des STD-Effekts von den kinetischen Größen der Bindungsreaktion und den NMR-Relaxationsparametern beschreibt.

$$[L]_{\text{sat}} = [L]_{\text{total}} \cdot \left[1 - \frac{- \left[\frac{- [PL] \cdot \text{Sat} + [L]_{\text{total}} \cdot \text{Rel}}{[L]_{\text{total}}} \right]^{\frac{t_{\text{sat}} \cdot k_{\text{off}}}{\ln 2}} \cdot [PL] \cdot \text{Sat} + [L]_{\text{total}} \cdot (\text{Rel} - 1)}{- [PL] \cdot \text{Sat} + [L]_{\text{total}} \cdot (\text{Rel} - 1)} \right] \quad (8)$$

Durch Anpassung dieser Gleichung an die STD-Amplifikationsfaktoren, die bei verschiedenen Ligandkonzentrationen gemessen werden, lässt sich die Gleichgewichtskonstante der Komplexbildungsreaktion gewinnen.

Wegen der vielen beteiligten Protein- und Ligandprotonen setzen sich sowohl die T_1 -Relaxation als auch die Sättigungsrate R_{sat} aus verschiedenen Kreuzrelaxationspfaden zusammen.¹⁵¹ Diese Prozesse beeinflussen die Intensität des STD-Effekts für verschiedene Protonen. Ein Proton mit einer langen T_1 -Zeit kann mehr Sättigung akkumulieren als eines, das sehr schnell relaxiert. Dieser Effekt nimmt mit steigender Sättigungszeit zu, so dass ein *epitope mapping* anhand von STD-Spektren mit langer Sättigungszeit unter ungünstigen

Umständen, d. h. sehr unterschiedlichen T_1 -Zeiten der betrachteten Protonen, nicht die wahren Abstände der Ligandprotonen zur Bindungstasche widerspiegelt. Je kürzer die Sättigungszeit, desto weniger fallen die Unterschiede der T_1 -Zeiten ins Gewicht. Ein zuverlässigeres Maß für die Nähe eines Ligandprotons zur Bindungstasche des Rezeptors ist daher eine zur NOE-Aufbaurate analoge STD-Aufbaurate. Hierzu werden mehrere STD-NMR Spektren mit verschiedenen Sättigungszeiten t_{sat} aufgenommen und die erreichten STD-Effekte gegen t_{sat} aufgetragen. Die extrapolierte Sättigungsrate bei $t_{\text{sat}} = 0$ entspricht der initialen Steigung der Kurve. Sie ist frei vom Beitrag der Relaxationsrate und damit das beste Maß für die Nähe des entsprechenden Ligandprotons zum Protein. Der Erfolg dieses Ansatzes hängt jedoch entscheidend davon ab, ob man Spektren ausreichender Qualität bei kurzen Sättigungszeiten erhält, bei denen nur kleine STD-Effekte auftreten. Unterschiede in der Sättigung von Ligandprotonen, die sich in gleichem Abstand von der Proteinoberfläche befinden, können sich außerdem dadurch ergeben, dass die entsprechenden Bereiche des Proteins verschieden stark durch Spindiffusion mit dem übrigen Protein verbunden sind. Befinden sich in einem Teil der Bindungstasche weniger oder isolierte Proteinprotonen, erhalten Ligandprotonen, die mit ihnen interagieren, weniger Sättigung als solche, die mit Bereichen hoher Protonendichte des Proteins wechselwirken.

2. Problemstellung

Membranständige Rezeptorproteine bilden die wichtigste Gruppe pharmakologischer Ziele. Besonders die Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) bietet der heutigen Medizinalchemie eine große biologische Vielfalt. Ansatzpunkte für Neuentwicklungen sind z. B. die beiden Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5, die als Korezeptoren bei der HIV-Infektion eine Schlüsselrolle spielen.

Die Leitstrukturfindung und die Optimierung von Wirkstoffkandidaten für Membranproteine ist stark erschwert, weil die dreidimensionale Proteinstruktur oft unbekannt ist. Deshalb sind Informationen über Bindungsmodus und Konformation eines Liganden nicht über Simulationsverfahren wie *docking* zugänglich. Nur für sehr wenige Membranproteine existieren Strukturdaten zu Rezeptor-Ligand-Komplexen. Viele Bindungsassays, auch heterogene Verfahren wie ELISA und SPR, gehen oft von löslichen *target*-Proteinen aus und können nicht ohne weiteres auf Rezeptoren in Lipidmembranen angewandt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Adaption der Sättigungstransferdifferenz-NMR-Spektroskopie (STD-NMR) an membrandurchspannende Rezeptorproteine. Die Möglichkeiten der NMR-gestützten Leitstruktursuche bezüglich G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCR) sollen dadurch erweitert werden. Die Methode ist von der Aufklärung der 3D-Struktur unabhängig.

Die Wahl fiel auf das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ als erstes Membranprotein zur Anwendung von STD-NMR-Spektroskopie. Es steht in nativer Form auf humanen Thrombozyten zur Verfügung und ist aber auch gereinigt kommerziell erhältlich. Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ vermittelt die Thrombozytenaggregation und dient der Blutgerinnung.

Nach der Präparation von NMR-Proben mit integrinpräsentierenden, künstlichen Liposomen sollten verschiedene, peptidische Liganden unterschiedlicher Bindungsaffinität und Bindungskinetik auf ihr Bindungsverhalten gegenüber dem Integrin unter Anwendung der STD-NMR-Spektroskopie untersucht werden. Dafür eignen sich viele der bereits gut untersuchten Peptide mit dem Aminosäuremotiv Arg-Gly-Asp (RGD) und deren Analoga. Darüberhinaus sollte das bereits bekannte STD-*epitope mapping*-Verfahren zur Identifikation der pharmakophoren Gruppen eines Ligandmoleküls auf das liposomenrekonstituierte Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ übertragen werden. Ein weiterer zentraler Aspekt dieser Arbeit sind die NMR-Experimente mit nativen, humanen Thrombozyten in deuteriertem Puffer aber auch in dem ursprünglichen Citratplasma des Zellkonzentrates. Durch STD-NMR-Messungen sollte die spezifische Bindung von RGD-Peptiden an das in der Thrombozytenmembran exprimierte Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ nachgewiesen werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Liposomenpräparation

Zugunsten einer besseren Stabilität und Standardisierbarkeit wurden keine natürlichen Lipidgemische benutzt. Eine Kombination der häufig eingesetzten, synthetischen Phospholipide DMPC und DMPG ist wegen der Umwandlungstemperatur von $T_C = 23\text{ °C}$ sehr günstig. Das anionische Lipid DMPG ruft eine Oberflächenladung der Lipiddoppelschicht hervor und soll die Stabilität der Vesikel und der eingebetteten Proteinmoleküle erhöhen.

Zur Liposomenpräparation wurde das Verfahren der Detergenzabreicherung angewendet. Die Adsorption der Detergenzmoleküle an poröse Polystyrolmatrices erlaubt die Arbeit mit kleinen Volumina. Diese Methode macht Reinigungsschritte wie Dialyse oder Größenausschlußchromatographie unnötig und ist daher für kleine Proteinmengen in deuterierten Puffern besonders geeignet.

3.1.1. Der Anteil an DMPG im Lipidgemisch

Bei den Vorversuchen zur Liposomenpräparation wurde ein molares Verhältnis von DMPC zu DMPG von 50:50 eingehalten, wie es bei Engel *et al.* beschrieben wurde.⁶⁴ Während der Hydratisierung und Solubilisierung des Lipidfilmes mit Puffer unter Ultraschalleinwirkung trat regelmäßig eine deutliche Trübung auf. Nach Adsorption des Triton X-100 durch Bio-Beads bildeten sich über Nacht Flocken und eventuell ein Niederschlag. Vergleichbare Liposomenpräparationen, die entweder kein Calciumchlorid im Puffer oder kein DMPG in der Lipidmischung enthielten, zeigten nach der Zugabe der Bio-Beads lediglich eine leicht opalisierende Trübung. Der Niederschlag trat auch nach einer Woche nicht auf. Dies deutet auf die Bildung eines Niederschlages aus DMPG und Ca^{2+} -Ionen hin. Nach allen drei Varianten der Präparation wurde der Lipidgehalt der homogenen Liposomensuspension durch $^1\text{H-NMR}$ bestimmt. Jeweils $50\ \mu\text{L}$ der wässrigen Mischung wurden in Methanol- d_4 gegeben. Aus den NMR-Integralen der Lipidsignale und eines Stoffmengenstandards konnte eine Lipidwiederfindung bezogen auf die Einwaage ermittelt werden, die jeweils über 90 % lag. Große Verluste an Lipiden durch Niederschlag oder Adsorption auf den Gefäßwänden konnten dadurch als generelle Fehlerquelle ausgeschlossen werden. Um die Lipidzusammensetzung des flockigen Niederschlages zu klären, wurde dieser durch Zentrifugation für drei Minuten bei 14000 upm sedimentiert. Der klare Überstand wurde auf Lipidgesamtgehalt und Lipidzusammensetzung untersucht. Darin erreichte die Lipidwiederfindung bezogen auf die Einwaage 62 – 77 %. Der molare Anteil an DMPG im Überstand betrug etwa 34 % und nicht 50 % wie bei der Einwaage. Auch diese

Ergebnisse zeigen, dass DMPG teilweise ausfällt. Deshalb wurde bei allen folgenden Liposomenpräparationen der molare Anteil an DMPG auf 10 % verringert. Zusätzlich wurde die Solubilisierung unter Kühlung auf 4 – 6 °C durchgeführt. Danach wurde unter weiterer Kühlung die Calciumchloridstammlösung bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt. Die beobachtete leichte Opaleszenz der so erhaltenen Liposomensuspension blieb für etwa einen Monat stabil. Auch eine Konzentration der Liposomen durch Zentrifugation im Ultrafiltrationsröhrchen rief keinen Niederschlag hervor. Eine Flockenbildung setzte erst nach über zwei Monaten ein.

3.1.2. Rekonstitution des Integrins $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ in Liposomen

Die Präparation von Liposomen mit eingebettetem Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ erfolgte nach den modifizierten Vorschriften von Gerritsen *et al.*⁶³ und Müller *et al.*⁶⁴ aber mit einem molaren Verhältnis der Lipide DMPC/DMPG von 90:10. Zuerst wurden 3.39 μmol DMPC und 0.348 μmol DMPG als dünner Film auf die Gefäßwand aufgebracht. Nach der Rehydratisierung der Lipide in einem deuterierten Tris-Puffer mit 0.9 g/L Triton X-100 in D_2O wird das Solubilisat mit 1 mg humanem Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ in 500 μL Tris-Puffer mit etwa 2 g/L Triton X-100 vermischt. Die Abnahme des Detergenzgehaltes durch Zugabe eines Adsorbens (Bio-Beads SM2) führt zur spontanen Bildung von Liposomen und zur Integration des Membranrezeptors. Der Lipidgehalt der Liposomensuspension betrug etwa 6.4 mM. Die verschiedenen Autoren fanden einen mittleren Durchmesser der Lipidvesikel von 200 nm wobei die Proteinwiederfindung nur etwa 50 % betrug. Das restliche Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ wurde nicht in die Liposomen eingebettet sondern ging durch Aggregation verloren. Ein Liposom trägt durchschnittlich 200 Integrinmoleküle, die in der Lipiddoppelschicht statistisch orientiert sind. Daher ist nur die Hälfte der Rezeptormoleküle für Liganden in der freien Lösung zugänglich. Aufgrund dieser Angaben wurde der Anteil der Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Bindungsstellen in der Liposomenpräparation auf 25 % der ursprünglich eingesetzten Proteinmenge geschätzt. Bei einer Masse von 1 mg Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ und einem Molgewicht von 233 kDa (4 nmol) stehen also maximal 1 nmol Bindungsstellen in der NMR-Probe auf der Vesikelaußenseite zur Verfügung.

3.2. NMR-Experimente mit Liposomen

Wegen des geringen Dichteunterschiedes zum umgebenden Medium sedimentieren Liposomen bei $1 \times g$ nicht. Daher kann die Probe bei NMR-Messungen als stabil und homogen behandelt werden. Intra- und extravasikulär gelöste, kleine Moleküle besitzen ihre volle, isotrope Beweglichkeit und können ungestört NMR-spektroskopisch untersucht werden.

Bei einem typischen Durchmesser von 200 nm besteht ein unilamellares Vesikel aus

2×10^5 Lipidmolekülen mit einer Gesamtmasse von über 130 MDa ohne das enthaltene Wasser. Unterhalb von T_C sind die Lipidmoleküle streng parallel ausgerichtet und besitzen keine laterale Beweglichkeit. In jedem Fall können diskrete Protonensignale der Alkylketten in der Doppelschicht nicht beobachtet werden. Die Beweglichkeit in der hydrophilen Kopfgruppe ist hingegen viel größer. Enthält dieser Molekülteil flexible, gut solvatisierte Strukturen wie Oligosaccharide oder Polyethylenglycol, so können in $^1\text{H-NMR}$ -Spektren die Signale eventuell aufgelöst werden.

Die bei den STD-NMR-Experimenten durch einen HF-Impuls erzielte Sättigung wirkt sowohl auf die Hüllkurve der Lipide als auch auf die Proteinsignale. Besonders die Transmembransegmente aber auch damit starr verbundene Domänen weisen aufgrund ihrer sehr großen scheinbaren Molmasse eine sehr effiziente Spindiffusion auf. Die Anwendung verschiedener Einstrahlfrequenzen des Sättigungsimpulses wie z. B. 12 ppm, 0 ppm oder -2 ppm zeigte nur relativ geringe Unterschiede in der Sättigungsintensität. Sehr häufig wurde -2 ppm als Einstrahlfrequenz gewählt, da hier die unerwünschte, unselektive Sättigung der Ligandpeptide besonders gering war.

3.2.1. NMR-Hüllkurve der Liposomen

Um die NMR-Linienform niedermolekularer Verbindungen in einer Liposomensuspension zu untersuchen, wurde eine Liposomenpräparation ohne Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ aus $3.39 \mu\text{mol}$ DMPC und $0.348 \mu\text{mol}$ DMPG verwendet. Das Lipidverhältnis DMPC/DMPG ist daher etwa 90:10. Die Vesikel wurden in $580 \mu\text{L}$ deuteriertem LUV-NMR-Puffer konzentriert, der neben 10 mM Natriumchlorid, 10 mM Tris- d_{11} und 6 mM Natriumazid noch 1 mM Calciumchlorid enthält. Der Lipidgehalt der Liposomensuspension betrug etwa 6.4 mM. Der NMR-Probe wurden die Peptide RGD und cyclo(RGDfV) bis zu einer Endkonzentration von $72 \mu\text{M}$ bzw. $69 \mu\text{M}$ zugegeben. Mit dieser Blindprobe zur Erprobung der NMR-Parameter wurden Spektren bei 293 K aufgenommen.

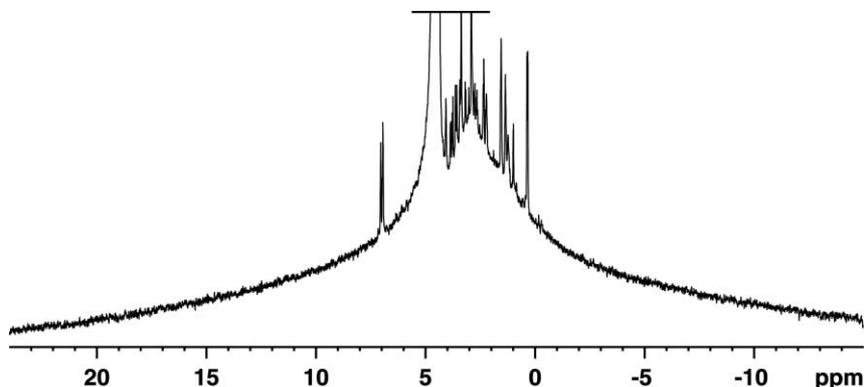


Abbildung 14 1D- $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von RGD ($72 \mu\text{M}$) und cyclo(RGDfV) ($69 \mu\text{M}$) mit Liposomen ohne Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ in LUV-NMR-Puffer bei 293 K und einer Spektrenbreite von 40 ppm.

Im 1D-¹H-NMR-Spektrum in Abbildung 14 sind außer den Peptidsignalen die Resonanzen des HDO und vom Tris-Puffer zu sehen. Bei 3.1 ppm befindet sich das Zentrum einer sehr breiten NMR-Hüllkurve, die durch Liposomen hervorgerufen wird. Trotz einer Spektrenbreite von 40 ppm zeigt das Spektrum den Fuß dieses breiten Signals nicht vollständig. Die Halbwertsbreite lässt sich jedoch grob abschätzen und beträgt über 3000 Hz. Es kann sich um HDO-Resonanzen geordneter oder assoziierter Wassermoleküle handeln. Mehrschichtig assoziierte Wassermoleküle liegen einerseits auf der Innen- und Außenseite unilamellarer Vesikel, aber auch zwischen den Lipiddoppelschichten multilamellarer Vesikel vor. In HRMAS-NMR-Experimenten haben Z. Zhou *et al.* die HDO-Resonanzen von interlamellarem Wasser in Suspensionen von DOPC- und MeDOPE-Vesikeln in deuteriertem Phosphatpuffer untersucht. Dabei war die Resonanz des assoziierten Wassers relativ zum freien Wasser 0.05 ppm bis 0.15 ppm hochfeld- oder tieffeldverschoben, abhängig vom verwendeten Lipid.¹⁵² Sowohl Betrag als auch Vorzeichen der Ladung an den polarisierten oder ionisierten Atomen der hydrophilen Kopfgruppe beeinflussen den Charakter der H-Brückenbindungen für die solvatisierenden HDO-Moleküle und damit die NMR-spektroskopische Verschiebung der beteiligten HDO-Protonen. Die Richtung der Verschiebung ist obendrein wegen Änderungen der magnetischen Suszeptibilität an Grenzflächen schwer vorhersagbar. Trotzdem ist die mit den DMPC/DMPG-Liposomen beobachtete Shiftdifferenz zwischen dem HDO-Signal bei 4.75 ppm und dem breiten Signal bei 3.10 ppm (Abbildung 14) untypisch groß und macht auch andere Ursachen für das breite Signal möglich. Dieses Signal kann also auch durch Protonen der Phospholipide hervorgerufen werden. Dabei kommen die Protonen im Glycerinrückgrat und in der Cholinkomponente in Frage (siehe Abbildung 1A), beispielsweise die, der Phosphatgruppe benachbarten, Methylenprotonen (-CH₂-O-PO₂-O-CH₂-). Auch die Protonen der N-Methylgruppen des Cholins mit einer chemischen Verschiebung von ca. 3.1 ppm können das breite Signal in Abbildung 14 hervorrufen. Sowohl geordnete Wassermoleküle als auch die polare Kopfgruppe in lamellar assoziierten Phospholipiden weisen gegenüber frei gelösten Molekülen eine stark verminderte molekulare Beweglichkeit auf. Wegen dipolarer Wechselwirkungen und der Feldinhomogenitäten an den Phasengrenzflächen sind die jeweiligen Resonanzen sehr breit. Die Protonen der hydrophoben Alkylketten der Fettsäuren relaxieren in der Lipiddoppelschicht sehr schnell und sind im Spektrum in Abbildung 14 nicht zu erkennen. Zur Unterdrückung der unerwünschten, breiten Signale wurden verschiedene Pulssequenzen und Parameter ausprobiert.

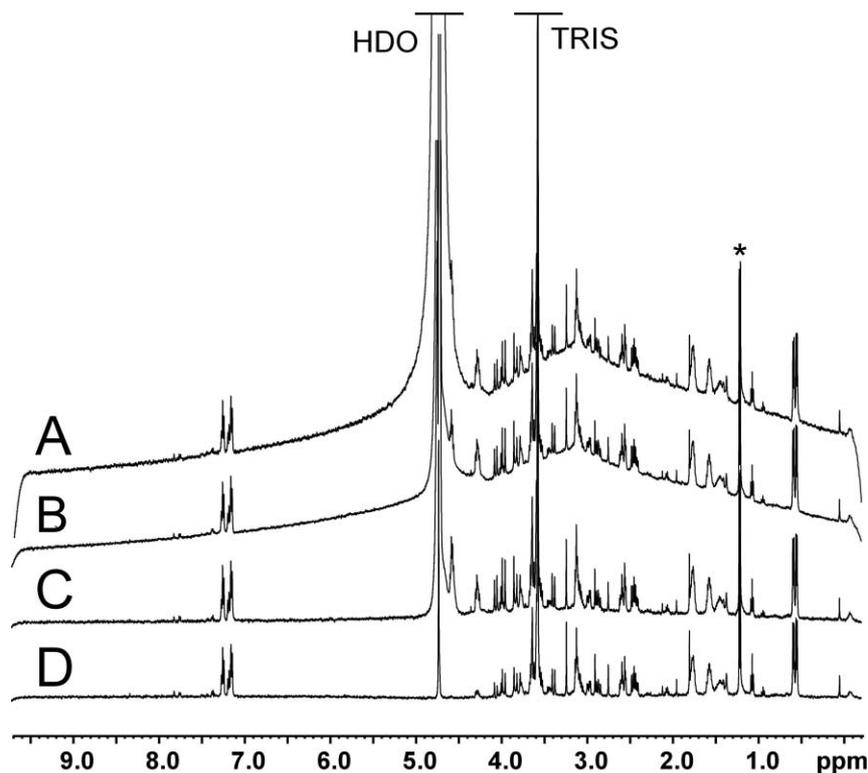


Abbildung 15 (A) Normales 1D-¹H-NMR-Spektrum von RGD (72 μM) und cyclo(RGDfV) (69 μM) mit Liposomen ohne Integrin α_{11b}β₃. Die NMR-Probe und die Parameter sind wie in Abbildung 14 aber die Spektrenbreite beträgt 10 ppm. Außer den Peptidsignalen sind die Resonanzen des HDO, vom Tris-Puffer und von einer Verunreinigung (*) zu sehen. (B) Wie A aber mit einer selektiven Vorsättigung (65 dB) des HDO-Signals. (C) Wie B aber zusätzlich mit T_{1ρ}-Filter (12 dB, 12 ms) zur Unterdrückung von Protonen mit kurzer T₂-Relaxationszeit angewendet. (D). Wie A aber mit zusätzlicher WATERGATE-Wasserunterdrückung mit einem 3-9-19 Impuls.

In Abbildung 15A ist zunächst das normale 1D-¹H-NMR-Spektrum der Probe wie in Abbildung 14 gezeigt, die Spektrenbreite beträgt allerdings nur 10 ppm. Wird während der Relaxationswartezeit ein Vorsättigungsimpuls mit einer Stärke von 65 dB und einer Dauer von 2 s auf die HDO-Resonanz eingestrahlt, so wird das breite Signal bei 3.1 ppm um ca. 18 % reduziert (siehe Abbildung 15B). Dieser Wert wurde durch Intensitätsvergleich der Peptidsignale und der Hüllkurve in beiden Spektren erhalten. Diese Beobachtung deutet auf einen schnellen Austausch der Protonen hin, welche die Hüllkurve hervorrufen.

Der bei der Wasserfrequenz eingestrahlte HF-Impuls verringert über Magnetisierungstransfer der erzielten Sättigung auch die Intensität der Signale unter der Hüllkurve. Dieser Effekt ist unabhängig davon zu beobachten, ob die breiten Resonanzen auf assoziierten HDO-Molekülen oder auf Lipidmolekülen beruhen. In Abbildung 15C wurde zusätzlich zur Vorsättigung ein T_{1ρ}-Filter (Spinlockimpuls 12 dB, 12 ms) zur Unterdrückung von Protonen mit kurzer T₂-Relaxationszeit (T_{1ρ}-Filter) angewendet (siehe Pulsprogramm *zgprsl.rm* im Anhang).¹⁵³ Dadurch wurde das breite Signal drastisch um etwa 86.6 % verringert. Die Verwendung eines längeren Spinlockimpulses von 20 ms oder 40 ms ergab eine

Unterdrückung des breiten Signals um 92.5 % bzw. um 95.0 % (Spektren nicht gezeigt). Ein längerer Spinlock als 12 ms ergibt also keine signifikant bessere Unterdrückung.

In Abbildung 15D ist ein Spektrum mit WATERGATE-Wasserunterdrückung mit einem 3-9-19-Impuls gezeigt, in welchem das breite Signal um 97.5 % verringert ist (siehe Pulsprogramm *p3919gp* im Anhang).^{154, 155} Das spektrale Profil des 3-9-19-Impulses zeigt nach der Fouriertransformation eine Breitbandinversion mit einer *On-Resonance*-Nullstelle. Das HDO-Signal erfährt also keine Kohärenzinversion. Durch die jeweils invertierte Empfängerphase werden nur invertierte Kohärenzen akkumuliert. Außerdem ist der 3-9-19-Impuls durch zwei Feldgradientenimpulse (PFG) gleicher Polarität und mit je 1 ms Dauer flankiert. Diese minimieren Phasenfehler, die auf unvollständiger Inversion beruhen. Von den mit dem ersten Gradientenimpuls dephasierten Kohärenzen werden nur diejenigen durch den zweiten Gradienten refokussiert, die tatsächlich selektiv invertiert worden sind. Das HDO-Signal im schmalen *On-Resonance*-Band wird daher durch die doppelte Dephasierung ausgelöscht.

Dieses Gradienten-Echo-Schema kann die Unterdrückung des breiten Liposomensignals hervorrufen, wenn sein 180-Grad-Impuls eine andere Länge aufweist, als die anderen Resonanzen im Spektrum. Andererseits könnten die Inversionsimpulse der WATERGATE-Sequenz, die auf die transversale Magnetisierung wirken, wie ein Spinlock die Dephasierung des breiten Signals begünstigen ($T_{1\rho}$ -Filter) und dieses unterdrücken.

Da der H₂O-Gehalt in der NMR-Probe kleiner als 1 % ist, können die Gradienten in der WATERGATE-Impulssequenz auch entfallen, ohne dass größere Probleme bei der Phasenkorrektur auftreten (siehe Pulsprogramm *p3919.rm* im Anhang). In den auf diese Weise aufgenommenen Spektren ist das breite Liposomensignal lediglich auf 64 % verringert (Spektren nicht gezeigt), weil das Gradientenechoschema nicht mehr zur Unterdrückung beiträgt. Eine Verlängerung des zusammengesetzten, selektiven Inversionsimpulses führt hingegen zu einer besseren Unterdrückung des breiten Liposomensignals. Die W5-WATERGATE-Sequenz verwendet ein Array aus insgesamt zehn Teilimpulsen zur selektiven Inversion und weist ein optimiertes Frequenzprofil mit einer geringeren Halbwertsbreite an der *On-Resonance*-Nullstelle auf (siehe Pulsprogramm *w5gp.rm* im Anhang).¹⁵⁶ Das Liposomensignal wird in diesem NMR-Experiment auf 98 % verringert (Spektren nicht gezeigt). Bezogen auf die Intensität im 3-9-19-WATERGATE Spektrum ist dies eine weitere Verbesserung um 20 %. Eine zweifache Anwendung der W5-Sequenz in einem doppelten Gradientenecho (DPFGSE) erzielt eine Unterdrückung des Liposomensignals um mehr als 99 %. Diese auch als *excitation sculpting* bezeichnete Impulssequenz enthält zwei selektive Inversionsblöcke, die jeweils von zwei Gradientenimpulsen flankiert werden: G1-S-G1-G2-S-G2 (siehe Pulsprogramm *zgw5esgp.rm* im Anhang).¹⁵⁷ Allerdings beträgt die Dauer der W5-WATERGATE-Sequenz zwischen Anregungsimpuls und FID bei einer Wartezeit von $\tau = 280 \mu\text{s}$ zwischen den Teilimpulsen des

Impulsarrays etwa 5.1 ms. Bei der W5-DPFGSE-Sequenz beträgt diese Zeitspanne sogar 10.1 ms. Gegenüber der 3-9-19-WATERGATE-Sequenz mit einer Dauer von nur 3.9 ms bedeutet das bei Resonanzen mit beschleunigter T_2 -Relaxation einen nennenswerten Intensitätsverlust. Diese Vergleiche zeigen, dass die Unterdrückung des breiten Liposomensignals am effektivsten durch die 3-9-19-WATERGATE-Sequenz erfolgen sollte, die einen guten Kompromiss darstellt.

Ob assoziiertes Wasser oder Lipidmoleküle die Ursache des breiten Signals darstellen, konnte nicht geklärt werden. Es wären dazu HRMAS-Experimente nötig, um eventuell vorhandene, schmalere Signale zu analysieren und die Konnektivität der jeweiligen Protonen mit 2D-TOCSY- und 2D-NOESY-Pulssequenzen zu bestimmen.

3.2.2. Cyclo(RGDfV)-Bindung und Titration mit cyclo(RGDfV)

Um die Ligandbindung an rekonstituiertes Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ in der Liposomenmembran zu untersuchen, wurden RGD-Peptide mit bekannter Bindungsaktivität und zwei nichtbindende Peptide ausgesucht. Unter den RGD-Peptiden nimmt cyclo(RGDfV) wegen der Ringspannung und der damit verbundenen, rigiden Konformation eine Sonderstellung ein. Darüberhinaus wird die Konformation des RGD-Segments durch das D-Phe deutlich beeinflusst.

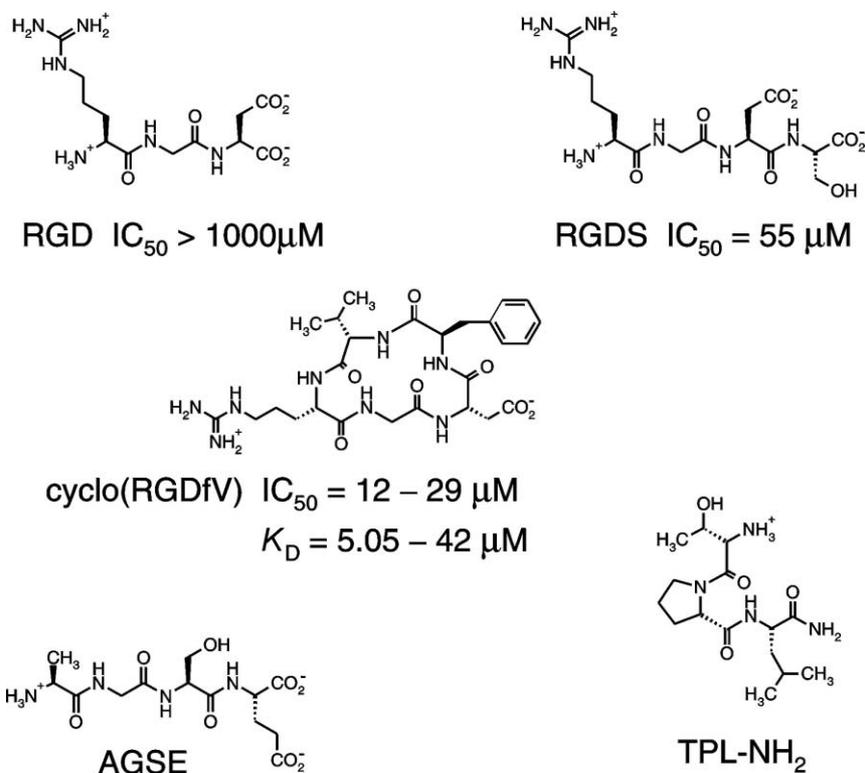


Abbildung 16 Strukturformeln der Peptide RGD, RGDS und cyclo(RGDfV) mit Bindungsaffinität zum Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ und nichtbindende Peptide AGSE und TPL-NH₂.

Die beiden linearen Peptide RGD und RGDS wurden von Tranqui *et al.* auf ihr Bindungsvermögen an aktivierte Thrombozyten untersucht. In einem kompetitiven Assay dienten die Peptide als Inhibitoren des Radioliganden ^{125}I -Fibrinogen.⁷⁵

Für cyclo(RGDfV) wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen eine Reihe von unterschiedlichen Bindungskonstanten erhalten. Aumailley *et al.* bestimmten mittels ELISA einen Wert von $\text{IC}_{50} = 12 \mu\text{M}$ durch Inhibition der Bindung von solubilisiertem, biotinyliertem Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ an immobilisiertes Fibrinogen.¹⁵⁸ Für die Bindung von löslichem Fibrinogen an immobilisiertes Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ fanden Pfaff *et al.* für cyclo(RGDfV) einen Wert von $\text{IC}_{50} = 29 \mu\text{M}$ (ELISA).⁷⁷ Dieselben Autoren bestimmten für cyclo(RGDfV) mittels TIR-Fluoreszenzmikroskopie (TIRFM) eine Dissoziationskonstante von $K_{\text{D}} = 5.05 \mu\text{M}$ und verwendeten dabei Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, das in einer planaren Lipiddoppelschicht rekonstituiert worden war.⁷⁷ Keenan *et al.* erhielten für cyclo(RGDfV) eine durch Inhibition bestimmte Dissoziationskonstante von $K_{\text{D}} = 42 \mu\text{M}$.¹⁰⁰ Dazu wurde in einem Konkurrenzexperiment durch cyclo(RGDfV) die Bindung eines [^3H]-radiomarkierten, disulfidcyclisierten RGD-Semipeptides (SK&F 107260, SmithKline Beecham) an liposomenrekonstituiertes Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ inhibiert. Diese Ergebnisse belegen, dass die Dissoziationskonstante von cyclo(RGDfV) bezüglich des Integrins $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ im niedrigen mikromolekularen Bereich liegt. Da die jeweiligen Messverfahren zum Teil auf der Immobilisierung des Rezeptorproteins oder eines Liganden beruhen, sind die stark unterschiedlichen Werte für die Bindungskonstante nicht verwunderlich. Bindungskonstanten verschiedener Liganden sind streng nur für ein biophysikalisches Verfahren untereinander vergleichbar. Werden für einen Liganden Bindungskonstanten über zwei unterschiedliche Verfahren bestimmt, können Abweichungen um Faktoren von bis zu 10 voneinander auftreten.

Neben der qualitativen Aussage, ob ein Peptid Bindungsaktivität an das liposomeneingebettete Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ besitzt, wird in diesem Kapitel auch eine Abschätzung der Dissoziationskonstanten K_{D} für cyclo(RGDfV) vorgenommen. Die in Abbildung 16 gezeigten, nichtbindenden Peptide AGSE und TPL-NH₂ dienten bei den STD-NMR-Bindungsassays als Negativkontrolle.

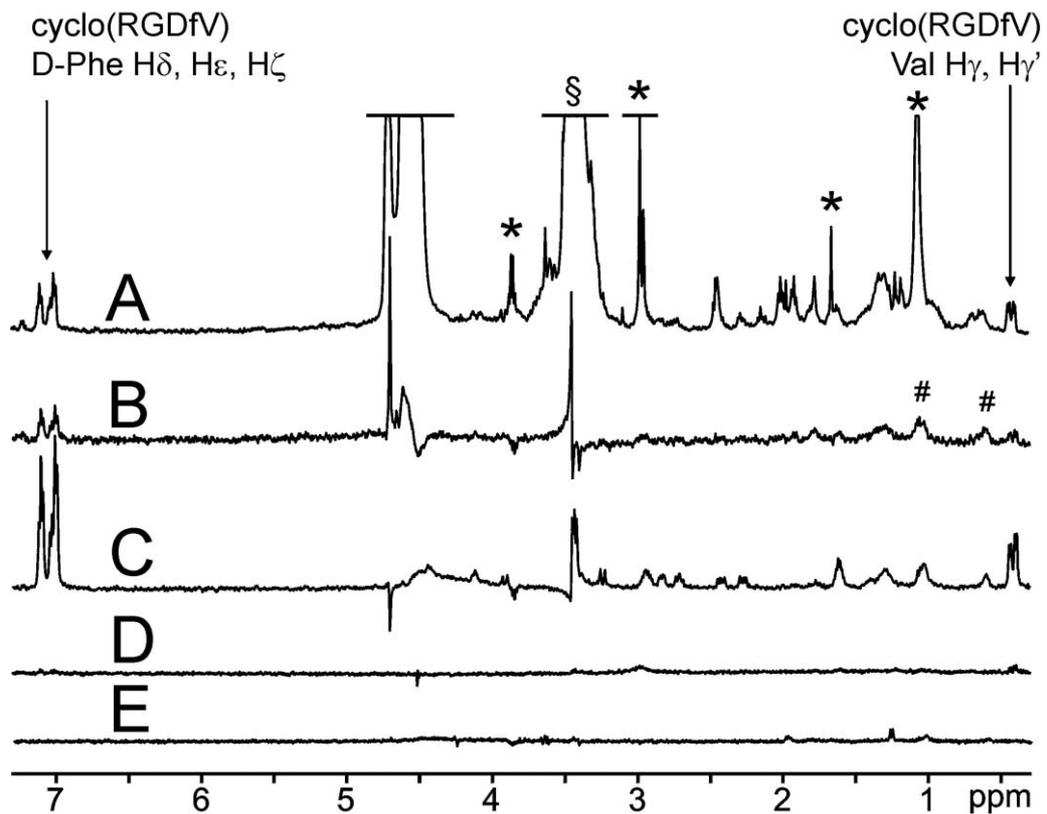


Abbildung 17 (A) ^1H -NMR-Referenzspektrum von cyclo(RGDfV) ($29\ \mu\text{M}$) mit Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Liposomen in LUV-NMR-Puffer bei 293 K. Konzentration an Integrinbindungsstellen $5\ \mu\text{M}$. Probenvolumen etwa $200\ \mu\text{L}$ (Shigemi Röhren). Es sind Tris-Puffer (§) und Verunreinigungen (*) enthalten. (B) Das STD-NMR Spektrum von cyclo(RGDfV) ($29\ \mu\text{M}$) mit Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Liposomen zeigt STD-Effekte der Ligandresonanzen und von einigen Proteinsignalen (#). *On-Resonance*-Einstrahlung bei $-2\ \text{ppm}$, *Off-Resonance*-Einstrahlung bei $160\ \text{ppm}$. (C) Wie B aber die cyclo(RGDfV)-Konzentration beträgt $275\ \mu\text{M}$. (D) Das STD-NMR Spektrum von cyclo(RGDfV) ($260\ \mu\text{M}$) mit integrinfreien Liposomen zeigt keine STD-Effekte, die auf unspezifische Bindung an die Lipiddoppelschicht hindeuten würden. (E) STD-NMR Spektrum von AGSE ($260\ \mu\text{M}$) mit Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Liposomen. Das nichtbindende Peptid zeigt keine STD-Effekte.

Das ^1H -NMR-Referenzspektrum in Abbildung 17A von cyclo(RGDfV) (Konzentration $29\ \mu\text{M}$) mit Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Liposomen zeigt die Ligandresonanzen, ein Signal von nicht vollständig deuteriertem Tris-Puffer (§) und einige, niedermolekulare Verunreinigungen (*) aus den Komponenten der Liposomenpräparation. Im STD-NMR Spektrum der gleichen Probe erscheinen hauptsächlich die STD-Effekte der Ligandresonanzen, besonders deutlich sind die Signale von D-Phe $\text{H}\delta$, $\text{H}\epsilon$ und $\text{H}\zeta$ sowie von Val $\text{H}\gamma / \text{H}\gamma'$. Die Signale der Verunreinigungen verschwinden hingegen durch Subtraktion (Abbildung 17B). Einige Proteinresonanzen (#), beispielsweise bei $0.7\ \text{ppm}$ und $1.1\ \text{ppm}$, wurden durch den Spinlock nicht komplett unterdrückt. Die Konzentration an verfügbaren Integrinbindungsstellen war etwa $5\ \mu\text{M}$, was einem 6-fachen Ligandüberschuss entspricht. Wird die Ligandkonzentration auf $275\ \mu\text{M}$ cyclo(RGDfV) und damit auf einen 55-fachen Überschuss erhöht, nimmt die absolute Intensität der STD-Effekte stark zu. (Abbildung 17C). Das STD-NMR Spektrum von

cyclo(RGDfV) (260 μM) mit integrinfreien Liposomen zeigt nur STD-Effekte kleiner 1 %. Anhand dieser, nach dem gleichen Protokoll hergestellten, Liposomen wurde belegt, dass keine unspezifische Bindung des Liganden an die Lipiddoppelschicht stattfindet. Als eine weitere Negativkontrolle wurden STD-NMR Spektren mit dem in Liposomen rekonstituierten Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ und AGSE (160 μM) aufgenommen. Dieses nichtbindende Peptid zeigt in Abbildung 17E keinerlei STD-Effekte und damit keine unspezifische Bindung an das Integrin. Die gleichen Integrinliposomen in einer NMR-Probe mit dem nichtbindenden Tripeptid TPL-NH₂ (480 μM) rufen bei den Protonen H δ und H δ' etwa 1 % STD-Effekt hervor (Spektren nicht gezeigt).

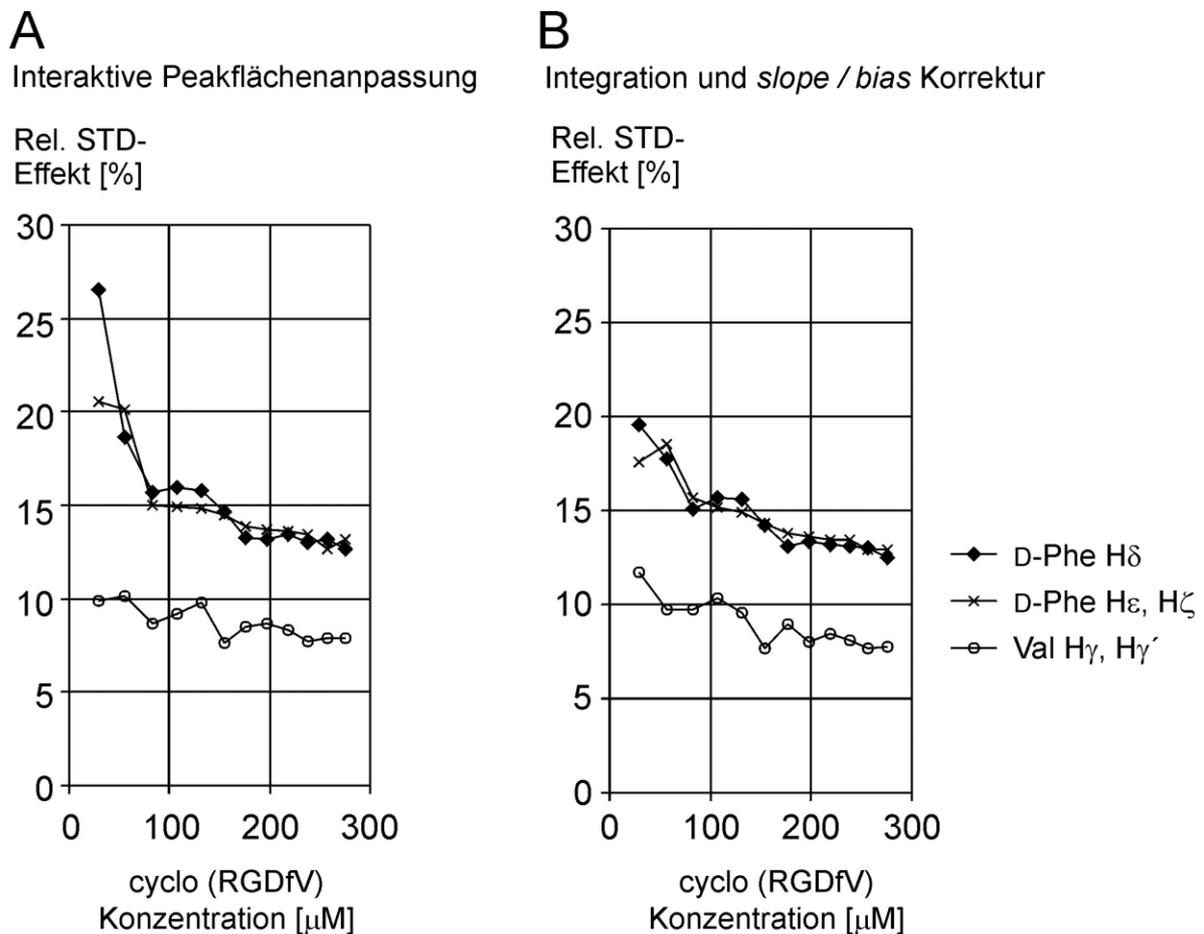


Abbildung 18 Titration von liposomenrekonstituiertem Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ mit cyclo(RGDfV) (Konzentrationen zwischen 29 μM und 275 μM). Der Ligandüberschuss wurde zwischen 6:1 und 55:1 variiert. *On-Resonance*-Einstrahlung bei -2 ppm, *Off-Resonance*-Einstrahlung bei 160 ppm. Für die NMR-Spektren und Meßbedingungen siehe Abbildung 17A – C. (A) Der prozentuale STD-Effekt wurde berechnet aus dem Skalierungsfaktor bei der manuellen Anpassung der jeweiligen 1D-¹H-Signale im Referenzspektrum an die korrespondierenden STD-Signale durch Überlagerung. (B) Der prozentuale STD-Effekt wurde aus den Integralen der 1D-¹H-Signale und der korrespondierenden STD-Signale nach manueller *slope*- und *bias*-Korrektur berechnet.

In einer Titrationsreihe wurden 10 weitere cyclo(RGDfV)-Konzentrationen zwischen 29 μM und 275 μM mit den Integrinliposomen in STD-Experimenten vermessen. Die Signale von D-Phe H δ , H ϵ und H ζ bzw. von Val H γ / H γ' erscheinen in einem besonders wenig überlagerten Bereich des Spektrums und dienten für diese Titrationsexperimente als Reportergruppen. Der relative STD-Effekt ist definiert als der Quotient aus der Signalintensität im STD-Spektrum und der Intensität des jeweils korrespondierenden Signals im 1D- ^1H -WATERGATE-Referenzspektrum. Dieser Quotient wurde jeweils für die Signale von D-Phe H δ , H ϵ und H ζ , sowie von Val H γ / H γ' bei der manuellen Peakflächenanpassung durch Überlagerung von Referenz- und STD-NMR-Spektrum aus dem jeweiligen Skalierungsfaktor erhalten (Abbildung 18A). Zur Kontrolle wurde jeder STD-Effekt auch durch Division der Peakintegrale berechnet und ebenfalls als Prozentwert gegen die cyclo(RGDfV)-Konzentration aufgetragen (Abbildung 18B). Für die Integration der drei Peaks wurden die Regionen der chemischen Verschiebungen definiert, gespeichert, und bei allen 12 Konzentrationen angewendet. Die Integrale wurden über die Parameter *slope* und *bias* manuell korrigiert, um Signale der Proteinhüllkurve zu kompensieren. Der Vergleich der beiden Methoden zur Analyse von STD-Spektren erschien nötig, da die durch manuelle Peakflächenanpassung erhaltene Titrationskurve (Abbildung 18A) Schwankungen um den idealen Abfall herum aufweist und damit nicht monoton verläuft. Um überlagerte, breite Proteinresonanzen als Ursache dafür auszuschließen, wurde die Methode der lokalen, manuellen Basislinienkorrektur unter Anpassung der *slope*- und *bias*-Parameter als Vergleich herangezogen. Beide Methoden, die Integralverhältnisse zu bilden, ergeben einen sehr ähnlichen Verlauf der Titrationskurve und sind daher gleichermaßen gut zur Auswertung verrauschter Spektren mit unvollständig unterdrückten Proteinsignalen geeignet. Trotz des Anstiegs des absoluten STD-Effekts mit Zunahme der Ligandkonzentration fällt der relative STD-Effekt in einer Titration ab, weil er bezogen auf die Intensitäten im Referenzspektrum angegeben wird. In gutem Einklang mit dem theoretischen Verlauf einer Titration ist in Abbildung 18 im Konzentrationsbereich bis 100 μM ein steiler exponentieller Abfall der Kurve deutlich, der eine spezifische Bindung an das Integrin repräsentiert. Bei hohen Konzentrationen halten sich die individuellen cyclo(RGDfV)-Moleküle seltener in der Bindungsstelle auf und erhalten im zeitlichen Mittel weniger Sättigung. Aus dem Kurvenverlauf in diesem Konzentrationsbereich in Abbildung 18 läßt sich die Dissoziationskonstante grob abschätzen. Dazu müssen der maximale STD-Effekt für infinitesimal kleine Konzentrationen und der untere STD-Grenzwert für sehr hohe Konzentrationen extrapoliert werden. Die beim Mittelwert abgelesene Konzentration liefert eine Dissoziationskonstante von $K_D = 30 - 70 \mu\text{M}$. Abweichend vom erwarteten Verlauf sinkt der STD-Effekt bei hoher Ligandkonzentration nicht weit genug ab und erreicht kein deutliches Plateau. Die STD-Effekte der aromatischen Protonen von cyclo(RGDfV) streben beispielsweise einem unteren Wert von 10 – 12 % entgegen. Dieser weitere, flache Abfall der Kurve zwischen 100 μM und 275 μM deutet auf eine unspezifische Bindung hin.

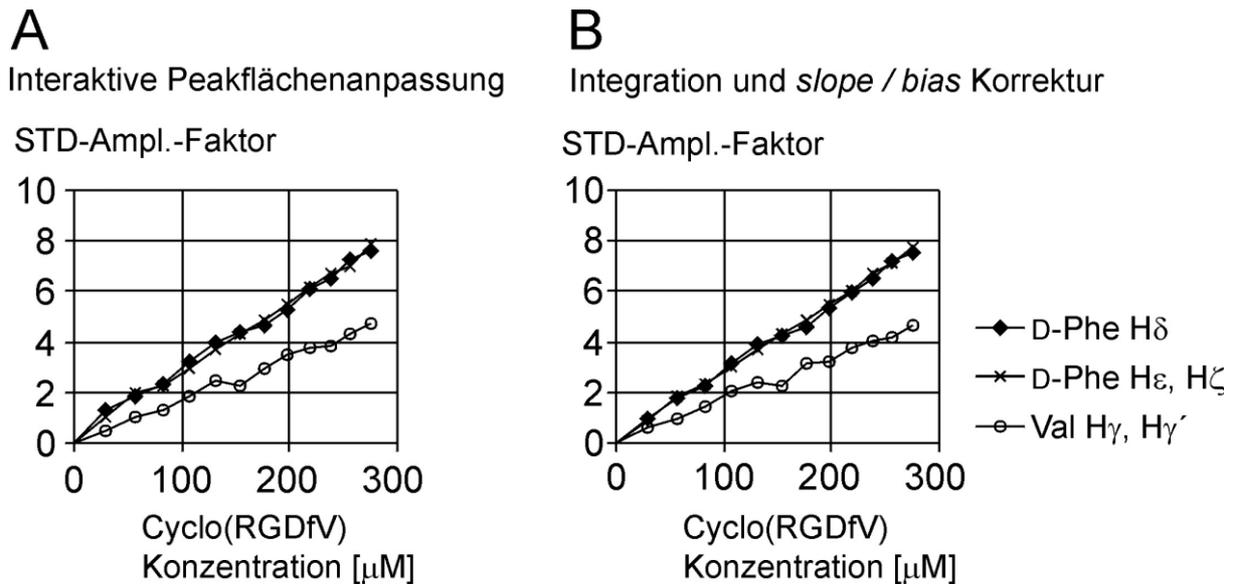


Abbildung 19 Titration von liposomenrekonstituiertem Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ mit cyclo(RGDfV). Die Konzentration an Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ betrug $5 \mu\text{M}$. Dargestellt ist der STD-Amplifikationsfaktor in Abhängigkeit von der Ligandkonzentration. (A) Die relativen STD-Effekte wurden durch Überlagerung und Anpassung der STD- und Referenzsignale berechnet (wie in Abbildung 18A). (B) Die relativen STD-Effekte wurden aus den Integralen der STD- und Referenzsignale berechnet (wie in Abbildung 18B).

Der STD-Amplifikationsfaktor ist das Produkt aus dem relativen STD-Effekt und dem Ligandüberschuss (Gleichung 3) und stellt ein gutes Kriterium für die absolute Sättigungseffektivität dar. Wird er gegen die Ligandkonzentration aufgetragen, ähnelt der Graph für viele Rezeptor-Ligand-Systeme einer Bindungsisotherme (Gleichung 5, Seite 44). Bei niedrigen Ligandkonzentrationen im Bereich der Dissoziationskonstanten steigt der Amplifikationsfaktor steil mit der Ligandkonzentration an, aber für sehr große Überschüsse wird der Verlauf des Amplifikationsfaktors immer flacher. Dieser Verlauf ist für eine Sättigung der Bindungsstellen typisch.

Die in Abbildung 18 dargestellte Titrationsreihe der relativen STD-Effekte von cyclo(RGDfV) als Ligand und dem Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ wurde nochmal in Abbildung 19 mit den STD-Amplifikationsfaktoren als Abszisse geplottet. Analog zu Abbildung 18 sind wieder beide Methoden zur Bestimmung der relativen STD-Effekte aus den Peakintegralen in A und B einander gegenübergestellt. Die sehr gute Übereinstimmung der jeweiligen Kurven zeigt wieder, dass Signale auch bei einer geringen Spektrenqualität präzise ausgewertet werden können.

In den Graphen in Abbildung 19 ist der abgeflachte Verlauf des STD-Amplifikationsfaktors bei Konzentrationen knapp unter $100 \mu\text{M}$ für die Signale von D-Phe H δ , H ϵ und H ζ bzw. im Bereich $100 - 150 \mu\text{M}$ für die Signale von Val H γ und Val H γ' trotzdem nur schwach zu erkennen. Dieser Bereich des Graphen mit den ersten drei Messpunkten ist in Abbildung 20 noch einmal vergrößert dargestellt.

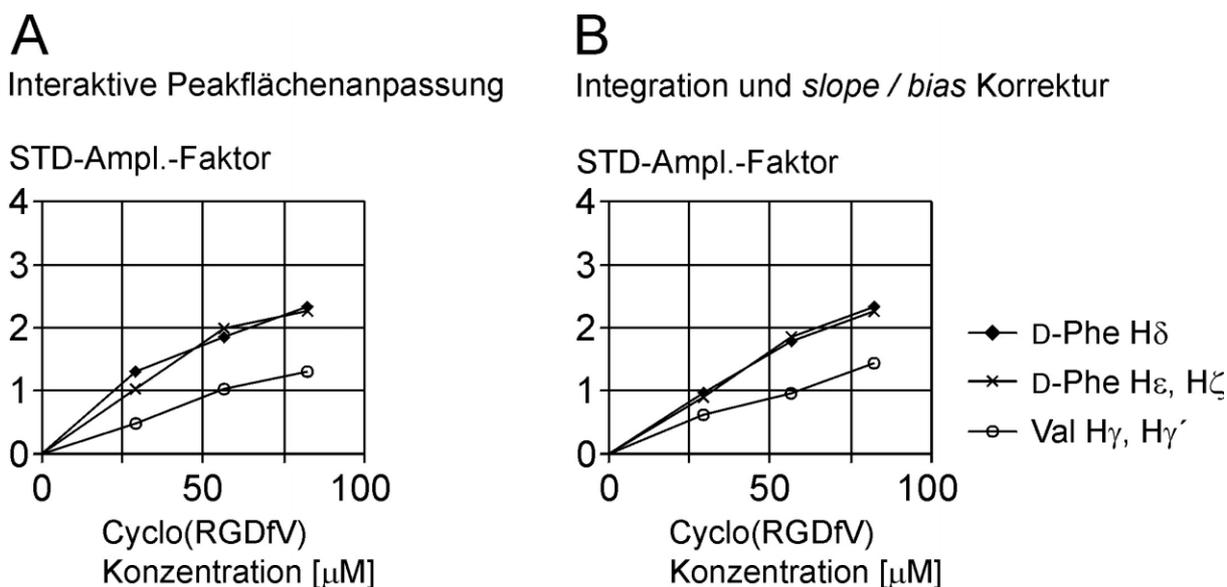


Abbildung 20 Titration von liposomenrekonstituiertem Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ mit cyclo(RGDfV) wie in Abbildung 19. Es ist nur der Ausschnitt mit Ligandkonzentrationen unter $100 \mu\text{M}$ gezeigt. Die Konzentration an Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ betrug $5 \mu\text{M}$. (A) Die relativen STD-Effekte wurden durch Überlagerung und Anpassung der Spektren berechnet. (B) Der relative STD-Effekt wurde aus den Integralen berechnet.

Wenn für die aromatischen Protonen von D-Phe in Abbildung 20 eine Sättigungskurve extrapoliert wird, kann ein maximaler STD-Amplifikationsfaktor von 2.5 – 3.0 abgeschätzt werden. Dies entspricht einer Dissoziationskonstante von $K_D = 30 - 50 \mu\text{M}$. Für die Protonen Val $H\gamma$ und Val $H\gamma'$ ergibt die gleiche grobe Abschätzung eine Dissoziationskonstante von $K_D = 20 - 60 \mu\text{M}$.

Im Bereich über $100 \mu\text{M}$ hingegen tritt offenbar ein unspezifischer Bindungsprozess auf, der auch bei Konzentrationen nahe $300 \mu\text{M}$ keine Anzeichen der Sättigung zeigt. Aus den Daten in Abbildung 19 wurde die Dissoziationskonstante für cyclo(RGDfV) außerdem durch eine Scatchard-Analyse ermittelt.¹⁴⁹ Dieses Verfahren erlaubt eine Linearisierung der Messpunkte, wenn eine spezifische Bindung vorliegt. Gemäß Gleichung 6 (Seite 44) beträgt die Steigung der Geraden $-1/K_D$. Die Schwäche der Methode liegt in einer Überbetonung der Messfehler für größere Ligandkonzentrationen. Da aber bei diesen Konzentrationen die Korrelation der Daten relativ gut ist, wurde dieses Problem vernachlässigt.

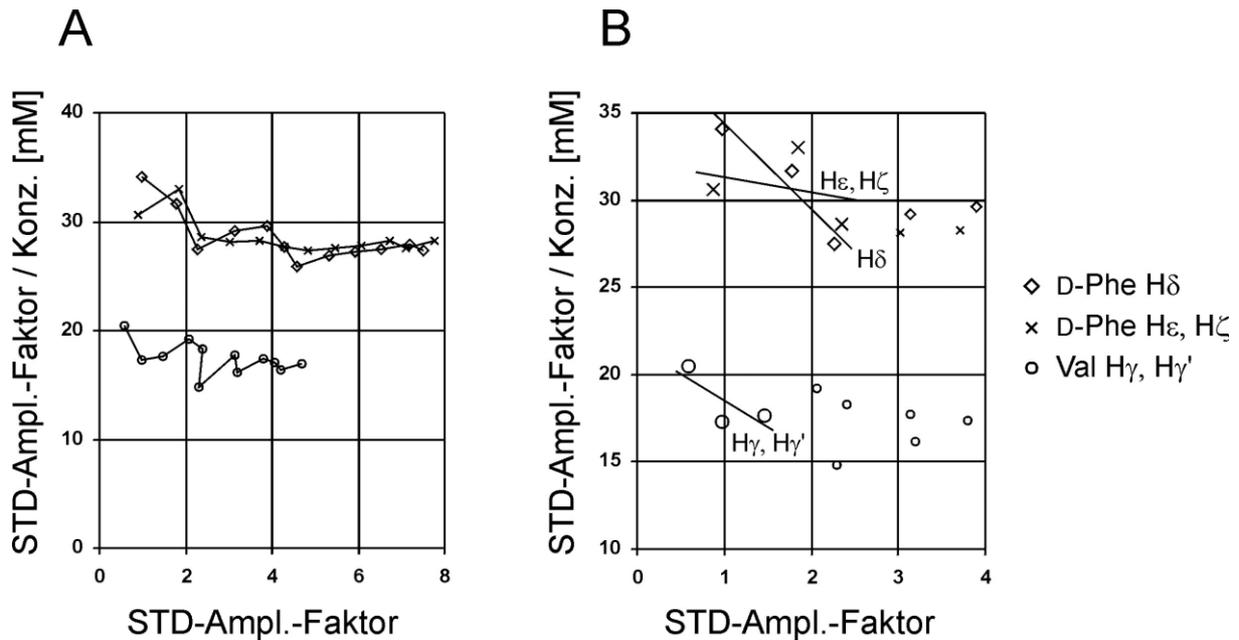


Abbildung 21 (A) Titration von liposomenrekonstituiertem Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ mit cyclo(RGDfV). Die Konzentration an Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ betrug $5 \mu\text{M}$. Gezeigt sind die Scatchard-Graphen, in denen jeweils der Quotient $[\text{mM}^{-1}]$ aus dem STD-Amplifikationsfaktor und der Ligandkonzentration gegen den STD-Amplifikationsfaktor aufgetragen wurde. Dabei wurden die Daten aus Abbildung 19B benutzt. (B) Wie A, aber es wurde ein vergrößerter Ausschnitt gewählt, in dem die Messpunkte für kleinere Ligandkonzentrationen gezeigt sind. An die jeweils drei ersten Messpunkte jedes Graphen wurde eine Gerade angepasst und aus der Steigung die Bindungskonstante K_D berechnet.

In Abbildung 21A und B zeichnet sich für niedrige Ligandkonzentrationen links im Diagramm eine stärker negative Steigung als für hohe Konzentrationen ab. Das steilere Segment des Graphen repräsentiert den spezifischen Bindungsprozess höherer Affinität. Daher wurde an die jeweils ersten drei Messpunkte jedes Graphen eine Gerade angepasst und aus der Steigung die Bindungskonstante K_D berechnet. Diese Ergebnisse und die jeweiligen Korrelationskoeffizienten R^2 sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die Werte für die Bindungskonstante K_D in Tabelle 1 liegen 15 – 20-fach höher als die Literaturdaten und als die aus Abbildung 20 abgeschätzten Werten. Die lineare Korrelation der jeweiligen drei Messpunkte für jede Regressionsgerade in Abbildung 21 ist nur relativ schwach. Dieses Problem ist auch durch die kleinen Werte des Korrelationsparameters R^2 in Tabelle 1 repräsentiert. Möglicherweise ist eine partielle Degradation der Liposomen eine Ursache für den unerwarteten Verlauf der Bindungskurven. Die Zahl der verfügbaren Bindungsstellen kann entweder durch Aufbrechen der Vesikel ansteigen oder durch multilamellare Assoziation absinken. Der erste Fall führt zu einem unerwartet geringen Abfall des STD-Effektes bei Erhöhung des Ligandüberschusses und stellt eine mögliche Erklärung für die beobachteten Bindungskurven dar.

Tabelle 1 Bindungskonstanten K_D aus den Scatchard-Graphen in Abbildung 21.

Protonen	Steigung s [mM^{-1}]	K_D [mM]	R^2
D-Phe $H\delta$	- 4.90	0.20	0.9166
D-Phe $H\zeta$ / $H\epsilon$	- 0.85	1.18	0.0841
Val $H\gamma$ / $H\gamma'$	- 3.04	0.33	0.5812

Um zu prüfen, ob der Bindungsprozess im Konzentrationsbereich über 300 μM gesättigt werden kann und damit möglicherweise spezifisch ist, wurden in einer weiteren Titration STD-Spektren mit den Integrinliposomen aufgenommen. Die Konzentrationen des Liganden cyclo(RGDfV) lagen zwischen 0.33 mM und 1.70 mM.

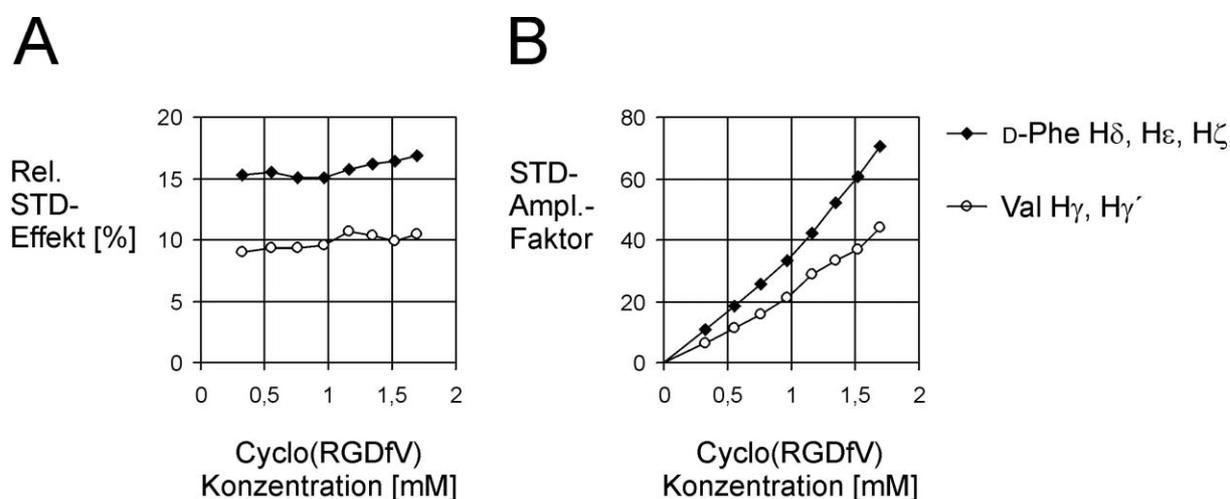


Abbildung 22 Titration von liposomenrekonstituiertem Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ mit cyclo(RGDfV) (Konzentrationen zwischen 0.33 mM und 1.70 mM). Die Konzentration an Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ betrug 5 μM , der Ligandüberschuss wurde zwischen 66:1 und 340:1 variiert. *On-Resonance*-Einstrahlung bei -2 ppm, *Off-Resonance*-Einstrahlung bei 160 ppm. (A) Der prozentuale STD-Effekt wurde berechnet aus den Integralen (wie in Abbildung 18). (B) Der STD-Amplifikationsfaktor ist das Produkt aus dem relativen STD-Effekt und dem Ligandüberschuss.

In diesem Konzentrationsbereich zeigt der Verlauf des relativen STD-Effekts für die Signale von D-Phe $H\delta$, $H\epsilon$ und $H\zeta$ bzw. von Val- $H\gamma$ / $H\gamma'$ (Abbildung 22A) keinen exponentiellen Abfall auf kleine Werte. Die Kurve verläuft bis 1 mM cyclo(RGDfV) fast waagrecht mit einem STD-Effekt von etwa 16 % bzw. 9 % und zeigt zwischen 1.0 mM und 1.7 mM einen schwachen Anstieg. Das waagerechte Segment der Kurve kann eine spezifische Bindungsstelle repräsentieren. Erst bei Konzentrationen weit über 2 mM wäre ein Großteil der Bindungsstellen mit dem Liganden besetzt, und der STD-Effekt würde absinken. Der leichte Anstieg der Kurve bei Konzentrationen über 1 mM deutet darauf hin, dass die Bindungsstellen hinsichtlich ihrer Anzahl nicht beschränkt sind und daher nicht vollständig

besetzt werden können. Bei derartigen Bindungsereignissen kann es sich um die unspezifische Assoziation der Ligandmoleküle an hydrophoben Oberflächen des Rezeptormoleküls oder aber eine Selbstassoziation des Liganden unter Bildung von Mizellen oder ähnlichen Aggregaten handeln. Der in Abbildung 22B gezeigte Verlauf des STD-Amplifikationsfaktors weist nicht die Form einer Sättigungskurve nach Gleichung 5 (Seite 44) auf und deutet daher auf eine unspezifische Bindung hin.

Generell werden viele biophysikalische Methoden zur Detektion gebundener Liganden durch unspezifische Bindung gestört. Aggregations- und Assoziationsphänomene treten im Gegensatz zu einer spezifischen Bindung oberhalb einer bestimmten Schwellenkonzentration auf. Die Zahl der unspezifisch gebundenen Ligandmoleküle nimmt mit wachsender Konzentration kontinuierlich zu. Dieses Verhalten ist für den STD-Amplifikationsfaktor in Abbildung 22B zu beobachten. Eine Rückextrapolation der Kurve zwischen 1.0 mM und 1.7 mM auf die Konzentrationsachse zeigt einen Achsenabschnitt bzw. eine Schwellenkonzentration für die Assoziation von 200 μ M bis 300 μ M an.

3.2.3. Inhibitionsexperimente mit cyclo(RGDfV), RGD und RGDS

An dem, in Liposomen eingebetteten, Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ wurden mit den drei Peptiden cyclo(RGDfV), RGD und RGDS Konkurrenzexperimente durchgeführt, um Bindungsaffinitäten vergleichen, bzw. Literaturangaben über relative Bindungsstärken bestätigen zu können. Die Rangfolge der Bindungsaffinitäten zum Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ wird mit cyclo(RGDfV) > RGDS > RGD angegeben. Aus dieser Reihe wurden zunächst RGD und cyclo(RGDfV) durch gleichzeitige, äquimolare Zugabe der beiden Liganden in ein direktes Konkurrenzexperiment mit den Integrinliposomen eingesetzt.

Dazu wurden NMR-Spektren eines Gemisches des linearen Peptide RGD in einer Konzentration von 274 μ M mit cyclo(RGDfV) in einer Konzentration von 264 μ M aufgenommen. In dieser NMR-Probe mit Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ -Liposomen betrug die Konzentration der Rezeptorbindungsstellen etwa 2 μ M. Bezüglich der verfügbaren Bindungsstellen liegen beide Peptidliganden in etwa 130-fachem Überschuss vor.

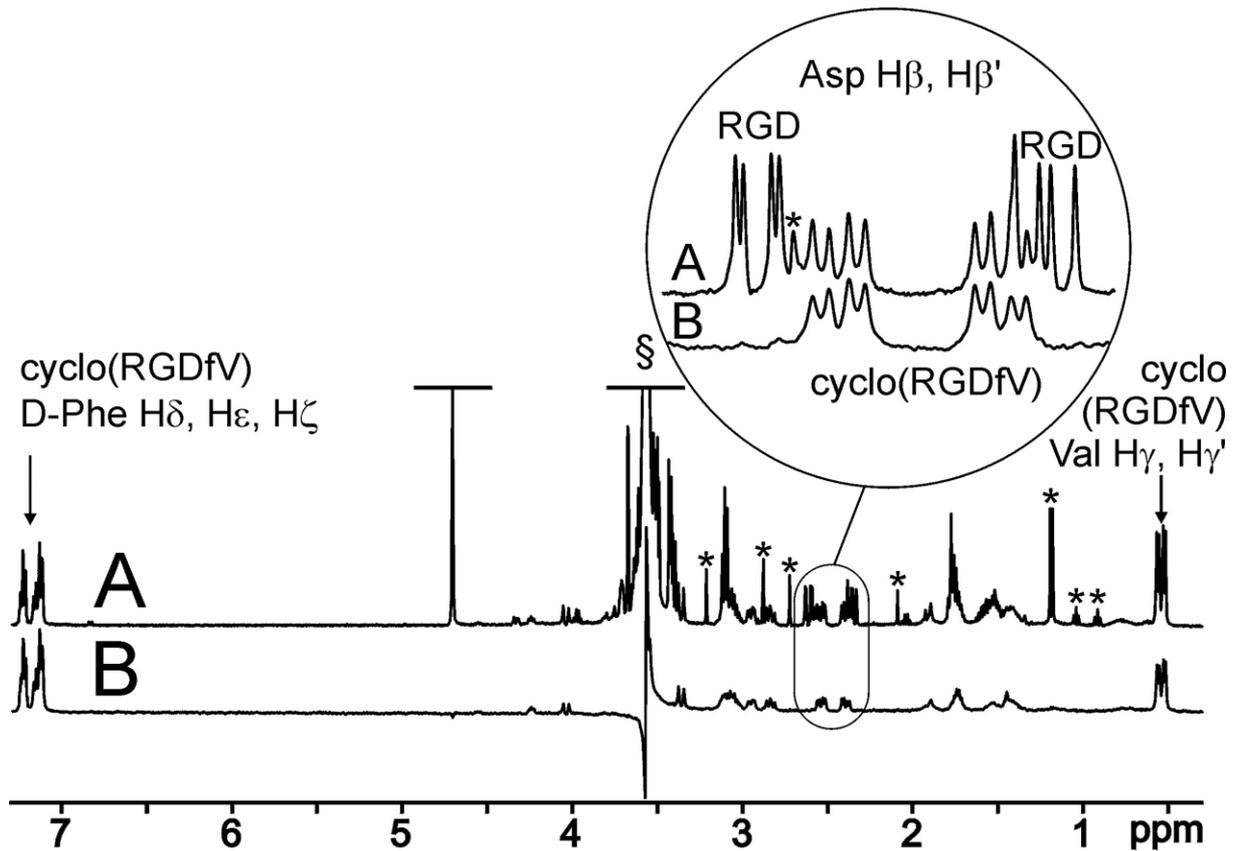


Abbildung 23 (A) ¹H-NMR-Referenzspektrum von RGD (274 μ M) und cyclo(RGDfv) (264 μ M) mit Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ -Liposomen zeigt Signale beider Liganden, Tris-Puffer (§) und Verunreinigungen (*). Der Ausschnitt zeigt die Signale der diastereotopen Asp H β -Protonen. (B) Das STD-NMR Spektrum von RGD (274 μ M) und cyclo(RGDfv) (264 μ M) mit Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ -Liposomen zeigt nur STD-Effekte des stärker bindenden Cyclopeptids.

Obwohl die beiden RGD-Peptide in etwa äquimolaren Konzentrationen vorliegen, zeigen die STD-Spektren nur STD-Effekte für das stärker bindende Cyclopeptid. Wenn man für cyclo(RGDfv) eine Dissoziationskonstante von $K_D = 30 \mu\text{M}$ annimmt, sind bei diesem Überschuss 89.9 % der Rezeptorbindungsstellen belegt. Da RGD ein mindestens 34-fach schwächerer Ligand als cyclo(RGDfv) ist, kann es das Cyclopeptid nicht nennenswert aus den Bindungsstellen verdrängen (siehe Abbildung 16). Für RGD stehen daher nur ca. 10 % der Bindungsstellen, also 100 pmol, zur Verfügung. Bei einer Bindungskonstanten K_D von mindestens 1 mM kann RGD bei den gegebenen Konzentrationen höchstens an 20 % der nicht durch cyclo(RGDfv) besetzten Bindungsstellen binden. Dieser Anteil von 2 % entspricht einer Zahl an gebundenen Ligandmolekülen von 20 pmol oder 40 nM und ist für eine Detektion im STD-NMR-Spektrum viel zu gering.

Das lineare Peptid RGDS hat laut der Literaturangaben eine geringere Affinität zum Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ als cyclo(RGDfv) und nimmt einen mittleren Platz in der Rangfolge mit RGD ein. In einem Inhibitionsexperiment konnte seine Dissoziationskonstante indirekt durch Quantifizierung des verdrängten Anteils an cyclo(RGDfv) Ligandmolekülen bestimmt werden.

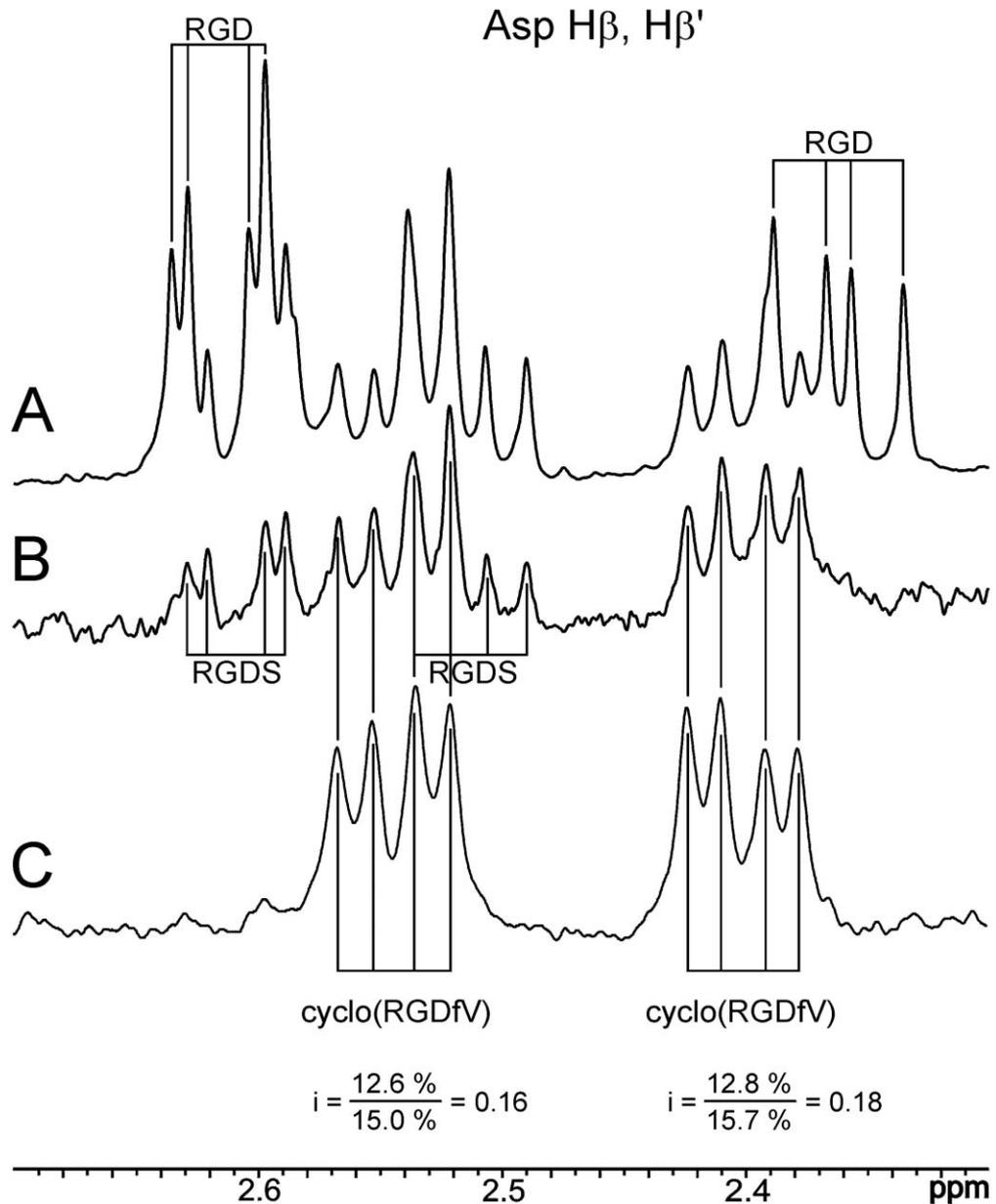


Abbildung 24 (A) Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Referenzspektrum von RGD (274 μM), cyclo(RGDfv) (264 μM) und RGDS (264 μM) mit Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Liposomen. Es ist die Region der beiden Asp H β -Resonanzen für die drei Liganden gezeigt. (B) Das STD-NMR Spektrum von RGD (274 μM), cyclo(RGDfv) (264 μM) und RGDS (264 μM) mit Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Liposomen zeigt nur STD-Effekte der stärker bindenden Peptide cyclo(RGDfv) und RGDS. Um die Inhibitionswerte zu erhalten wurde der prozentuale STD-Effekt der jeweiligen Asp H β -Signale von cyclo(RGDfv) durch den korrespondierenden Wert aus dem STD-Experiment vor der Zugabe des Inhibitors RGDS dividiert. (C) Das STD-NMR Spektrum von RGD (274 μM) und cyclo(RGDfv) (264 μM) vor der Zugabe von des Inhibitors RGDS (264 μM) zeigt nur STD-Effekte von cyclo(RGDfv).

Zu den Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Liposomen mit RGD (274 μM) und cyclo(RGDfv) (264 μM) wurden RGDS bis zu einer Konzentration von 264 μM hinzugegeben, um die inhibitorische Wirkung auf cyclo(RGDfv) zu untersuchen. Verglichen mit den relativen STD-Intensitäten vor der RGDS-Zugabe hatten die STD-Signale der beiden diastereotopen Asp H β -Protonen

von cyclo(RGDfV) von 15.0 % auf 12.6 % und von 15.7 % auf 12.8 % abgenommen (siehe Abbildung 24). Die entsprechenden Inhibitionswerte als Quotient ausgedrückt sind deshalb 0.16 und 0.18. Sie entsprechen der Abnahme an gebundenen Ligand, hervorgerufen durch Verdrängung durch den Inhibitor RGDS.

$$\text{Inhibitionswert } i = \frac{[\text{L}]_{\text{bound}} \text{ nach Zugabe des Inhibitors}}{[\text{L}]_{\text{bound}} \text{ vor Zugabe des Inhibitors}} \quad (9)$$

Durch die geringere Zahl verfügbarer Bindungsstellen für cyclo(RGDfV) erhält dieser Ligand eine geringere Sättigung. Für die STD-Signale der Protonen D-Phe H δ und Val H γ /H γ' von cyclo(RGDfV) wurde eine prozentuale Abnahme der relativen STD-Effekte von 11 % und 19 % gemessen (Spektrum nicht abgebildet). Das entspricht jeweils Inhibitionswerten von 0.11 und 0.19. Der gemittelte Inhibitionsfaktor aus allen vier Werten beträgt also 0.16 bzw. 16 %. Die Gleichung 10 beschreibt die Gleichgewichtsbindungskonstanten für zwei Liganden, die um einen Rezeptor konkurrieren.¹⁵⁹

$$K_I = \frac{[I] \cdot (K_D - i \cdot K_D)}{i \cdot ([L] + K_D)} \quad (10)$$

Es sind:

K_I \equiv Inhibitionskonstante des zugesetzten Inhibitors RGDS.

K_D \equiv Dissoziationskonstante des ersten Liganden cyclo(RGDfV).

$[I] = 264 \mu\text{M}$ \equiv Konzentration des Inhibitors RGDS.

$[L] = 264 \mu\text{M}$ \equiv Konzentration des Liganden cyclo(RGDfV).

i \equiv Inhibitionswert als Quotient wie Gleichung (9).

Eine Inhibitionskonstante K_I entspricht einer durch Kompetition bestimmten Dissoziationskonstante und kann direkt mit anderen K_D -Werten verglichen werden. Wenn eine Bindungsaffinität von $K_D = 5.05 \mu\text{M}$ für cyclo(RGDfV)⁷⁷ und eine mittlere Abnahme des STD-Effekts von 16 % verwendet wird, erhält man eine Inhibitionskonstante von $K_I = 26 \mu\text{M}$ für RGDS. Wenn dagegen für das Cyclopeptid $K_D = 42 \mu\text{M}$ ¹⁰⁰ eingesetzt wird, folgt eine Inhibitionskonstante von $K_I = 190 \mu\text{M}$ für RGDS. Trotz dieser großen Spanne ist in diesem Inhibitionsexperiment die in Abbildung 16 gezeigte Abstufung der Bindungsaffinitäten von

cyclo(RGDfV) und RGDS richtig wiedergegeben. Die dort angeführten IC_{50} -Werte deuten auf eine 1.9 bis 4.6-fach höhere Affinität von cyclo(RGDfV) hin.

3.2.4. Bindungsepitop des Peptids cyclo(RGDfV)

Protonen in direkter räumlicher Nähe zum Rezeptor erfahren eine wesentlich effizientere Sättigung als Protonen, deren Resonanzen nur indirekt über intramolekulare Spindiffusion im Liganden gesättigt werden, und zeigen daher die stärksten STD-Effekte. Bei der Übertragung durch Spindiffusion stammt die Sättigung von anderen Ligandprotonen, die in Kontakt mit dem Rezeptor stehen. Durch Vergleich der STD-Intensitäten verschiedener Ligandprotonen können Bindungsepitope im Ligandmolekül zugeordnet werden.

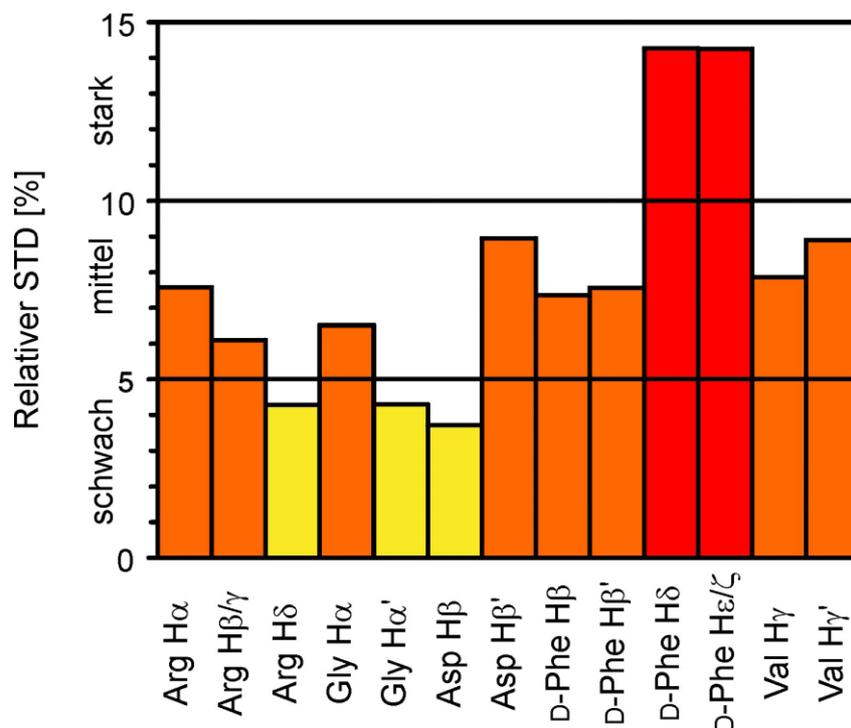


Abbildung 25 Vergleich der relativen STD-Effekte einzelner Protonen im Liganden cyclo(RGDfV) bei einer Konzentration von 150 μ M bzw. einem Ligandüberschuss von 30 : 1 bezogen auf die Zahl der Bindungsstellen. Die Konzentration der Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Bindungsstellen betrug 5 μ M. Die verschiedenen STD-Intensitäten wurden klassifiziert in schwach, mittel und stark. Starke STD-Effekte charakterisieren Bindungsepitope im Liganden, die in der Bindungstasche durch ihre Nähe zum Rezeptor besonders effektiv gesättigt werden.

Die Titrationsexperimente aus Abbildung 18 wurden für die vier cyclo(RGDfV)-Konzentrationen 82 μ M, 150 μ M, 219 μ M und 275 μ M jeweils hinsichtlich der Verteilung der STD-Effekte auf die verschiedenen Resonanzen des Moleküls untersucht, um Bindungsepitope des Liganden zuordnen zu können. Die Konzentration der Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -

Bindungsstellen betrug jeweils etwa $5 \mu\text{M}$. In Abbildung 25 ist dieses *epitope mapping* für eine cyclo(RGDfV)-Konzentration von $150 \mu\text{M}$ graphisch dargestellt. Die individuellen Protonen von cyclo(RGDfV) zeigen im STD-Spektrum verschiedene relative STD-Intensitäten, die in schwache, mittlere und starke Effekte eingeteilt wurden. Für die Paare diastereotoper Protonen von Gly $\text{H}\alpha/\text{H}\alpha'$ und Asp $\text{H}\beta/\text{H}\beta'$ zeigt jeweils ein Signal einen signifikant höheren Effekt, was eine stereochemisch definierte, spezifische Bindung des Liganden an den Rezeptor beweist. Dies gilt auch für die Signalaare D-Phe $\text{H}\beta/\text{H}\beta'$ sowie für Val $\text{H}\gamma/\text{H}\gamma'$. Die Differenz der STD-Effekte der diastereotopen Protonen ist hier zwar geringer, aber sie trägt für alle vier cyclo(RGDfV)-Konzentrationen das gleiche Vorzeichen. Dies ist signifikant für eine stereospezifische Wechselwirkung. Die aromatischen Protonen von D-Phe zeigen die stärksten STD-Effekte, schwächere Effekte finden sich bei den Protonen Arg $\text{H}\alpha$, Arg $\text{H}\beta$, Arg $\text{H}\gamma$, Asp $\text{H}\beta/\text{H}\beta'$, den β -Protonen von D-Phe und den γ -Protonen von Val. Für alle diese Protonen ist dennoch ein starker Kontakt zum Integrinrezeptor charakteristisch. Das Bindungsepitop ist dadurch auf eine Region des D-Phe, die Arg $\text{H}\alpha$, $\text{H}\beta$ und $\text{H}\gamma$ Protonen, die Val Methylgruppen, ein α -Proton von Gly und ein β -Proton von Asp eingegrenzt.

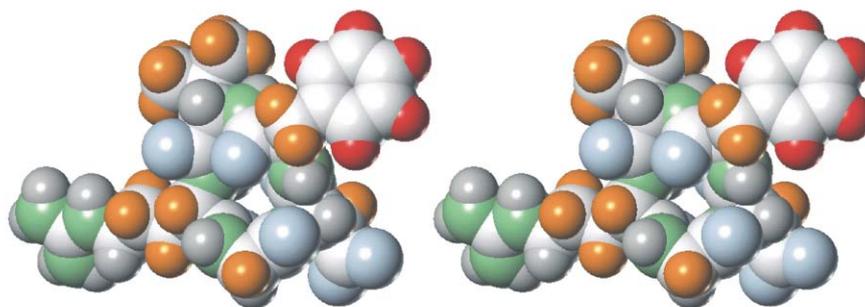


Abbildung 26 Stereodarstellung (*crossed eye*) des cyclo(RGDfV)-Moleküls. Die 3D-Struktur wurde von Aumailley *et al.* durch NMR-Spektroskopie und MD-Simulation bestimmt und für diese Abbildung mit dem per STD-NMR-Spektroskopie charakterisiertem Bindungsepitop kombiniert. Kohlenstoffatome sind in weiß, Wasserstoffatome in hellgrau, Stickstoffatome in grün und Sauerstoffatome in blau gezeigt. Die aromatischen Protonen von D-Phe sind rot gefärbt und besitzen den intensivsten Kontakt zum Integrin. Sie bilden gemeinsam mit den orange markierten Protonen mittlerer STD-Intensität das Bindungsepitop von cyclo(RGDfV). Die einzelnen Gly $\text{H}\alpha$ - und Asp $\text{H}\beta$ -Protonen sind stereochemisch nicht zugeordnet worden, daher könnte die Farbmarkierung auch mit der jeweiligen anderen diastereotopen Position vertauscht werden.

Basierend auf 2D-NMR Experimenten und MD-Simulation wurde von Aumailley *et al.* die dreidimensionale Struktur von cyclo(RGDfV) in DMSO bestimmt.¹⁵⁸ In dieser Konformation weisen die Seitenketten von Arg, Asp und Val ungefähr rechtwinklig von der Ringebene des Cyclopeptides in eine Richtung. Die Guanidinogruppe von Arg und die

β -Carboxygruppe von Asp, besonders aber die Phenylgruppe von D-Phe sind äquatorial orientiert. In Abbildung 26 wurde diese 3D-Struktur des cyclo(RGDfV) mit dem durch STD-NMR-Spektroskopie charakterisierten Bindungsepitop kombiniert. Den intensivsten Kontakt zum Integrin besitzen die rot gefärbten, aromatischen D-Phe-Protonen. Sie zeigen den stärksten STD-Effekt und charakterisieren gemeinsam mit den orange markierten Protonen mittlerer STD-Intensität das cyclo(RGDfV)-Bindungsepitop. Diese Daten belegen, dass die in Abbildung 26 gezeigte Oberseite des cyclo(RGDfV)-Moleküls auf der Rezeptoroberfläche aufliegt und dabei intensive hydrophobe Kontakte zu den rot und orange hervorgehobenen Regionen hergestellt werden. Die in Abbildung 25 aufgeführten, mittelstarken STD-Effekte der Protonen Gly H α , Gly H α' , Asp H β , und Asp H β' konnten den jeweiligen diastereotopen Protonen nicht absolut zugeordnet werden. Die in Abbildung 25 orange gefärbten Protonen Pro-R Gly H α und Pro-S Asp H β können also mit den jeweils diastereotopen Protonen ausgetauscht werden.

Die Verteilung der STD-Effekte innerhalb der Protonen der Arg-Alkylkette deutet auf ein Zentrum der hydrophoben Wechselwirkungen nahe dem Peptidrückgrat hin. Die in der Literatur oft postulierte ionische Bindung des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ an die Arg-Guanidinogruppe von RGD-Peptiden ließ sich durch die STD-Experimente nicht bestätigen. Die STD-Intensität nimmt vom Arg H α zum Arg H δ hin stark ab, obwohl das Arg H δ der Guanidinogruppe am engsten benachbart ist. Dies steht mit den Untersuchungen von Hayashi *et al.* in Einklang, der verschiedene Mutationen des linearen Peptides PSRGDW an der Position Arg mit dem Stammpeptid verglichen hat.⁹⁰ Die Peptide, bei denen die Aminosäure Arginin durch L-Norleucin (Nle), L-Cyclohexylglycin (Chg), L-Norvalin (Nva), L-*tert*-Leucin (Tle) oder L-4-Hydroxyprolin (Hyp) substituiert worden war, zeigten sowohl stärkere Inhibition der Bindung des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ an immobilisiertes Fibrinogen als auch eine stärkere Inhibition der Thrombozytenaggregation. Diese Ergebnisse von Hayashi *et al.* sprechen für eine geringe Beteiligung einer ionischen Wechselwirkung mit Arg. Der schwache STD-Effekt der Arg H β -Protonen schließt eine Salzbrücke zur Guanidinogruppe aber nicht völlig aus, da in diesem Fall der Abstand zu beteiligten Proteinprotonen größer als bei einem hydrophoben Kontakt ist. Beispielsweise beobachtete C. Deschermeier für den ionischen Kontakt einer spezifischen 3-Kinase mit dem Substrat Inositol-1,4,5-trisphosphat eine geringe Effizienz des Sättigungstransfers.¹⁶⁰ Für Kombination von sowohl ionischen als auch unpolaren Anteilen der Bindung an die Arg-Seitenkette spricht die Beobachtung von Miyashita *et al.*. Die Autoren setzen 8-Guanidinoctansäure als Mimetikum in RGDW für das Peptidsegment RG ein und erreichten so eine vielfach höhere inhibitorische Wirkung.¹⁶¹

Der intensivste STD-Effekt des cyclo(RGDfV) wird beim D-Phe beobachtet. Dies zeigt eine starke hydrophobe Interaktion an, die auch in der Literatur oft betont wird. Untersuchungen der Struktur-Wirkungs-Beziehung durch Tranqui *et al.* und Foster *et al.* für verschiedene lineare Peptide der Struktur RGD-X zeigten eine 2- bis 6-fach höhere

inhibitorische Aktivität, wenn die dem Asp benachbarte Aminosäure X aromatisch oder hydrophob ist.^{75, 76} Im Vergleich wurden die mit Cys, Gln und Ser substituierten Peptide synthetisiert und jeweils die Inhibition der Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen bestimmt. Der Einfluss der Aminosäure X auf die Affinität wies dabei die Rangfolge Phe>Val>Cys>Gln>Ser auf. In einer analogen Struktur-Wirkungs-Studie von Barker *et al.* wurden verschiedene Peptide der Sequenz GRGD-X bezüglich ihrer Inhibitorwirkung auf die Thrombozytenaggregation miteinander verglichen.¹⁶² Dabei wurde für Affinitäten der Peptide mit der jeweiligen Aminosäure an der Position X die Rangfolge Phe>Val>Ser≈Tyr≈Leu>Asp bestimmt. Wurde allerdings die Inhibition der Fibrinogenbindung an Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ durch die verschiedenen Peptide verglichen, ergab sich ein etwas anderes Bild: Val>Phe>Ser>Tyr≈Asp>Leu. In einer weiteren SAR-Studie wurden verschiedene cyclische Peptide der Struktur cyclo(S,S)-CKGD-X-PC-NH₂ hinsichtlich ihrer Inhibitorwirkung auf die Thrombozytenaggregation miteinander verglichen.⁸⁸ Die Rangfolge der Inhibitorwirkung für die Mutationen wird mit Nal>Trp>Mty>Phe>Val>Ile>Leu angegeben. Die aromatischen Reste 3-(2-Naphthyl)-L-alanin (Nal), Trp, O-Methyl-L-tyrosin (Mty) und Phe steigern die Affinität auf das 1.6- bis 12-fache, verglichen mit den aliphatischen Resten Val, Ile und Leu. Dies weist auf eine starke π -Wechselwirkung zwischen dem Liganden und einer Aminosäure des Integrinrezeptors hin.

In dem Har-GDW-Motiv des cyclischen Peptides Eptifibatide (Integrilin, Cor Therapeutics) sind zwei hydrophobe Bindungs epitope kombiniert. Bei der Entwicklung von Eptifibatide diente die in den Disintegrinen aus Schlangengiften auftretende KGDW-Sequenz als Grundlage.⁸⁸ Dieses Motiv ist wegen der längeren Lys-Alkylkette für eine hydrophobe Interaktion besser geeignet und enthält den carboxyterminalen, aromatischen Rest in Form einer Indolylgruppe des Tryptophan. Das Homoarginin in Eptifibatide bietet über die terminale Guanidinogruppe zusätzlich eine Möglichkeit zur elektrostatischen Wechselwirkung, welche die Affinität zum Integrin verstärkt.

Grundsätzlich muss bei diesen SAR-Studien berücksichtigt werden, dass auch die Substitution einer einzigen Aminosäure die Konformation des Liganden oder den Bindungsmodus, also die Orientierung in der Bindungstasche, stark verändern kann.

Im April 2002 wurde von Xiong *et al.* eine Röntgenstruktur¹⁶³ des extrazellulären Teils des Integrin $\alpha_V\beta_3$ im Komplex mit cyclo(RGDf-{N-Methyl-L-Val}) und Mn²⁺-Ionen veröffentlicht. Der Ligand wird auch als cyclo(RGDf-N(Me)V-), P5⁹⁹ oder EMD 121974 (Merck KGaA) bezeichnet.

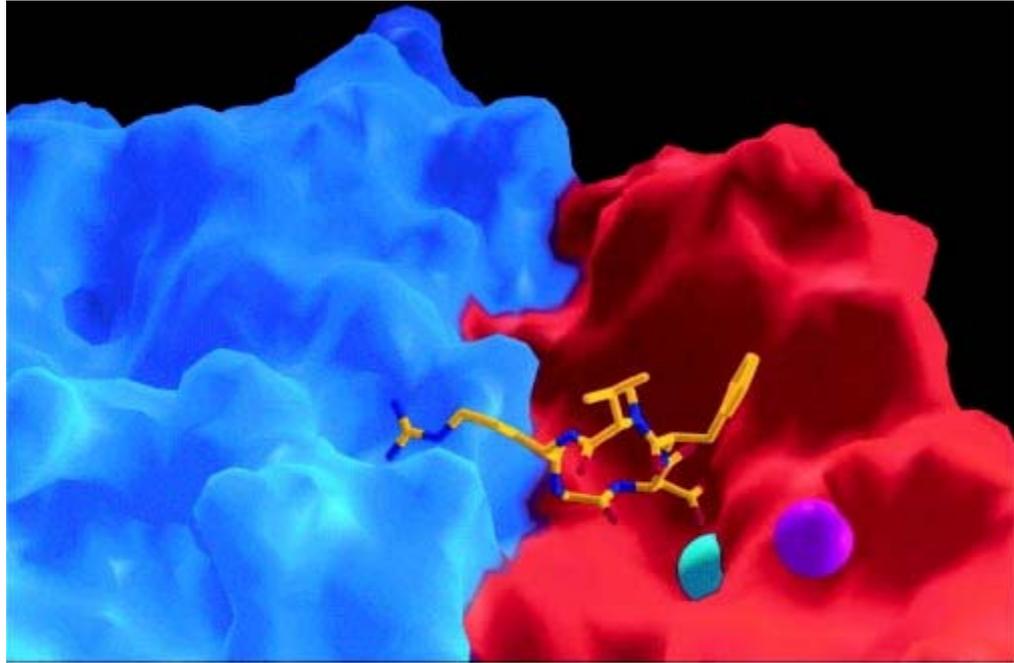


Abbildung 27 Röntgenstruktur des extrazellulären Teils des Integrin $\alpha_v\beta_3$ im Komplex mit cyclo(RGDf-N(Me)V-) (PDB ID 115g). Abb. aus der Puplication von Xiong *et al.* ¹⁶³ Der Ligand ist in der *capped stick*-Darstellung gezeigt. Die Oberfläche der α_v -Untereinheit und der β_3 -Untereinheit des Integrins ist jeweils blau, bzw. rot gefärbt. Die Mn^{2+} -Ionen in den Metallbindungsstellen MIDAS und ADMIDAS sind jeweils türkis und violett eingefärbt.

Dieses Bild von der Rezeptor-Ligand-Bindung für das Integrin $\alpha_v\beta_3$ kann unter der Annahme einer vergleichbaren Konformation der β_3 -Untereinheit und einer ähnlichen Orientierung des cyclischen RGD-Peptides mit dem über STD-NMR bestimmten Bindungsepitop von cyclo(RGDfV) verglichen werden. Die intensiven STD-Effekte der aromatischen D-Phe-Protonen deuten auf einen intensiven Kontakt zu aromatischen Protonen des Integrins $\alpha_{I1b}\beta_3$ hin, der sich auch in der Röntgenstruktur deutlich abzeichnet.

Die Zentren der aromatischen Ringe von Tyr122 der β -Untereinheit des Integrin $\alpha_v\beta_3$ und des D-Phe des Liganden sind etwa 6 Å voneinander entfernt und können eine schwache π -Wechselwirkung aufbauen. Die relative Anordnung der Phenylringe ist in Abbildung 28 gezeigt.

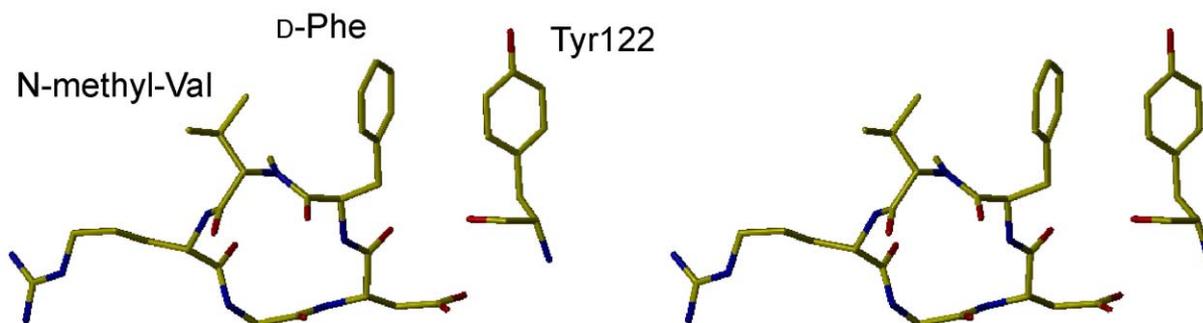


Abbildung 28 Stereodarstellung (*crossed eye*) der Röntgenstruktur des Integrin $\alpha_v\beta_3$ mit dem Liganden cyclo(RGDf-N(Me)V-) in der Bindungstasche aus Abbildung 27. (PDB ID 115g)¹⁶³ Vom Integrin ist nur Tyr122 der β_3 -Untereinheit gezeigt, Der Abstand beträgt etwa 6 Å.

Besonders wertvoll ist das *STD-epitope mapping* bei Rezeptorproteinen, für die *ligand docking* nicht möglich ist. Für ein direktes *modelling* muss neben der Struktur des reinen Proteins auch die Orientierung und die Konformation des gebundenen Liganden bekannt sein. Aber nur sehr selten steht bei Membranrezeptoren die 3D-Struktur des Komplexes mit dem Liganden zur Verfügung und zur Bestimmung des Pharmakophors müssen dann andere Verfahren wie STD-NMR-Spektroskopie angewandt werden.

3.2.5. Titration mit cyclo(RGDfV), PS-Hyp-GDW und cyclo-S-Ac-yRGDC

In einer simultanen Titration mit drei Peptiden sollte die Bindungsaffinität der Liganden an Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in Liposomenmembranen untersucht werden. Dabei wurde für jede Messung ein Ligandgemisch eingesetzt. Die jeweiligen Konzentrationen der Einzelsubstanzen waren gleich. Für den nächsten Messpunkt werden der NMR-Probe jeweils gleiche Mengen der Peptide zugesetzt. Zusätzlich zu cyclo(RGDfV) wurden die Peptide PS-Hyp-GDW und cyclo-S-Ac-yRGDC (Sulfoxid) verwendet (Abbildung 29).

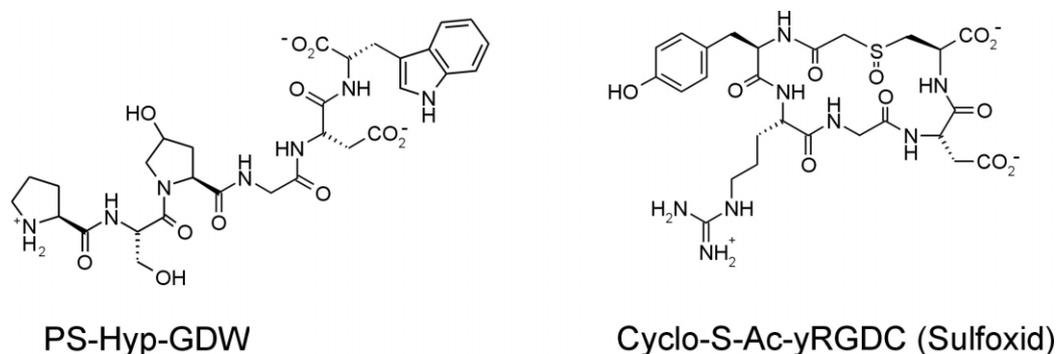


Abbildung 29 Strukturformeln der Peptide PS-Hyp-GDW ($IC_{50} = 0.4\mu M$) und cyclo-S-Ac-yRGDC ($IC_{50} = 0.15\mu M$).^{89, 162} Letzteres liegt in der oxidierten Form als Sulfoxid vor.

Das lineare Hexapeptid PS-Hyp-GDW wurde zuerst von J. Katada, Y. Hayashi *et al.* synthetisiert und untersucht.⁸⁹ Es unterdrückt die Aggregation humaner Thrombozyten ($IC_{50} = 0.4\mu M$) und wirkt als Antagonist des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Außerdem inhibiert es die Bindung des fluoresceinmarkierten RGD-Peptides FITC-WSRGDW an aktivierte Thrombozyten. Die Autoren postulieren, dass PS-Hyp-GDW die gleiche Bindungsstelle besetzt, an der das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ auch andere RGD-Peptide bindet. Wenn das Hyp-GD-Motiv dabei den gleichen Bindungsmodus wie andere RGD-Motive einnimmt, kann der Hyp-Rest nicht die ionische Wechselwirkung mit dem Rezeptor eingehen, die für Arg in der Literatur angenommen wird. Katada und Hayashi zeigten allerdings in einer MMC-Molekülsimulation, dass PSRGDW auch eine Konformation einnehmen kann, in der die N-terminale Iminogruppe des Prolin-Restes einen ähnlichen Abstand zur Asp-Carboxygruppe einnimmt wie die Guanidinogruppe in Arg. Die protonierte Iminogruppe ersetzt in der Integrinbindungstasche dann die Guanidinogruppe des RGD-Motivs. Für diese These der Autoren spricht auch der Verlust der inhibitorischen Aktivität, wenn die N-terminale Iminogruppe acetyliert vorliegt.

Das Sulfoxid des cyclisches Peptid cyclo-S-Ac-yRGDC wurde von Barker *et al.* beschrieben.¹⁶² Dabei wurde das lineare Peptid yRGDC N-terminal mit Bromessigsäure verknüpft und dann durch intramolekulare nukleophile Substitution des Bromatoms durch das Schwefelatom der Cys-Thiolgruppe zum Thioether cyclisiert. Anschließend wurde mit Wasserstoffperoxidlösung zum stabileren Sulfoxid oxidiert. Bezüglich der Inhibition der Thrombozytenaggregation wurde für das Sulfoxid von cyclo-S-Ac-yRGDC eine Aktivität von $IC_{50} = 0.15\mu M$ bestimmt.

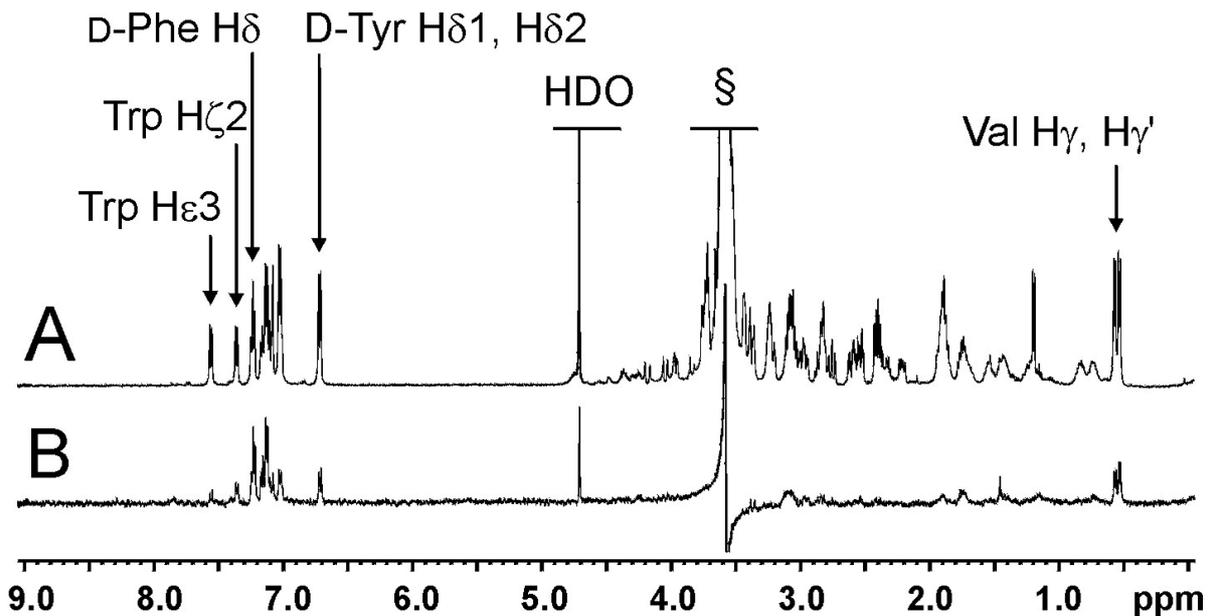


Abbildung 30 (A) ¹H-NMR-Referenzspektrum von cyclo(RGDfV), PS-Hyp-GDW und cyclo-S-Ac-yRGDC (Sulfoxid) (Konzentration jeweils 129 μ M) mit Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ -Liposomen in LUV-NMR-Puffer bei 293 K. Es zeigt die Signale der Liganden und des Tris-Puffers (§). Die Konzentration an Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ betrug 2 μ M und der Ligandüberschuss betrug 62:1. (B) Das STD-NMR Spektrum bei einer *On-Resonance*-Einstrahlfrequenz von 16 ppm und einer *Off-Resonance*-Einstrahlfrequenz von 80 ppm zeigt besonders deutlich und ohne Überlagerung die Signale D-Phe H δ , Val H γ /H γ' (von cyclo(RGDfV)), Trp H ϵ 3, Trp H ζ 2 (von PS-Hyp-GDW) und D-Tyr H δ 1/2 (von cyclo-S-Ac-yRGDC, Sulfoxid). Diese Signale wurden für die Titrationskurve ausgewertet.

Um die Bindungskurve für die ausgewählten Liganden aufnehmen zu können, müssten Konzentrationen deutlich unter 100 μ M vermessen werden; für cyclo-S-Ac-yRGDC (Sulfoxid) sogar Konzentrationen unter 400 nM. Die nötige Experimentdauer für STD-Spektren überschreitet dann 24 Stunden und wäre ohne Cryoprobekopf im Rahmen der begrenzten Lebensdauer der Liposomen nicht sinnvoll. Daher wurde bei viel höheren Ligandkonzentrationen gemessen, für die eine fast oder vollständig gesättigte, waagerechte Bindungskurve erwartet wurde. Die Liganden cyclo(RGDfV), PS-Hyp-GDW und cyclo-S-Ac-yRGDC (Sulfoxid) wurden simultan zu den Liposomen titriert und lagen dadurch in Konzentrationen von 129 μ M, 256 μ M, 505 μ M und 1.01 mM vor. Dies entsprach Ligandüberschüssen von 60:1 bis 480:1. Die NMR-Spektren des ersten Titrationspunktes sind in Abbildung 30 gezeigt. Die Signale D-Phe H δ , Val H γ /H γ' (von cyclo(RGDfV)), Trp H ϵ 3, Trp H ζ 2 (von PS-Hyp-GDW) und D-Tyr H δ 1/H δ 2 (von cyclo-S-Ac-yRGDC (Sulfoxid)) sind ohne Überlagerung im STD-Spektrum sichtbar. Diese Signale wurden für die Titrationskurven ausgewertet.

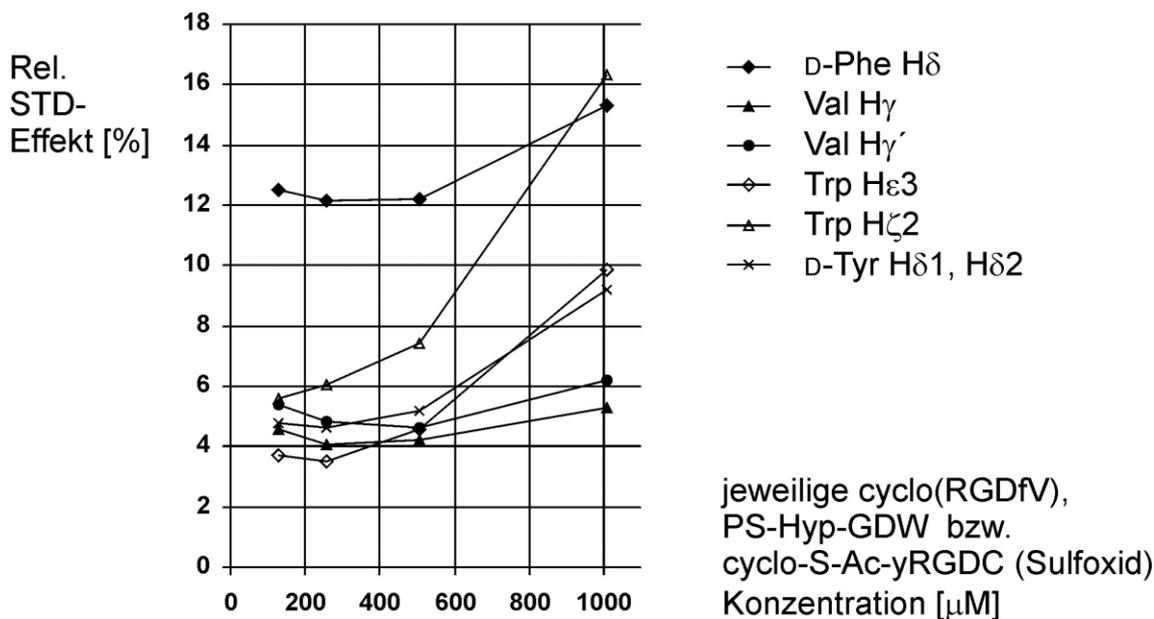


Abbildung 31 Titration der Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Liposomen mit cyclo(RGDfV), PS-Hyp-GDW und cyclo-S-Ac-yRGDC (Sulfoxid). Die NMR-Experimente wurden wie in Abbildung 30 durchgeführt. Die Ligandüberschussfaktoren betragen jeweils 60, 120, 240 und 480. Im Plot sind von cyclo(RGDfV) die Signale D-Phe H δ , Val H γ /H γ' gezeigt, von PS-Hyp-GDW die Signale Trp H ϵ 3, Trp H ζ 2 und von cyclo-S-Ac-yRGDC (Sulfoxid) das Signal D-Tyr H δ 1/H δ 2.

Die Signale D-Phe H δ , Val H γ /H γ' von cyclo(RGDfV) zeigen ein sehr ähnliches Profil, nur das Niveau des STD-Effektes ist unterschiedlich. Im Bereich von 130 μM bis 250 μM fallen die STD-Effekte leicht ab, bleiben im Bereich zwischen 250 μM bis 500 μM etwa konstant und steigen über 500 μM steil an. Im Vergleich dazu zeigen die Protonen D-Tyr H δ 1/H δ 2 von cyclo-S-Ac-yRGDC (Sulfoxid) einen sehr ähnlichen Verlauf im STD-Plot. Der Anstieg im Bereich über 500 μM ist allerdings noch etwas steiler. Der Anstieg der STD-Effekte für das Signal Trp H ϵ 3 von PS-Hyp-GDW setzt im Bereich zwischen 250 μM bis 500 μM ein, für das Proton Trp H ζ 2 sogar ab 129 μM . Der erwartete monotone Abfall aller relativen STD-Effekte ist nur für Konzentrationen bis etwa 250 μM beobachtbar, für das Proton Trp H ζ 2 in dem untersuchten Konzentrationsbereich gar nicht. Bis etwa 500 μM bleiben die STD-Effekte der Liganden konstant und steigen bei höheren Konzentrationen dann steil an. Dies ist überraschend, da bei einer begrenzten Anzahl der Bindungsstellen der gebundene Anteil der Ligandmoleküle immer kleiner wird. Mit steigender Konzentration wird der Anteil der Moleküle, die über den Rezeptor gesättigt werden, kleiner und der relative STD-Effekt sinkt deshalb ab. Bei der Titration der Integrinliposomen nur mit cyclo(RGDfV) konnte ein konstanter STD-Effekt immerhin bis in den Konzentrationsbereich von 1.0 – 1.5 mM hinein beobachtet werden, darüber stiegen die STD-Effekte leicht an (siehe Abbildung 22, Seite 63). Bei der simultanen Titration von cyclo(RGDfV), PS-Hyp-GDW und cyclo-S-Ac-yRGDC (Sulfoxid) hingegen setzte eine

unspezifische Bindung aller drei Liganden bereits im Bereich zwischen 250 μM und 500 μM ein. Die Tendenz zur unspezifischen Assoziation des cyclo(RGDfV) wurde durch die Anwesenheit von PS-Hyp-GDW und cyclo-S-Ac-yRGDC (Sulfoxid) deutlich verstärkt. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass bei dieser simultanen Titration die jeweilige Gesamtkonzentration der drei Liganden dreifach höher war und die Ligandmoleküle auch untereinander in Form gemischter Aggregate in Wechselwirkung treten konnten. Der frühere und steilere Anstieg des STD-Plots für die Resonanzen von PS-Hyp-GDW im Vergleich zu cyclo(RGDfV) ist ein Hinweis auf die deutlich ausgeprägtere Assoziationsneigung dieses Peptides. Der Ligand cyclo-S-Ac-yRGDC (Sulfoxid) nimmt hinsichtlich seiner Tendenz zur unspezifischen Bindung eine mittlere Position ein.

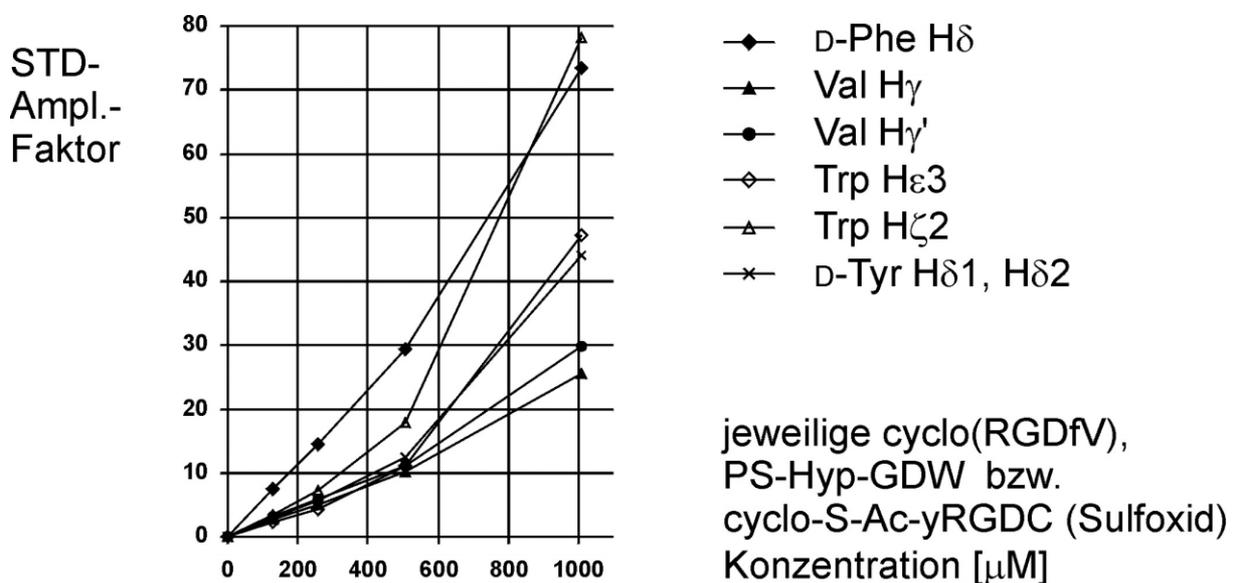


Abbildung 32 Titration der Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ -Liposomen mit cyclo(RGDfV), PS-Hyp-GDW und cyclo-S-Ac-yRGDC (Sulfoxid). Die relativen STD-Effekte aus Abbildung 31 wurden in STD-Amplifikationsfaktoren umgerechnet und gegen die Konzentration aufgetragen.

Zu den STD-Werten aus Abbildung 31 wurden die STD-Amplifikationsfaktoren berechnet und in Abbildung 32 gegen die Ligandkonzentration aufgetragen. Es wurden allerdings keine Sättigungskurven erhalten, die sich bei höheren Konzentrationen einem Grenzwert annähern, oder deren Steigung abnimmt. Die Graphen der STD-Amplifikationsfaktoren in Abbildung 32 zeigen bis 500 μM einen etwa konstanten Anstieg. Über 500 μM nimmt die Steigung zu.

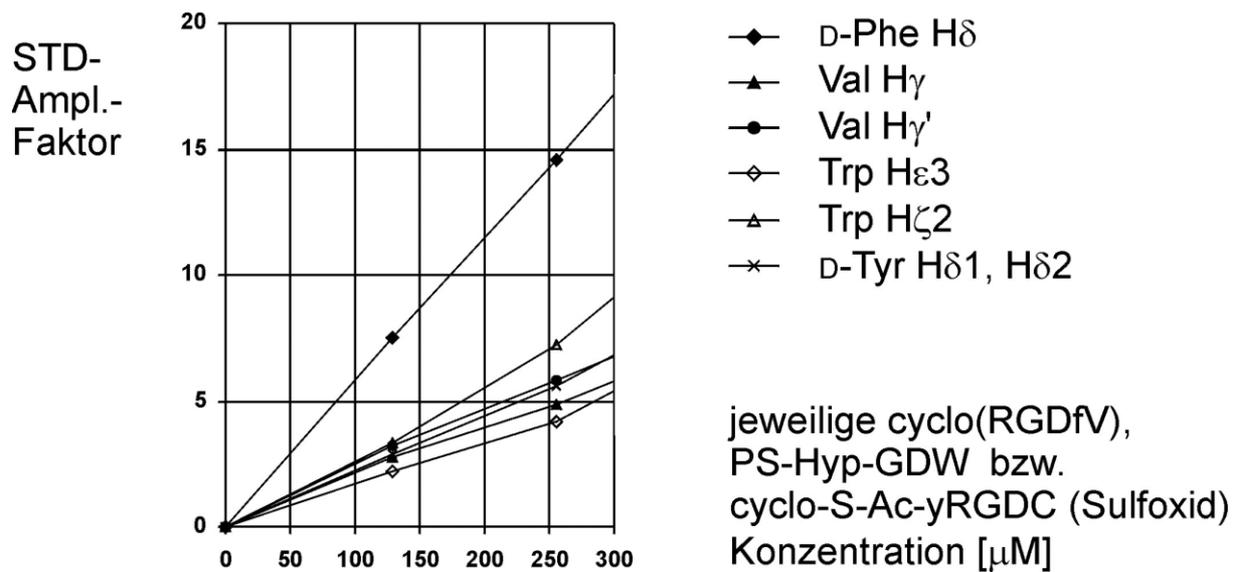


Abbildung 33 Vergrößerter Ausschnitt von Abbildung 32. Titration der Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ -Liposomen mit cyclo(RGDfV), PS-Hyp-GDW und cyclo-S-Ac-yRGDC (Sulfoxid). Es sind die STD-Amplifikationsfaktoren gegen die Konzentration aufgetragen.

Der initiale Anstieg im Bereich kleinerer Ligandkonzentrationen ist bei einem stärkeren Liganden steiler, da die Bindungskurve früher den maximalen STD-Amplifikationsfaktor erreicht. Dieser Bereich der Graphen mit Konzentrationen von 0 – 300 μ M ist in Abbildung 33 vergrößert dargestellt, lässt aber keinen Vergleich der Peptide hinsichtlich ihrer Inhibitorstärke zu. Die Steigungen sind nicht signifikant unterschiedlich, lediglich die Kurve für das Signal von D-Phe H δ verläuft deutlich steiler aufgrund der größeren relativen STD-Effekte. Da laut der Literaturdaten die Dissoziationskonstanten der drei Peptide unter 50 μ M liegen, für PS-Hyp-GDW und cyclo-S-Ac-yRGDC (Sulfoxid) sogar unter 1 μ M, lassen nur Titrationsmesspunkte in diesen Konzentrationsbereichen auf die Ligandaffinität schließen. Eine Analyse der Steigungen und der Krümmungen für die Bindungskurven ließe dann den Vergleich der Dissoziationskonstanten für die jeweiligen Peptide zu. Die spezifische Sättigung der Bindungsstellen ist beim ersten Messpunkt in Abbildung 33 (129 μ M) anscheinend schon abgeschlossen.

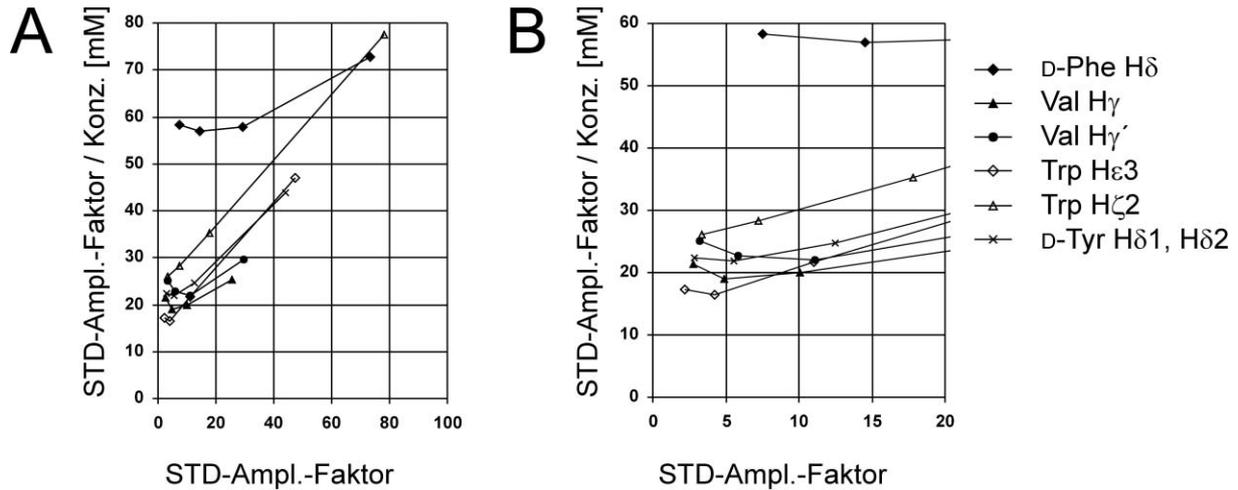


Abbildung 34 (A) Titration der Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ -Liposomen mit cyclo(RGDfV), PS-Hyp-GDW und cyclo-S-Ac-yRGDC (Sulfoxid). Die in Abbildung 32 dargestellten STD-Amplifikationsfaktoren wurden als Scatchard-Plot dargestellt. Der Quotient von STD-Amplifikationsfaktor und Ligandkonzentration wurde dazu jeweils gegen den STD-Amplifikationsfaktor aufgetragen. (B) Vergrößerter Ausschnitt von A.

Um einen Eindruck vom Übergang der spezifischen Sättigung in eine unspezifische Bindung zu erhalten, wurden die Kurven in Abbildung 32 und Abbildung 33 noch einer Scatchard-Analyse unterzogen. In Abbildung 34 sind die STD-Amplifikationsfaktoren der drei Peptide zur Abschätzung der Bindungskonstanten als Scatchard-Graph dargestellt. Der Quotient von STD-Amplifikationsfaktor und Ligandkonzentration wurde dazu jeweils gegen den STD-Amplifikationsfaktor aufgetragen. Die Scatchard-Graphen in Abbildung 34A zeigen nicht den typischen, linear abfallenden Verlauf. Außer für das Signal Trp H ζ 2 zeigen jeweils die ersten zwei Wertepaare eine negative Steigung, mit der die Bindungskonstante K_D abgeschätzt werden kann.

Tabelle 2 Titration der Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ -Liposomen mit cyclo(RGDfV), PS-Hyp-GDW und cyclo-S-Ac-yRGDC (Sulfoxid). Mit den ersten zwei Wertepaaren wurde für jeden Scatchard-Graphen aus Abbildung 34 die Steigung und die Bindungskonstante K_D berechnet.

Peptid	Protonen	K_D [mM]
cyclo(RGDfV)	D-Phe H δ	5.2
cyclo(RGDfV)	Val H γ	0.9
cyclo(RGDfV)	Val H γ'	1.1
PS-Hyp-GDW	Trp H ϵ 3	2.4
PS-Hyp-GDW	Trp H ζ 2	- 1.8
cyclo-S-Ac-yRGDC (Sulfoxid)	D-Tyr H δ 1 / H δ 2	4.8

Der K_D -Wert für das Signal Trp H ζ 2 ist negativ aufgrund des steigenden STD-Effektes bei Erhöhung der Konzentration. Die K_D -Werte für die anderen Signale bewegen sich etwa im Bereich zwischen 1 mM und 5 mM. Der Vergleich der K_D -Werte für die einzelnen Peptide ergibt keine signifikanten Unterschiede. Die Rangfolge der Ligandstärke aus den Literaturdaten (siehe Abbildung 16 und Abbildung 29) wird mit den berechneten K_D -Werten in Tabelle 2 nicht wiedergegeben. Diese Ergebnisse zeigen, dass die spezifische Sättigung der Rezeptorbindungsstellen für alle drei Peptide bei der niedrigsten gemessenen Konzentration 130 nM bereits erreicht ist. Das Wiederansteigen der jeweiligen Scatchard-Graphen in einem Konzentrationsbereich zwischen 250 μ M und 500 μ M beruht auf einer unspezifischen, nicht-sättigbaren Bindung.

3.3. NMR-Experimente mit humanen Thrombozyten

3.3.1. Die Stabilität linearer und cyclischer Peptide

Für die NMR-Messungen mit intakten humanen Thrombozyten wurden Thrombozytenkonzentrate benutzt, die für Transfusionszwecke nicht mehr geeignet waren. Die Thrombozyten müssen zuerst durch mehrmaliges Sedimentieren durch Zentrifugation und anschließendes Resuspendieren in deuteriertem TBS-Puffer gewaschen werden. Dabei werden Blutplasmabestandteile sowie die bei der Prozessierung zugesetzte Substanzen wie Citratpuffer und Glucose entfernt. Die präparierten NMR-Proben enthalten $2.7 - 6.0 \times 10^9$ Thrombozyten. Dies entspricht einer jeweiligen Menge von 0.22 – 0.50 nmol Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Dem NMR-Puffer ist zur irreversiblen Inhibition von Cystein- und Serinproteasen 1 mM 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid-Hydrochlorid (AEBSF-HCl) zugesetzt worden. Lösliche Proteasen werden sowohl beim Umpuffern als auch bei den NMR-Messungen durch Lyse der Zellen freigesetzt. Metalloproteasen und membrangebundene Aminopeptidasen hingegen werden durch AEBSF-HCl nicht deaktiviert und können zur Proteolyse von Ligandpeptiden oder zum Abbau der Integrinmoleküle führen.

Bei NMR-Experimenten mit dem linearen Peptid RGD als Liganden zeigte sich durch Integration der Signale der Asp H β -Protonen, dass bei einer Proben temperatur von 283 K die Halbwertszeit dieses Peptides in der präparierten Thrombozytensuspension nur vier bis fünf Stunden beträgt (Daten nicht gezeigt). Daraufhin wurde das Peptid PS-Hyp-GDW auf seine Stabilität unter diesen Bedingungen untersucht. Innerhalb von fünf Stunden war eine durchschnittliche Abnahme der Peptidkonzentration um 8 % durch Integration der Signale der Protonen Trp H δ 1 und Trp ζ 3 festgestellt worden. Ganz grob lässt sich hieraus eine Halbwertszeit dieses Peptides mit humanen Thrombozyten in deuteriertem TBS-Puffer von 30 – 40 Stunden abschätzen. Generell sind lineare Peptide ohne unnatürliche Aminosäuren in

der Thrombozytensuspension nicht stabil, und die Messzeiten sollten im Vergleich zur Halbwertszeit sehr kurz sein. Im Vergleich zu den linearen Peptiden wurde bei den cyclischen Peptiden cyclo(RGDfV) und cyclo(GRGDSPA) kein messbarer Zerfall beobachtet.

3.3.2. Sättigungsaufbau für thrombozytenspezifische NMR-Signale

Anhand einer NMR-Probe mit 2.7×10^9 Thrombozyten, AEBSF-HCl (1 mM) und cyclo(GRGDSPA) in einer Konzentration von 224 μM wurde zunächst der Sättigungsaufbau für verschiedene breite Resonanzen der Zellbestandteile untersucht. Ziel war es dabei, durch Aufnahme mehrerer STD-Spektren mit jeweils unterschiedlicher Sättigungszeit t_{sat} die zeitliche Veränderung der STD-Intensität im Verlauf der Sättigungszeit zu beschreiben. Dadurch könnten Informationen über die Proteine in der Zelle gewonnen werden.

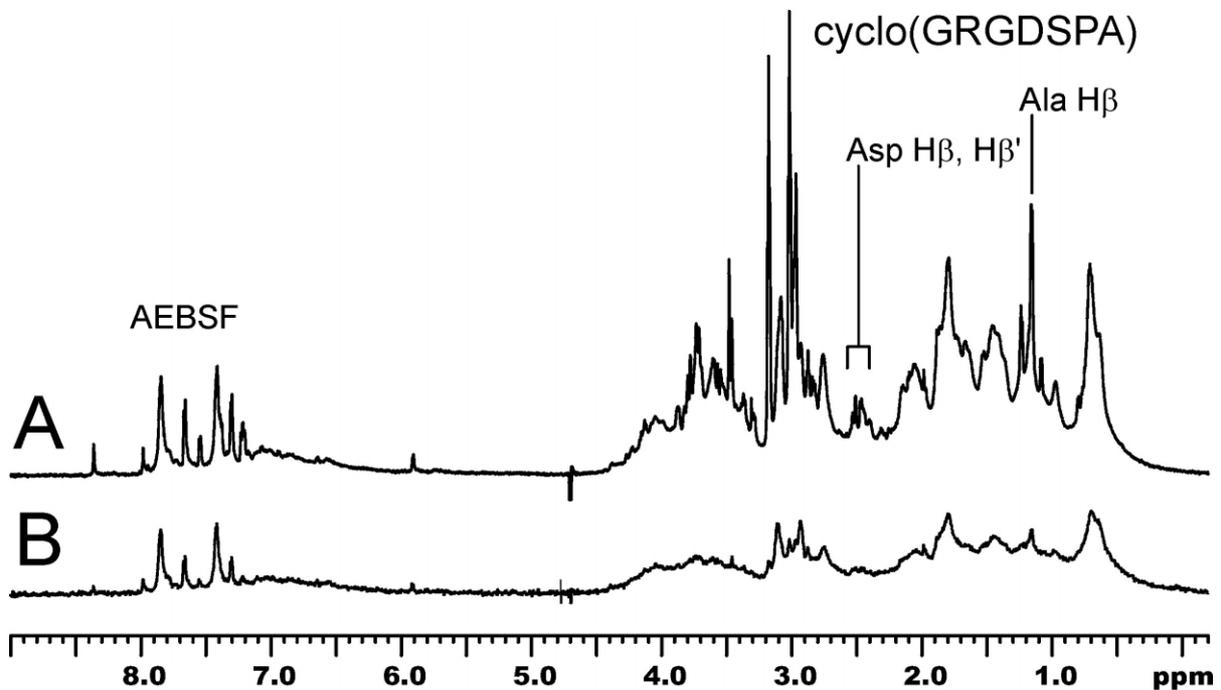


Abbildung 35 (A) ¹H-NMR-Referenzspektrum (700 MHz) von cyclo(GRGDSPA) (224 μM) mit 2.7×10^9 Thrombozyten in deuteriertem TBS-Puffer mit AEBSF-HCl (1 mM) bei 283 K. Die Konzentration an Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Bindungsstellen beträgt ca. 340 nM. Neben den Resonanzen von hoch- und niedermolekularen Zellbestandteilen sind auch einige Ligandsignale und die Signale von AEBSF sowie seiner Reaktionsprodukte zu erkennen. (B) Das STD-Spektrum der NMR-Probe zeigt die Signale des Liganden und der Zellbestandteile. *On-Resonance*-Einstrahlung bei 0 ppm, *Off-Resonance*-Einstrahlung bei 114 ppm, Sättigungszeit 4.08 s.

Bei einer Gesamtmasse eines Thrombozyten von 6 pg und einem Wassergehalt von 60 % beträgt der Massenanteil des gesamten Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ nur etwa 1 %. Das NMR-Spektrum der Zelle wird also durch eine Vielzahl verschiedener Biomoleküle wie Proteine, Nucleinsäuren,

Glycane und Lipide dominiert. Außerdem sind im Plasma kleine Moleküle wie Oligosaccharide, Nucleotide, Aminosäuren sowie anderer Stoffwechselprodukte enthalten. Durch NMR-spektroskopische Untersuchung der Diffusion und der Relaxation in verschiedenen Zellarten wurde gezeigt, dass die Diffusions- und Korrelationszeiten für Proteine und für kleine Moleküle nur etwa doppelt so groß wie in der freien Lösung sind.¹⁶⁴ Trotzdem weisen auch kleine zytosolische Moleküle aufgrund von Suszeptibilitätseffekten und Feldinhomogenitäten stark verbreiterte NMR-Signale auf. Allein anhand der NMR-Signale können also niedermolekulare Verbindungen im Zellinneren nicht von Makromolekülen unterschieden werden. Das NMR-Spektrum in Abbildung 35 A zeigt außer einigen sehr schmalen Signalen des Liganden und der anderen niedermolekularen Verbindungen im Puffer eine breite NMR-Hüllkurve. In dieser sind einige Anteile mit geringerer Linienbreite von circa 100 Hz enthalten. Im STD-Spektrum (Abbildung 35B) sind neben den Signalen von cyclo(GRGDSPA) und AEBSF praktisch nur breite Signale zu erkennen. Der Sättigungsaufbau wurde nun für die spektralen Regionen 0.5 – 0.9 ppm, 1.3 – 1.6 ppm, 2.5 – 4.5 ppm und 6.0 – 8.0 ppm getrennt untersucht. Der relative Sättigungseffekt konnte mit guter Genauigkeit aus dem Skalierungsfaktor bei der Überlagerung und Anpassung des Referenzspektrums (Abbildung 35A) an das jeweilige STD-Spektrum ermittelt werden. Für die beiden letzten, breiten Bereiche war dabei lediglich die Hüllkurve ausschlaggebend; überstehende schmale Signale wurden ignoriert. Die STD-Spektren wurden mit verschiedenen langen Sättigungssequenzen aufgenommen. Eine Anzahl der Gauß-Impulse von fünf bis 160 führte zu Sättigungszeiten von 0.26 s bis 8.16 s.

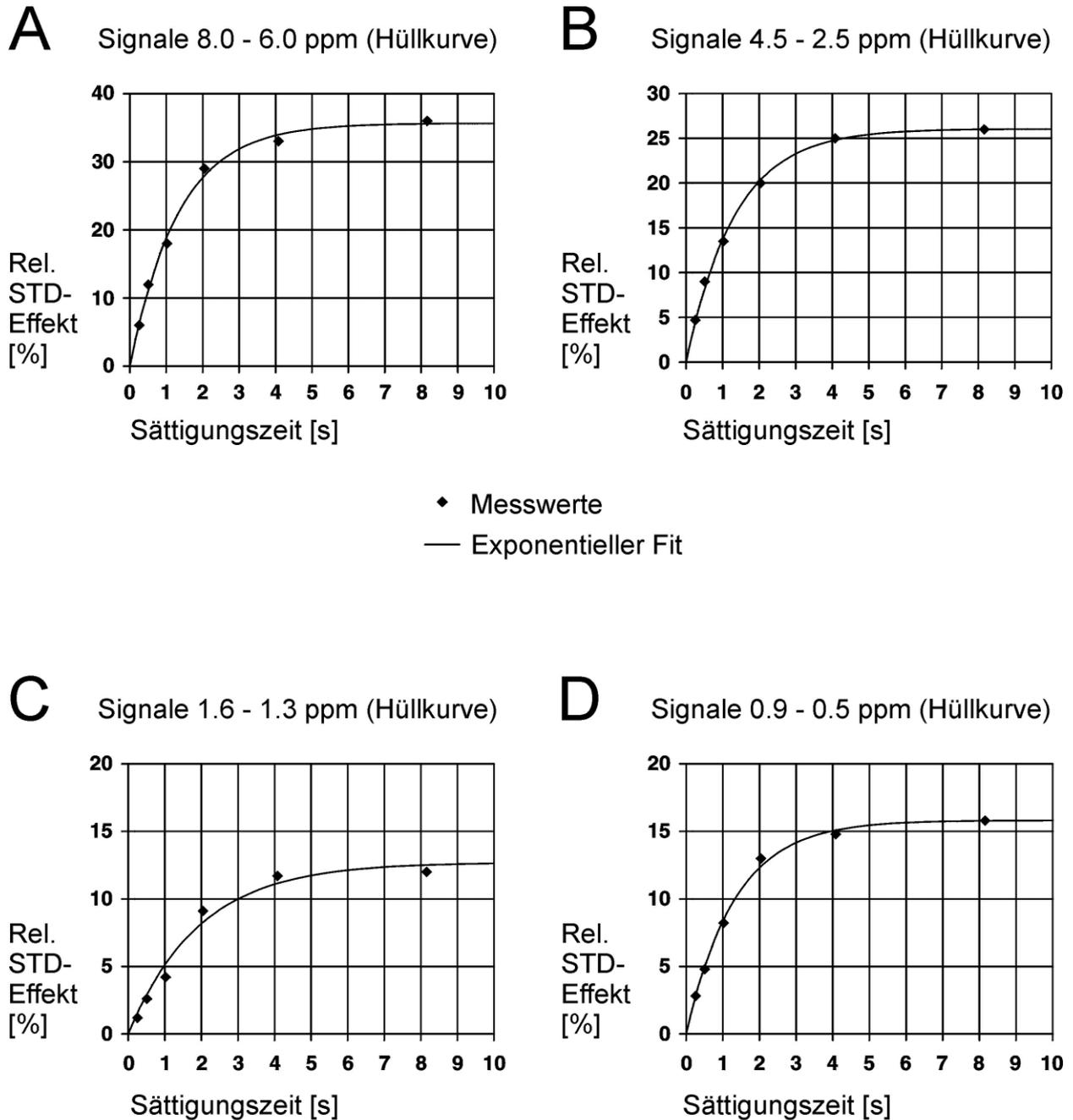


Abbildung 36 STD-Aufbaukurven verschiedener Spektralbereiche für die NMR-Probe aus **Abbildung 35** mit 2.7×10^9 Thrombozyten und *cyclo*(GRGDSPA) (224 μ M). Die STD-Spektren wurden jeweils gemessen mit Sättigungszeiten t_{sat} von 0.26 s bis 8.16 s. Jeder Messreihe wurde jeweils eine einfachexponentielle Aufbaufunktion (Gleichung 11) angepasst. *On-Resonance*-Einstrahlung bei 0 ppm, *Off-Resonance*-Einstrahlung bei 114 ppm. (A) 6.0 – 8.0 ppm. (B) 2.5 – 4.5 ppm. (C) 1.3 – 1.6 ppm. (D) 0.5 – 0.9 ppm.

Für jede Spektralregion wurden die jeweiligen relativen Sättigungseffekte zu den verschiedenen Sättigungszeiten in einem Graphen aufgetragen. An jede Messreihe in **Abbildung 36** wurde die einfachexponentielle Aufbaufunktion (exponentielle Funktion erster Ordnung) aus **Gleichung 11** angepasst.

$$\text{STD} = \text{STD}_{\max} \cdot (1 - e^{-k_{\text{sat}} \cdot t_{\text{sat}}}) \quad (11)$$

Die so erhaltenen Anpassungsparameter STD_{\max} und k_{sat} , sowie die Korrelationsparameter R^2 und χ^2 sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Die Sättigungszeit für den halbmaximalen STD-Effekt $\ln 2 / k_{\text{sat}}$ oder Halbwertszeit $t_{0,5}$ entspricht der detektierbaren Relaxationszeit T_{2p}^* für einen Sättigungsprozess. Sie enthält neben der transversalen Relaxationszeit T_2 , die auf dipolaren Wechselwirkungen beruht, auch einen Inhomogenitätsanteil, dessen Größe nicht separat bestimmt werden kann.

Tabelle 3 Anpassungsparameter STD_{\max} und k_{sat} nach Gleichung 11, die Sättigungszeit für den halbmaximalen STD-Effekt $\ln 2 / k_{\text{sat}}$ (Relaxationszeit T_{2p}^*) sowie die Korrelationsparameter R^2 und χ^2 zu den STD-Aufbaukurven in Abbildung 36.

Diagramm in Abb. 35	NMR-Region [ppm]	STD_{\max} [%]	k_{sat} [1/s]	$\ln 2 / k_{\text{sat}}$ [s]	R^2	χ^2
(A)	6.0 – 8.0	35.64	0.748	0.926	0.9966	0.7908
(B)	2.5 – 4.5	26.04	0.745	0.930	0.9985	0.1790
(C)	1.3 – 1.6	12.70	0.515	1.347	0.9834	0.5036
(D)	0.5 – 0.9	15.82	0.752	0.922	0.9976	0.1126

Für drei Kurven in Abbildung 36 liegt der Korrelationskoeffizient R^2 deutlich über 0.99. Für den Sättigungsaufbau mit steigender Sättigungszeit ist also der einfachexponentielle Aufbau nach Gleichung 11 ein sehr gutes Modell. Die aus dem Parameter k_{sat} bestimmten Sättigungszeiten für den halbmaximalen STD-Effekt der Kurven (Relaxationszeit T_{2p}^*) sind mit Werten von etwa einer Sekunde allerdings für Makromoleküle viel zu lang. Aufgrund der Geschwindigkeit und Effektivität der Spindiffusion wird in Proteinen wie dem Lektin RCA_{120} oft schon nach 100 ms die halbmaximale Sättigung erreicht.¹⁴⁴ Die STD-Aufbaukurven in Abbildung 36 repräsentieren also kleine Moleküle, deren Signale aufgrund von Suszeptibilitätseffekten verbreitert sind, und deren Protonen in den Spektren von Abbildung 35 den größten Teil der Signalintensität beisteuern. Um zu überprüfen, ob für die Daten in Abbildung 36 ein gemischtexponentieller Aufbau gemäß Gleichung 12 besser als Modell geeignet ist, wurde auch diese Funktion an die Messwerte angepasst (Daten nicht gezeigt).

$$\text{STD} = \text{STD1}_{\max} \cdot (1 - e^{-k1_{\text{sat}} \cdot t_{\text{sat}}}) + \text{STD2}_{\max} \cdot (1 - e^{-k2_{\text{sat}} \cdot t_{\text{sat}}}) \quad (12)$$

Die erhaltenen Korrelationsparameter R^2 und χ^2 belegten aber eine eindeutig schlechtere Übereinstimmung mit den Daten als Gleichung 11. Obwohl die gemessenen STD-Effekte sicherlich eine Summation über verschiedene Verbindungen mit unterschiedlichen Aufbaufunktionen darstellen, dominieren Moleküle mit langsamen Sättigungsaufbau. Der Beitrag durch Proteinprotonen zur beobachteten NMR-Hüllkurve ist also sehr klein.

3.3.3. Aufbau des NMR-Sättigungstransfers für cyclo(GRGDSPA)

Der Aufbau des STD-Effektes für Ligandsignale ist im Allgemeinen durch einen verzögerten Sättigungstransfer und durch eine langsamere Relaxation im dissoziierten Zustand charakterisiert.

Für die NMR-Probe mit 2.7×10^9 Thrombozyten und $224 \mu\text{M}$ cyclo(GRGDSPA) wurde für die Signale Asp H β /H β' und Ala H β des Liganden die Zeitabhängigkeit des Sättigungstransfers analysiert. Mit dieser NMR-Probe sind die im vorigen Kapitel (Kapitel 3.3.2) beschriebenen Experimente zum Sättigungsaufbau für breite Resonanzen der Zellbestandteile ausgeführt worden. Das Signal von Ala H β und die zu tiefem Feld verschoben gelegene Verunreinigung zeigen jeweils eine Schulter. Dabei handelt es sich um breite Thrombozytensignale, die auch in den STD-Spektren Effekte aufweisen.

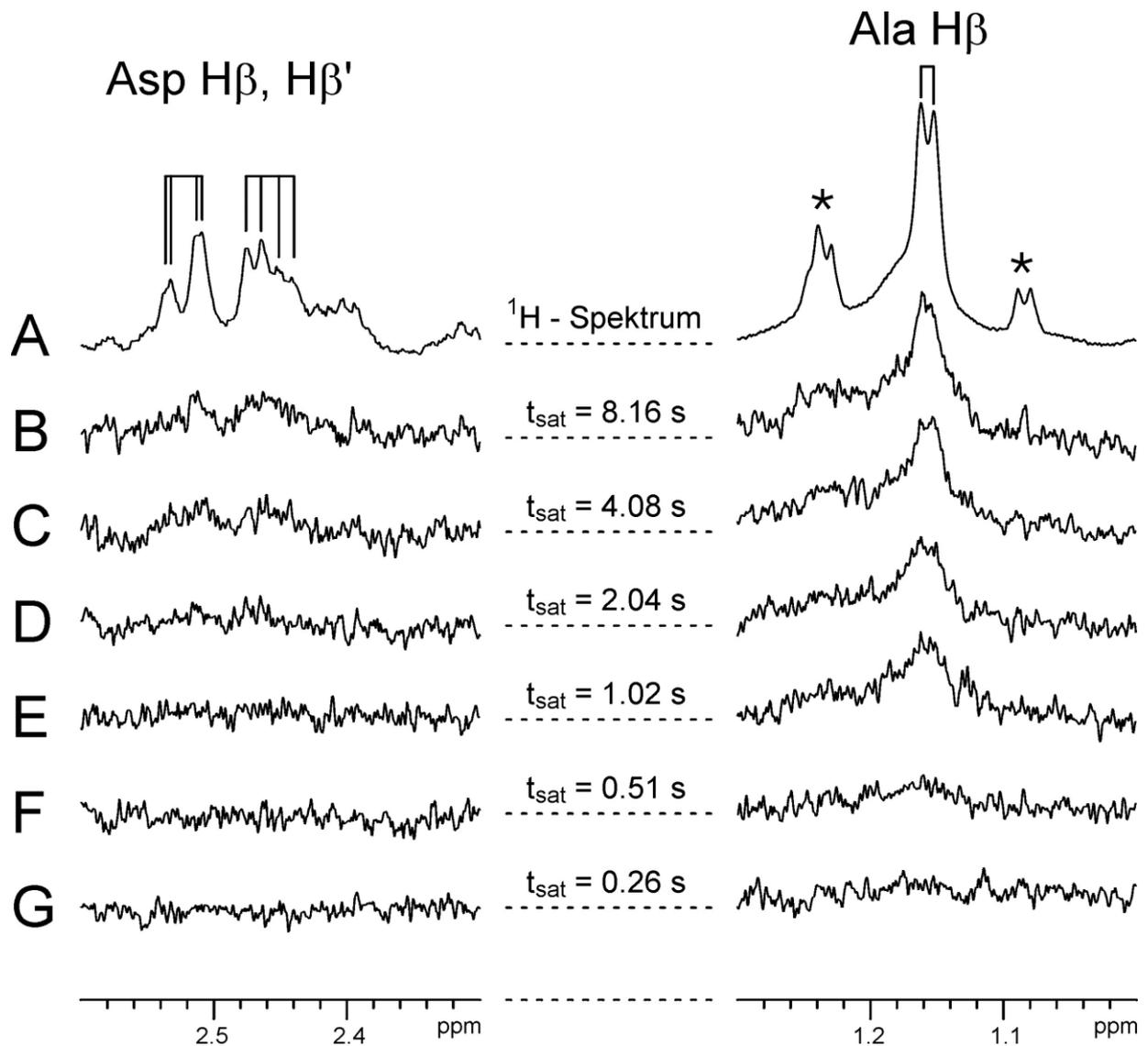


Abbildung 37 (A) ^1H -NMR-Referenzspektrum (700 MHz) von cyclo(GRGDSPA) ($224 \mu\text{M}$) mit 2.7×10^9 Thrombozyten in deuteriertem TBS-Puffer mit AEBSF-HCl (1 mM) bei 283 K. Die Konzentration an Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Bindungsstellen beträgt ca. 340 nM. Gezeigt sind zwei Ausschnitte mit den Regionen der Signale Asp H β /H β' und Ala H β . Es sind Verunreinigungen enthalten (*). (B)–(G) Die STD-Spektren wurden jeweils mit Sättigungszeiten t_{sat} von 0.26 s bis 8.16 s aufgenommen. *On-Resonance*-Einstrahlung bei 0 ppm, *Off-Resonance*-Einstrahlung bei 114 ppm.

Die 1D- ^1H -Spektren und die STD-Spektren der beiden Signale sind in Abbildung 37 gezeigt. Wie für die Abbildung 36 wurden die STD-Spektren mit Sättigungszeiten t_{sat} von 0.26 s bis 8.16 s ausgewertet. Die graphischen Darstellungen der jeweiligen STD-Effekte sind als STD-Aufbaukurven in Abbildung 38 gezeigt.

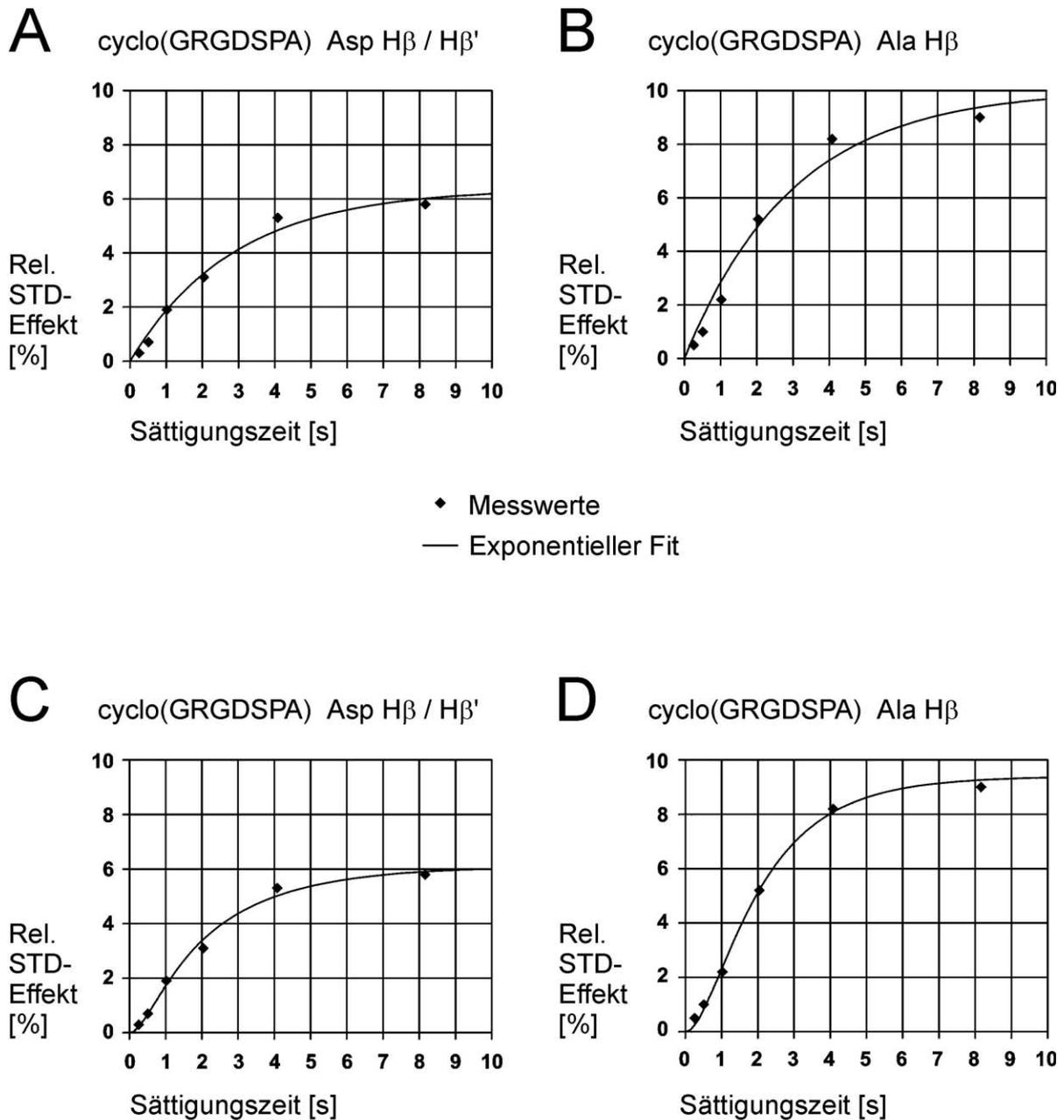


Abbildung 38 STD-Aufbaukurven der Signale Asp H β / H β ' und Ala H β zu den NMR-Spektren aus **Abbildung 35** und **Abbildung 37**. Die Probe enthielt 2.7×10^9 Thrombozyten mit cyclo(GRGDSPA) (224 μ M) in deuteriertem TBS-Puffer und AEBSF-HCl (1 mM). (A), (B) In den beiden Messreihen für die Signale Asp H β / H β ' und Ala H β wurde jeweils die einfachexponentielle Aufbaufunktion Gleichung 11 angepasst. (C), (D) An die gleichen Messwerte wie in A und B wurde jeweils die doppeltexponentielle Aufbaufunktion Gleichung 13 angepasst.

Die beiden Messreihen für die Signale Asp H β / H β ' und Ala H β zeigen im Ursprung des Graphen einen nichtlinearen, leicht verzögerten Anstieg. Deswegen wurde an die Daten nicht nur die einfachexponentielle Aufbaufunktion Gleichung 11 (**Abbildung 38A** und **B**) sondern auch eine Funktion mit sigmoiden Verlauf angepasst (**Abbildung 38C** und **D**). Es wurden dazu die gleichen Messwerte wie in A und B, aber die doppeltexponentielle Aufbaufunktion

in Gleichung 13 verwendet.

$$\text{STD} = \text{STD}_{\max} \cdot (1 - e^{-k1_{\text{sat}} \cdot t_{\text{sat}}}) \cdot (1 - e^{-k2_{\text{sat}} \cdot t_{\text{sat}}}) \quad (13)$$

Diese Funktion dient als Modell für den indirekten Sättigungstransfer von Proteinprotonen über andere Ligandprotonen auf die beobachteten Ligandprotonen. Vergleichbar mit der Bildung eines chemischen Folgeproduktes aus einem Zwischenprodukt ist die Quelle zur Sättigung des beobachteten Protons nicht konstant, sondern wird im Verlauf der Sättigungszeit erst aufgefüllt. In diesem zweistufigen Sättigungstransfer repräsentieren die beiden Parameter $k1_{\text{sat}}$ und $k2_{\text{sat}}$ die jeweiligen Geschwindigkeiten der Sättigungsübertragung. Die für beide Anpassungsfunktionen erhaltenen Anpassungsparameter STD_{\max} , k_{sat} , $k1_{\text{sat}}$, $k2_{\text{sat}}$, die Sättigungszeit für den halbmaximalen STD-Effekt $\ln 2/k_{\text{sat}}$ sowie die Korrelationsparameter R^2 und χ^2 sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 4 Anpassungsparameter STD_{\max} und k_{sat} nach Gleichung 11, die Sättigungszeit für den halbmaximalen STD-Effekt $\ln 2/k_{\text{sat}}$ (Relaxationszeit T_{2p}^*) sowie die Korrelationsparameter R^2 und χ^2 zu den STD-Aufbaukurven in Abbildung 38A und B.

Diagramm in Abb. 37	NMR-Signal	STD_{\max} [%]	k_{sat} [1/s]	$\ln 2/k_{\text{sat}}$ [s]	R^2	χ^2
(A)	Asp H β / H β'	10.04	0.333	2.082	0.9802	0.3328
(B)	Ala H β	6.38	0.348	1.991	0.9865	0.0909

Tabelle 5 Anpassungsparameter STD_{\max} , $k1_{\text{sat}}$ und $k2_{\text{sat}}$ nach Gleichung 13 sowie die Korrelationsparameter R^2 und χ^2 zu den STD-Aufbaukurven in Abbildung 38C und D.

Diagramm in Abb. 37	NMR-Signal	STD_{\max} [%]	$k1_{\text{sat}}$ [1/s]	$k2_{\text{sat}}$ [1/s]	R^2	χ^2
(C)	Asp H β / H β'	9.13	0.695	0.695	0.9983	0.0350
(D)	Ala H β	6.09	0.427	1.659	0.9935	0.0552

Die Korrelationskoeffizienten R^2 in Tabelle 5 bezüglich der doppelte exponentiellen Anpassungsfunktion (Gleichung 13) liegen deutlich über den jeweiligen Korrelationskoeffizienten R^2 in Tabelle 4. Die doppelte exponentielle Funktion stellt also das geeignetere Modell für den indirekten Sättigungstransfer auf die Protonen Asp H β /H β' und Ala H β des Liganden cyclo(GRGDSPA) dar und beschreibt den verzögerten Anstieg der STD-Aufbaukurve richtig.

Die gute Korrelation der angepassten STD-Aufbaukurven mit den Daten in Abbildung 38C und D beweist auch, dass die Intensität von NMR-Signalen auch bei einem sehr schlechten Signal-Rausch-Verhältnis zuverlässig bestimmt werden kann. Obwohl bei Sättigungszeiten unter einer Sekunde (Abbildung 37F und G) die absoluten STD-Effekte extrem klein sind, beschreibt die jeweils angepasste Funktion auch diese Messpunkte sehr gut. Die gute Korrelation zeigt weiterhin, dass ein intensiver Untergrund aus breiten Signalen die Intensitätsbestimmung beim beobachteten Signal praktisch nicht stört, und dass in vielen Fällen auf einen Spinlockimpuls ($T_{1\rho}$ -Filter) verzichtet werden kann.

3.3.4. NMR-Experimente mit Thrombozyten in TBS-Puffer

Für Bindungsstudien mit den gewaschenen Thrombozyten in deuteriertem TBS-Puffer wurde eine NMR-Probe aus 6.0×10^9 Thrombozyten mit $240 \mu\text{M}$ cyclo(RGDfV) für NMR-Messungen bei 283 K präpariert. In diesen Experimenten sollte eine direkte, spezifische Bindung des Liganden an natives, zellulär exprimiertes Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ nachgewiesen werden. Bei einer Konzentration der Rezeptorbindungsstellen von ca. 750 nM beträgt der Ligandüberschuss 320:1. Das ^1H -NMR-Referenzspektrum in Abbildung 39A zeigt neben den Resonanzen von hoch- und niedermolekularen Zellbestandteilen auch die Signale der Ligandprotonen D-Phe H δ /H ϵ /H ζ , Asp H β /H β' und Val H γ /H γ' . Das STD-Spektrum Abbildung 39B der NMR-Probe zeigt die Signale des Liganden und einige sehr breite Resonanzen von Zellbestandteilen. Die schmalen Signale aller anderen kleinen Moleküle und ein großer Teil der leicht verbreiterten Signale des Zytoplasmas sind durch Subtraktion verschwunden. Da der Anteil des Integrins $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ an den exprimierten Integrinmolekülen auf der Thrombozytenoberfläche mehr als 95 % beträgt, sind die STD-Signale auf die spezifische Bindung des Liganden an das Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ zurückzuführen.

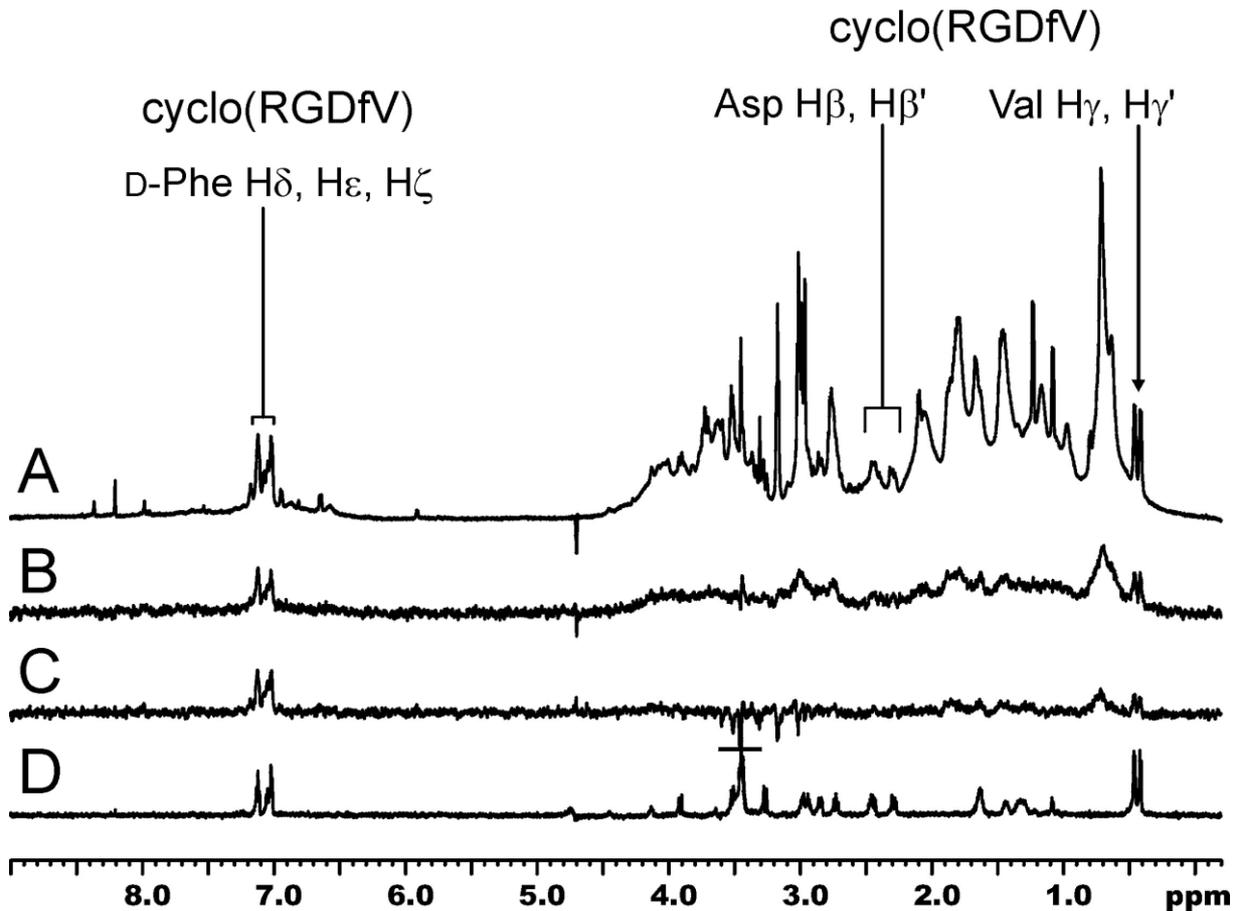


Abbildung 39 (A) ^1H -NMR-Referenzspektrum (700 MHz) von 6.0×10^9 Thrombozyten mit cyclo(RGDfV) ($240 \mu\text{M}$) in deuteriertem TBS-Puffer bei 283 K. Die Konzentration an Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Bindungsstellen beträgt ca. 750 nM. Neben den Resonanzen von hoch- und niedermolekularen Zellbestandteilen sind auch die Signale der Ligandprotonen D-Phe $\text{H}\delta/\text{H}\epsilon/\text{H}\zeta$, Asp $\text{H}\beta/\text{H}\beta'$ und Val $\text{H}\gamma/\text{H}\gamma'$ zu erkennen. (B) Das STD-Spektrum der NMR-Probe zeigt die Signale des Liganden und einiger Zellbestandteile. *On-Resonance*-Einstrahlung bei -1.1 ppm, *Off-Resonance*-Einstrahlung bei 114 ppm, Sättigungszeit 1.02 s. (C) Wie B aber mit einem 30 ms Spinlockimpuls ($T_{1\rho}$ -Filter). (D) ^1H -Vergleichsspektrum von $60 \mu\text{M}$ cyclo(RGDfV) ohne Thrombozyten in deuteriertem TBS-Puffer bei 283 K.

Die *On*- bzw. *Off-Resonance*-Einstrahlung erfolgte während einer Sättigungszeit von 1.02 s jeweils bei -1.1 ppm und 114 ppm. Das STD-Experiment wurde ohne Spinlockimpuls aufgenommen und die Gesamtdauer betrug 14 Minuten. Derartig schnelle Messungen sind besonders dann wichtig, wenn das Verfahren auf eine Reihe von Liganden oder Substanzmischungen angewendet werden soll (*focused screening*).

In Abbildung 40 und 41 sind von den beiden Spektren die gedehnten Regionen der Ligandprotonen D-Phe $\text{H}\delta/\text{H}\epsilon/\text{H}\zeta$ und Val $\text{H}\gamma/\text{H}\gamma'$ bzw. Asp $\text{H}\beta/\text{H}\beta'$ gezeigt. Trotz der geringen Überlagerung der Asp $\text{H}\beta$ -Protonen heben sich diese Signale mit einem relativen STD-Effekte von etwa 2 % nur knapp vom Rauschen ab.

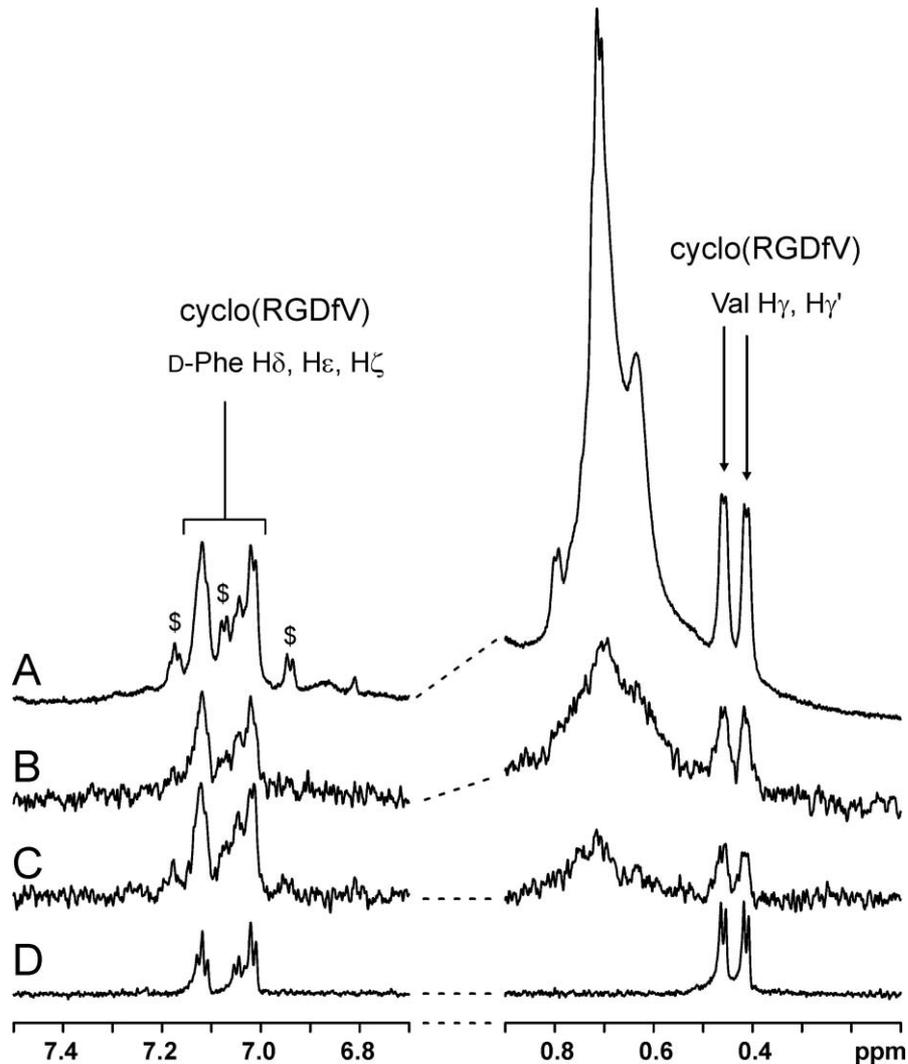


Abbildung 40 (A) ^1H -NMR-Referenzspektrum (700 MHz) wie in Abbildung 39A von 6.0×10^9 Thrombozyten mit cyclo(RGDfV) ($240 \mu\text{M}$) in deuteriertem TBS-Puffer bei 283 K. Gezeigt sind die beiden Regionen der Ligandprotonen D-Phe $\text{H}\delta/\text{H}\epsilon/\text{H}\zeta$ und Val $\text{H}\gamma/\text{H}\gamma'$. Es sind auch Resonanzen von AEBSF-HCl (\$) und von Zellbestandteilen (0.5 – 0.8 ppm) zu erkennen. (B) Das STD-Spektrum zeigt die Signale des Liganden und einiger Zellbestandteile. *On-Resonance*-Einstrahlung bei -1.1 ppm, *Off-Resonance*-Einstrahlung bei 114 ppm, Sättigungszeit 1.02 s. (C) Wie B aber mit einem 30 ms Spinlockimpuls ($T_{1\rho}$ -Filter). (D) ^1H -Vergleichsspektrum von $60 \mu\text{M}$ cyclo(RGDfV) in deuteriertem TBS-Puffer ohne Thrombozyten bei 283 K.

Das STD-Spektrum wurde zusätzlich mit einem 30 ms Spinlockimpuls ($T_{1\rho}$ -Filter) aufgenommen und ist in den jeweiligen Ausschnitten in Abbildung 39C bis 41C gezeigt. Die sehr breite Proteinhüllkurve ist dadurch unterdrückt worden, während aber die Signale leicht beweglicher Moleküle oder Molekülteile noch deutlich vorhanden sind. Allerdings war die Empfindlichkeit bei dieser Messung unerwartet klein, die Experimentdauer betrug 1 Stunde und 45 Minuten. Ebenfalls ungeklärt ist die Ursache der dispersiven Signale zwischen 3 und 4 ppm. Für Vergleichszwecke ist in Abbildung 39D bis 41D ein ^1H -Vergleichsspektrum von cyclo(RGDfV) ($60 \mu\text{M}$) in deuteriertem TBS-Puffer ohne Thrombozyten abgebildet.

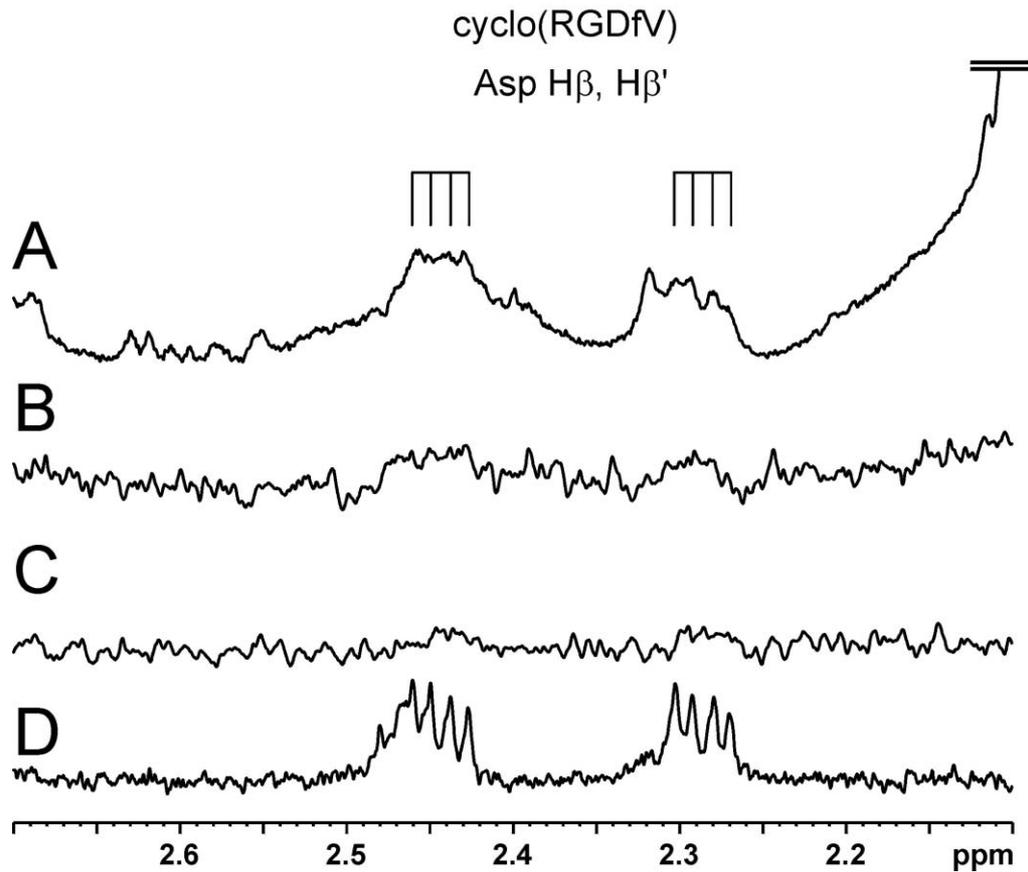


Abbildung 41 (A) ^1H -NMR-Referenzspektrum (700 MHz) wie in Abbildung 39A von 6.0×10^9 Thrombozyten mit cyclo(RGDfV) ($240 \mu\text{M}$) in deuteriertem TBS-Puffer bei 283 K. Es ist die Region der Ligandprotonen Asp H β /H β ' gezeigt. (B) Das STD-Spektrum zeigt schwache Signale des Liganden. *On-Resonance*-Einstrahlung bei -1.1 ppm, *Off-Resonance*-Einstrahlung bei 114 ppm, Sättigungszeit 1.02 s. (C) Wie B aber mit einem 30 ms Spinlockimpuls ($T_{1\rho}$ -Filter). (D) ^1H -Vergleichsspektrum von $60 \mu\text{M}$ cyclo(RGDfV) in deuteriertem TBS-Puffer ohne Thrombozyten bei 283 K.

Um zu belegen, dass in Abbildung 39 bis 41 eine spezifischen Bindung von cyclo(RGDfV) an das Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ vorliegt, wurden auch die nichtbindenden, linearen Peptide AGSE und PDTRP auf ihre STD-Intensität hin untersucht. In Abbildung 42A ist ein ^1H -NMR-Referenzspektrum von 6.0×10^9 Thrombozyten mit AGSE und PDTRP (Konzentration jeweils 1.07 mM) in deuteriertem TBS-Puffer bei 283 K gezeigt. Neben den Resonanzen der linearen Peptide sind auch die Signale von hoch- und niedermolekularen Zellbestandteilen im Spektrum enthalten. Das STD-Spektrum der NMR-Probe in Abbildung 42B zeigt nur die Signale einiger Zellbestandteile. Die Resonanzen der linearen Peptide sind vollständig abgezogen. Dies ist im Ausschnitt von 0.9 bis 2.7 ppm besonders deutlich. Wieder betrug die Sättigungszeit 1.02 s und die *On-* und *Off-Resonance*-Einstrahlung erfolgte jeweils bei -1.1 ppm bzw. bei 114 ppm. Die beiden Peptide AGSE und PDTRP zeigen keinerlei Bindungsaktivität, weder an das Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ noch an andere Membranproteine auf der Thrombozytenoberfläche.

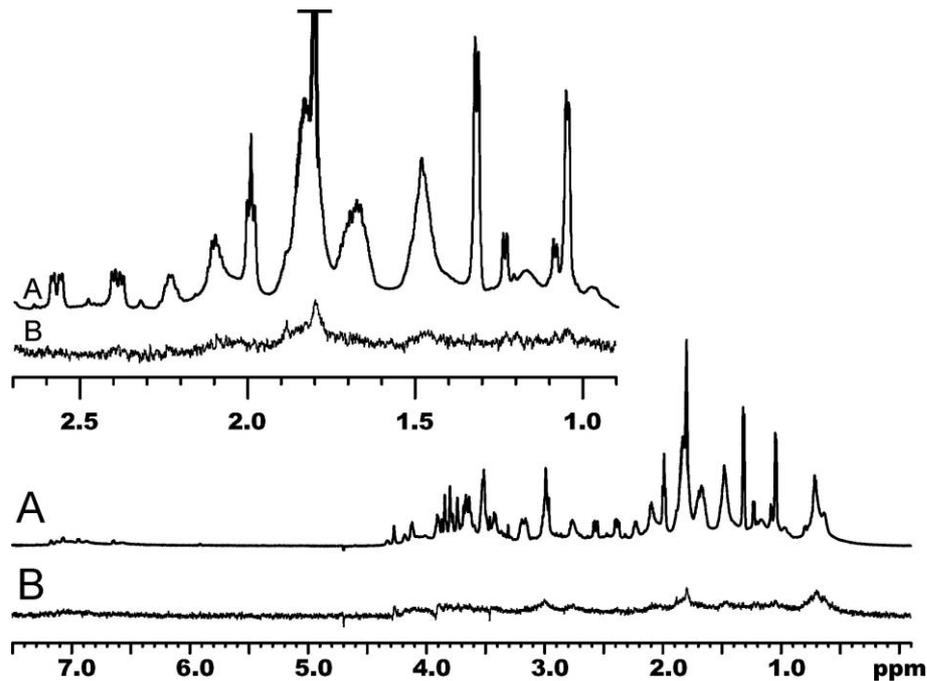


Abbildung 42 (A) ^1H -NMR-Referenzspektrum (700 MHz) von AGSE und PDTRP (jeweils 1.07 mM) mit 6.0×10^9 Thrombozyten in deuteriertem TBS-Puffer bei 283 K. Die Konzentration an Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Bindungsstellen beträgt ca. 755 nM. Neben den Resonanzen der linearen Peptide sind auch die Signale von hoch- und niedermolekularen Zellbestandteilen im Spektrum enthalten. Der Ausschnitt von 0.9 bis 2.7 ppm zeigt die Region der β -, γ - und δ -Protonen der Peptide. (B) Das STD-Spektrum der NMR-Probe zeigt nur die Signale einiger Zellbestandteile. Die Resonanzen der linearen Peptide sind vollständig abgezogen. Dies ist im Ausschnitt von 0.9 bis 2.7 ppm besonders deutlich. *On-Resonance*-Einstrahlung bei -1.1 ppm, *Off-Resonance*-Einstrahlung bei 114 ppm, Sättigungszeit 1.02 s.

3.3.5. NMR-Experimente mit Thrombozyten in CPD-Plasma

Außer mit den gewaschenen humanen Thrombozyten in deuteriertem TBS-Puffer wurden auch NMR-Experimente mit Thrombozytenkonzentrat im originalen CPD-Plasma durchgeführt. Die Thrombozyten werden zuerst durch Zentrifugation sedimentiert. Das Thrombozytenpellet mit einem geschätzten Volumenanteil der Zellen von 70 % wird mit dem 1.6-fachen Volumen nichtdeuteriertem TBS-Puffer resuspendiert und die Komponenten des Plasmas dadurch im 2.59-fachen Volumen verdünnt. Der Resuspensionspuffer (pH = 7.4) enthielt außer CaCl_2 (1.7 mM) noch AEBSF-HCl und PS-Hyp-GDW in Reinstwasser mit 5 % D_2O . Die Endkonzentrationen dieser Komponenten in der Lösung nach dem Mischen betragen 1.3 M D_2O , 628 μM AEBSF-HCl und 430 μM PS-Hyp-GDW. Um das Aggregationsvermögen der Thrombozyten zu kontrollieren, wurde das zweite aus dem Thrombozytenkonzentrat erhaltene Pellet mit 500 μL des gleichen Resuspensionspuffer versetzt, der allerdings kein PS-Hyp-GDW enthielt. Hier wurde eine sofortige Aggregation und Ausflockung der Thrombozyten beobachtet. Dieser Vergleichstest bezüglich der Inhibition der

Thrombozytenaggregation wurde später mit dem cyclischen Peptid cyclo(GRGDSPA) anhand zwei weiterer Thrombozytenpellets durchgeführt. Er lieferte das gleiche Ergebnis: Das RGD-Peptid im Probengemisch verhinderte die spontane Thrombozytenaggregation beim Resuspendieren. Die Konzentration an D₂O entspricht etwa 2.2 % und ergibt ein genügend intensives Signal für den Deuteriumlock des Spektrometers. Die verdünnte Zellsuspension enthielt ungefähr 9.8×10^9 Thrombozyten/mL. In der NMR-Probe mit 600 μ L dieser Suspension beträgt die gesamte Zellzahl ungefähr 5.9×10^9 . Diese Zahl entspricht bei einem durchschnittlichen Gehalt von 3×10^{11} Thrombozyten/L im menschlichem Blut einer Blutmenge von 20 mL. Bei einer durchschnittlichen Zahl von 5×10^4 frei zugänglichen Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Molekülen je Thrombozyt entspricht wiederum die NMR-Probe einer Menge von 0.5 nmol Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Zunächst wurde das Peptid PS-Hyp-GDW auf seine Stabilität in der Thrombozytensuspension mit TBS-Puffer bei 283 K untersucht.

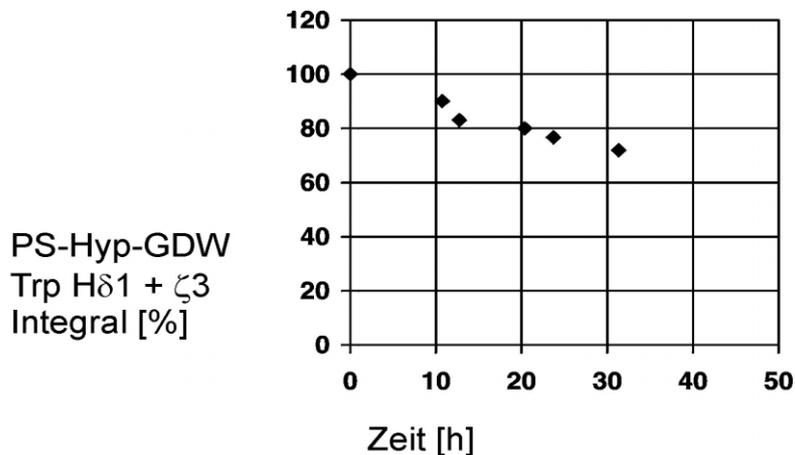


Abbildung 43 Abbau des Peptids PS-Hyp-GDW in einer Thrombozytensuspension mit TBS-Puffer bei 283 K. Aufgetragen ist die Intensität der gemeinsam integrierten ¹H-NMR-Signale von Trp H δ 1 und Trp ζ 3 gegen die Zeit.

Über etwa 30 Stunden hinweg wurden 1D-¹H-Spektren der NMR-Probe bei 283 K aufgenommen und die Signale der Protonen Trp H δ 1 und Trp ζ 3 integriert. Der zeitliche Verlauf der Intensitäten ist in Abbildung 43 dargestellt. Es lässt sich hieraus eine Halbwertszeit dieses Peptides mit humanen Thrombozyten in deuteriertem TBS-Puffer von ca. 50 Stunden abschätzen. Die Anpassung einer exponentiellen Abklingfunktion an die Messwerte erschien nicht sinnvoll, da der Abbau nur bei konstanter Enzymkonzentration die Form einer exponentiellen Abnahme besitzt und hier durch Zellysis mit einer Erhöhung des Enzymgehalts zu rechnen ist. Generell sind lineare Peptide ohne unnatürliche Aminosäuren in der Thrombozytensuspension nicht stabil, und die Messzeiten sollten im Vergleich zur Halbwertszeit sehr kurz sein. Im Vergleich zu den linearen Peptiden wurde bei den cyclischen

Peptiden cyclo(RGDfV) und cyclo(GRGDSPA) kein messbarer Zerfall beobachtet. Die NMR-Probe mit PS-Hyp-GDW in der Thrombozytensuspension lieferte nur sehr schwache STD-Effekte, die wegen starker Überlagerung mit den Signalen kleiner Moleküle kaum auswertbar waren. Daher wurden der Mischung zusätzlich cyclo(RGDfV) in einer Konzentration von 1.08 mM hinzugegeben.

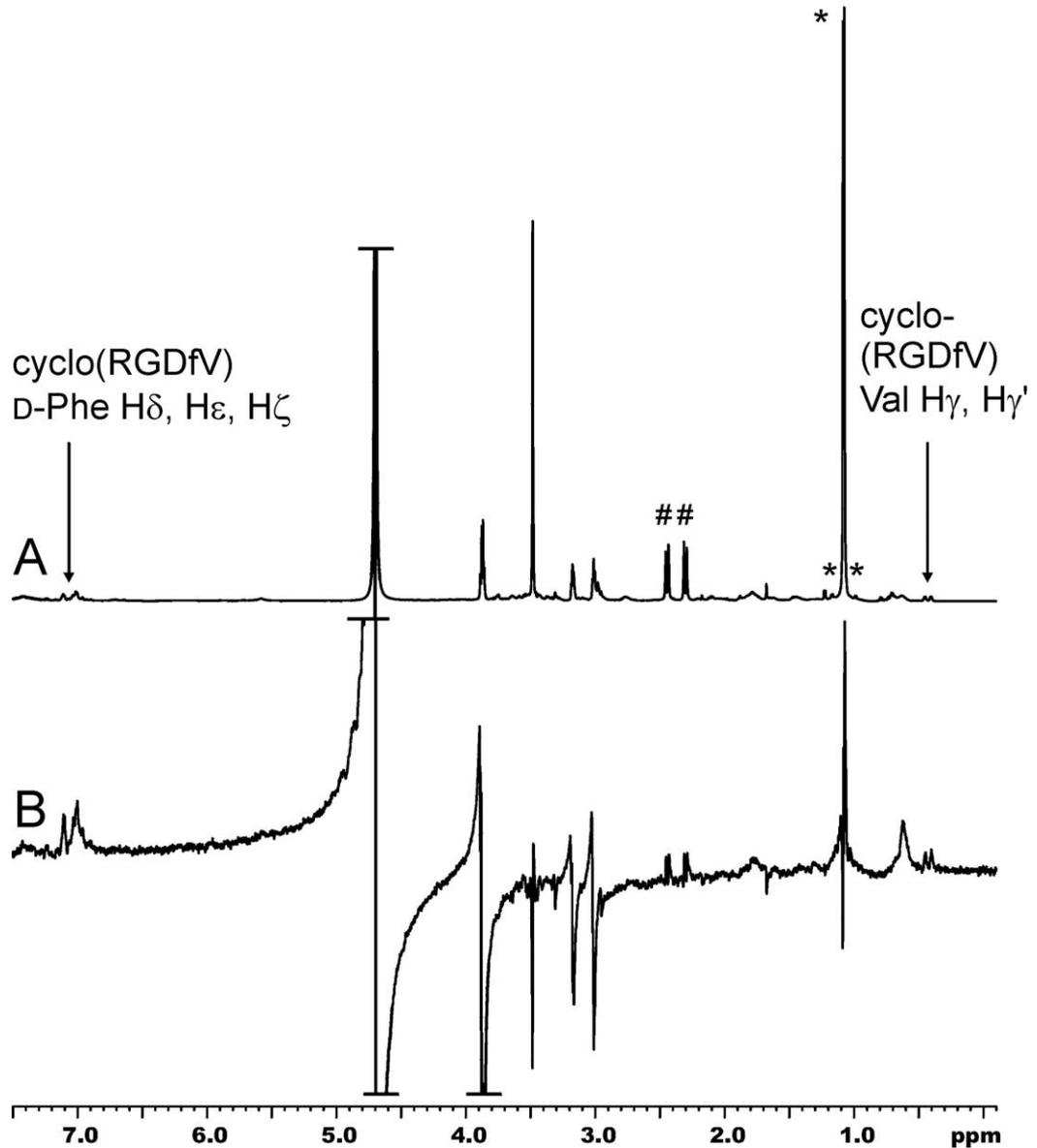


Abbildung 44 (A) ¹H-NMR-Referenzspektrum (700 MHz) von 5.9×10^9 Thrombozyten mit cyclo(RGDfV) (1.08 mM) und PS-Hyp-GDW (416 μ M) in deuteriertem TBS-Puffer bei 283 K. Die Konzentration an Integrinbindungsstellen betragt ca. 742 nM. Neben den Signalen von Blutplasma- und Zellbestandteilen sind die Signale des Citratpuffers (#), der Ligandprotonen D-Phe H δ /H ϵ /H ζ und Val H γ /H γ \'' sowie von Verunreinigungen (*) im Spektrum enthalten. Die Protonen von PS-Hyp-GDW sind nicht zu erkennen. (B) Das STD-Spektrum zeigt die Signale des Liganden cyclo(RGDfV) und einiger Zellbestandteile. *On-Resonance*-Einstrahlung bei -1.1 ppm, *Off-Resonance*-Einstrahlung bei 114 ppm, Sattigungszeit 1.53 s.

Das ^1H -NMR-Referenzspektrum dieser Probe ist in Abbildung 44A und Abbildung 45A gezeigt. Neben den Signalen von Blutplasma- und Zellbestandteilen sind die Signale der Ligandprotonen D-Phe $\text{H}\delta/\text{H}\epsilon/\text{H}\zeta$ und Val $\text{H}\gamma/\text{H}\gamma'$ im Spektrum enthalten. Die aromatischen Protonen von PS-Hyp-GDW sind praktisch nicht zu erkennen. Die Signale des Citratpuffers sind jeweils mit einer Raute (#) markiert. In der Region von 0.6 ppm bis 1.2 ppm erscheinen mehrere Dubletts von Verunreinigungen im Puffergemisch, die mit Sternen (*) gekennzeichnet sind. Die STD-Spektren in Abbildung 44B und Abbildung 45B zeigen die Signale des Liganden cyclo(RGDfV) und einiger Zellbestandteile. Das große Dublett bei 1.1 ppm und die Citratsignale (#) sind nicht völlig im STD-Spektrum abgezogen worden. Die negativen Durchschwinger an den Signalen zwischen 3 ppm und 4 ppm deuten auf unvollständige Subtraktion aufgrund unterschiedliche Relaxationsgeschwindigkeiten hin. Als Ursache kommen auch räumliche oder zeitliche Inhomogenitäten der Probe in betracht. In der gedehnten Region von 0.2 ppm bis 2.6 ppm in Abbildung 45 ist dagegen die sehr effiziente Subtraktion der kleineren, durch Sterne markierten Signale (*) zwischen 0.6 ppm und 1.2 ppm besonders gut zu erkennen.

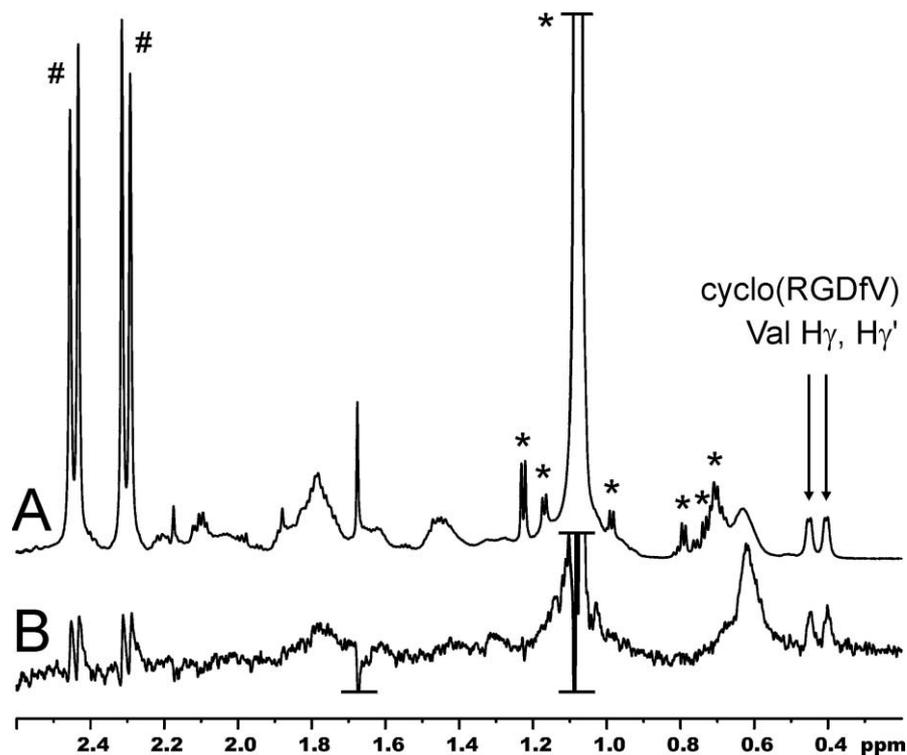


Abbildung 45 (A) ^1H -NMR-Referenzspektrum (700 MHz) wie in Abbildung 44 von 5.9×10^9 Thrombozyten mit cyclo(RGDfV) (1.08 mM) und PS-Hyp-GDW (416 μM) in deuteriertem TBS-Puffer bei 283 K. Gezeigt ist aber nur die Region von 0.2 ppm bis 2.6 ppm. Die Konzentration an Integrinbindungsstellen beträgt ca. 742 nM. Neben den Signalen von Blutplasma- und Zellbestandteilen sind die Signale der Ligandprotonen Val $\text{H}\gamma/\text{H}\gamma'$, von Citratpuffer (#) und von Verunreinigungen (*) im Spektrum enthalten. (B) Das STD-Spektrum zeigt die Signale des Liganden cyclo(RGDfV) und einiger Zellbestandteile. *On-Resonance*-Einstrahlung bei -1.1 ppm, *Off-Resonance*-Einstrahlung bei 114 ppm, Sättigungszeit 1.53 s.

Untersuchungen an dem thrombozytengebundenem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ können eventuell durch Bestandteile des CPD-Plasmas erschwert werden. Fibrinogen und Fibronectin sind im Blutplasma in hoher Konzentration enthalten und können um die Bindungsstellen des Integrins konkurrieren. Zu untersuchende Liganden können außerdem an das humane Serumalbumin (HSA) binden und falschpositive STD-Effekte hervorrufen.

Trotzdem zeigen diese NMR-Messungen, dass STD-Bindungsstudien auch in rohen Zellkonzentraten trotz sehr intensiver Solvent- oder Puffersignale möglich sind. Der vollständige Austausch des Mediums gegen deuterierten Puffer ist also nicht zwingend erforderlich.

4. Zusammenfassung

Die aktuelle Wirkstoffforschung fokussiert sich besonders auf Transmembranrezeptoren. Die Entdeckung neuer Leitstrukturen und deren Optimierung sind dabei wesentliche Herausforderungen. Im Vergleich zu Studien an löslichen *target*-Proteinen ist die Entwicklung neuer Pharmaka für membranständige Proteine erschwert. Sowohl Methoden zum Screening als auch zur Aufklärung der 3D-Struktur sind nicht ohne Weiteres anwendbar. Rationales Wirkstoffdesign ist ohne strukturelle Informationen über den Rezeptor-Ligand-Komplex nur eingeschränkt möglich.

In der vorliegenden Arbeit ist die Sättigungstransferdifferenz-NMR-Spektroskopie (STD-NMR), ein NMR-Screeningverfahren, zum ersten Mal für ein membrandurchspannendes Rezeptorprotein adaptiert und angewendet worden.¹⁶⁵ Ein Schema dieser Methode ist in Abbildung 46 gezeigt. Dabei konnten sowohl die spezifische Bindung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ an verschiedene Peptide und Cyclopeptide bestätigt, als auch absolute und relative Bindungsaktivitäten bestimmt werden. Die STD-NMR-Spektroskopie ermöglichte auch Aussagen zum Bindungs epitop des Ligandmoleküls und damit zu seinen pharmakophoren Gruppen.

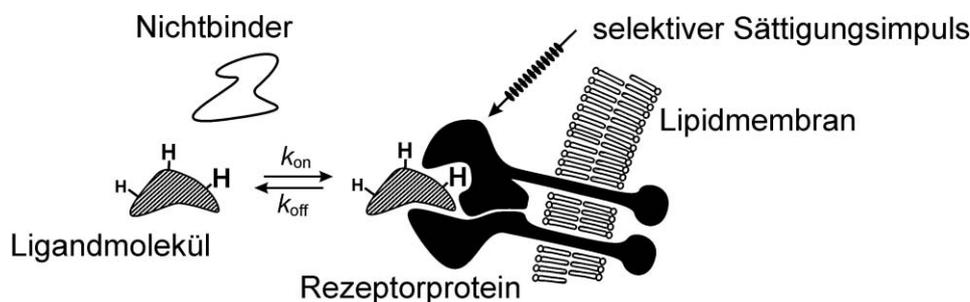


Abbildung 46 STD-NMR-Spektroskopie:
Detektion eines Liganden mit Bioaffinität zu einem Membranprotein.

Das heterodimere Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ ist der Fibrinogenrezeptor auf den Membranen humaner Thrombozyten, welcher die Thrombozytenaggregation vermittelt und somit der Blutgerinnung dient. Für die NMR-Experimente wurde das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ nach modifizierten Literaturvorschriften in unilamellare Lipidvesikel (Liposomen) eingebettet.^{63, 64} Das Erkennungsmotiv für das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ sowohl in seinen natürlichen Ligandproteinen als auch in inhibitorisch wirksamen Peptiden ist häufig die Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD), aber auch Lys-Gly-Asp (KGD).^{46, 84}

In Konkurrenzexperimenten mit Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Liposomen in einem deuteriertem NMR-Puffer und einer Mischung aus zwei RGD-Peptiden wurden STD-Effekte für das Cyclopeptid cyclo(RGDfV) beobachtet. Das lineare Peptid RGD wird von cyclo(RGDfV)

vollständig aus den Bindungsstellen verdrängt, da seine geringere Affinität zum Protein deutlich geringer ist. Laut unterschiedlicher Literaturdaten besitzt cyclo(RGDfV) mit einer gemittelten Dissoziationskonstanten von $K_D = 24 \mu\text{M}$ eine mehr als 40-fach höhere Affinität zum Rezeptor als RGD.^{77, 100, 158} In weiteren Konkurrenzexperimenten an den Integrinliposomen wurden die relativen STD-Effekte von cyclo(RGDfV) in einer vorgelegten Ligandlösung mit den Werten nach Zugabe des inhibitorischen Peptides RGDS verglichen. Aus diesem Inhibitionsfaktor, den Ligandkonzentrationen und der Dissoziationskonstanten für cyclo(RGDfV) von $K_D = 24 \mu\text{M}$ wurde eine Inhibitionskonstante für RGDS von $K_I = 116 \mu\text{M}$ berechnet. Demzufolge hat der Ligand cyclo(RGDfV) eine 4.8-fach größere Affinität zum Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ als das lineare Peptid RGDS, was mit den verschiedenen Literaturwerten für die relative Affinität von 1.9 bis 4.6 sehr gut übereinstimmt.⁷⁵

Durch ein *STD-epitope mapping* konnten für das Peptid cyclo(RGDfV) die Protonen Arg H α , Arg H β /H γ , D-Phe H β , D-Phe H δ , D-Phe H ϵ /H ζ und Val H γ /H γ' als Zentren des Bindungsepitopes an diesem Molekül identifiziert werden. Verschiedene Autoren haben sowohl für lineare als auch für cyclische -RGD-X- und -KGD-X-Peptide übereinstimmend gefunden, dass Aminosäuren mit aliphatischen Resten wie Val, Ile und Leu, besonders aber aromatische Aminosäuren, an der Position X zu einer vielfach höheren Affinität des jeweiligen Peptides führen.^{75, 76, 88, 162} Diese Beobachtungen stimmen hervorragend mit der starken Betonung der D-Phe-Protonen im *STD-epitope mapping* überein. Die intensiven STD-Effekte der Arg H α - und Arg H β /H γ -Protonen belegen auch in dieser Ligandregion eine hydrophobe Wechselwirkung mit dem Rezeptorprotein. Diese Aussage des *STD-epitope mapping* steht sehr gut im Einklang mit einer Publikation, in der verschiedene -X-GDW-Peptide als Liganden für das Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ verglichen worden sind.⁹⁰ Die Autoren beobachteten eine deutlich stärkere Inhibitorwirkung, wenn in der RGDW-Sequenz das Arg durch unnatürliche Aminosäuren mit geraden oder verzweigten Alkylresten ersetzt wurde. Diese Gegenüberstellungen zeigen den großen Wert eines *STD-epitope mapping* bei der Identifikation der pharmakophoren Gruppen eines Ligandmoleküls.

Auch bei Studien an einem Membranprotein liefert es Informationen für die weitere Optimierung von Leitstrukturen, die sonst nur durch aufwendige, kombinatorische Synthesen oder durch Kokristallisation des Rezeptors mit dem Liganden und anschließender Röntgenstrukturanalyse zu erhalten sind.

Ein weiterer zentraler Teil dieser Arbeit waren die NMR-Experimente mit nativen, humanen Thrombozyten in deuteriertem Tris-Puffer, aber auch in dem ursprünglichen Citratplasma des Zellkonzentrates. Das geringe zytoplasmatische Volumen und die hohe Oberflächenkonzentration an Rezeptoren in der Zellmembran erlauben STD-NMR-Experimente mit 0.2 – 0.6 nmol Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ bei einer Zahl von $3 - 7 \times 10^9$ Thrombozyten in einem NMR-Röhrchen. Eine NMR-Probe der Thrombozyten in deuteriertem Puffer mit cyclo(RGDfV) in etwa 300-fachem Überschuss bezüglich der Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Bindungsstellen

zeigte im STD-Spektrum neben einigen sehr breiten Resonanzen von Zellbestandteilen nur die Signale des Liganden. Diese STD-Signale sind auf die spezifische Bindung des Liganden an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ zurückzuführen, da das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in Relation zu anderen Integrinmolekülen auf der Thrombozytenoberfläche sehr stark exprimiert wird. Die im normalen Protonenspektrum beobachteten schmalen Signale aller anderen extra- und intrazellulären kleinen Moleküle erschienen durch Subtraktion im STD-Spektrum nicht mehr. In Kontroll-experimenten zeigten die nichtbindenden Peptide AGSE und PDTRP keine STD-Signale und damit keinerlei Bindungsaktivität an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Um die Grenzen des Verfahrens zu überprüfen, wurden auch NMR-Experimente direkt mit dem zur Transfusion vorgesehenen Thrombozytenkonzentrat durchgeführt. Die NMR-Probe enthält dann das ursprüngliche Citratplasma mit einem hohen Anteil an Wasser, Glucose und anderen niedermolekularen Verbindungen. Trotz vieler Signalüberlagerungen im ^1H -Spektrum konnten mit dem Ligandpeptid cyclo(RGDfV) eindeutige STD-Effekte für die Resonanzen der Protonen Val $\text{H}\gamma/\text{H}\gamma'$ beobachtet werden. Signale von anderen hoch- und niedermolekularen Verbindungen sind im STD-Spektrum abgezogen oder in der Intensität stark verringert worden.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die STD-NMR-Spektroskopie hervorragend geeignet ist, um Bindungsstudien an Membranproteinen auszuführen. Durch diese Ergebnisse erscheint die Anwendung der STD-NMR-Spektroskopie auf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) problemlos möglich. Durch NMR-Messungen an intakten Zellen, die GPCRs in hoher Zahl exprimieren, sind die begehrten Informationen zur Bindungsaffinität oder zum Pharmakophor sogar direkt ohne vorherige Isolation des Membranproteins zugänglich.

5. Summary

The discovery of new lead structures and their optimisation are the main challenges in drug development. Especially in modern pharmaceutical research there is a strong focus on transmembrane receptors. Working with membrane-spanning proteins is more difficult than studies with soluble targets. With membrane receptors many methods for screening and for determination of the 3D structure are inapplicable. For rational drug design structural information about the receptor ligand complex is desirable.

This thesis describes the application of saturation transfer difference NMR spectroscopy (STD NMR) to a membrane receptor.¹⁶⁵ The methodology is sketched in the figure below (Figure 47).

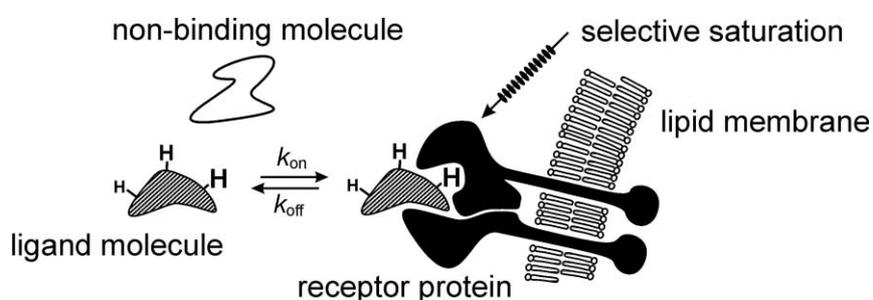


Figure 47 STD-NMR spectroscopy: Detection of molecules with binding affinity to a membrane protein.

Several peptides and cyclopeptides with well known binding affinity to the integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ have been confirmed as specific binding ligands. Absolute dissociation constants were determined and inhibition experiments revealed the gradation of the binding constants. The characterisation of pharmacophoric groups was also possible by the application of STD NMR.

The integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ was embedded in the bilayer of unilamellar lipid vesicles (liposomes) according to a modified published procedure.^{63, 64} The amino acid sequences Arg-Gly-Asp (RGD) and Lys-Gly-Asp (KGD) are recognized by the integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ as part of the natural ligand proteins^{46, 84}. Short linear peptides presenting these recognition patterns bind to the integrin as well.

NMR spectra of integrin containing liposomes in deuterated NMR buffer with two RGD peptides gave only STD effects of the stronger binding cyclic peptide cyclo(RGDfV). This demonstrates in agreement with literature that the peptide RGD is largely replaced from the binding site by cyclo(RGDfV) because RGD is a much weaker ligand to the integrin. According to various publications the averaged dissociation constant of cyclo(RGDfV) binding to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ is $K_D = 24 \mu\text{M}$.^{77, 100} Compared to RGD cyclo(RGDfV) is a more

than 40-fold stronger inhibitor of integrin.¹⁵⁸ In another inhibition experiment with the integrin containing liposomes, addition of the same amount of the linear peptide RGDS inhibits the binding of cyclo(RGDfV) partially and the STD effects of cyclo(RGDfV) showed a significant decrease. The comparison with the STD effects of cyclo(RGDfV) before RGDS was added, yielded the inhibition factor. Using also the ligand concentrations and the dissociation constant for cyclo(RGDfV) binding to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ ($K_D = 24 \mu\text{M}$) an inhibition constant for RGDS of $K_I = 116 \mu\text{M}$ was calculated. Therefore, cyclo(RGDfV) shows a 4.8-fold higher affinity to the integrin than RGDS. This factor of relative binding strength corresponds well to the literature that states values between 1.9 and 4.6.⁷⁵

The binding epitopes of cyclo(RGDfV) were characterized by STD NMR to consist mainly of the protons Arg H α , Arg H β /H γ , D-Phe H β , D-Phe H δ , D-Phe H ϵ /H ζ and Val H γ /H γ' . The strong STD responses originating from the D-Phe supports literature data. Studying the structure-activity relationship in linear and cyclic oligopeptide ligands with the general structure -RGD-X- and -KGD-X- revealed that the amino acid at the position X has to have a hydrophobic nature. Aliphatic and aromatic residues at this position enhanced significantly the inhibitory activity.^{75, 76, 88, 162} The protons H α , H β /H γ , within the Arg alkyl chain show intensive STD effects that underline a hydrophobic interaction with the receptor protein. The STD epitope mapping is consistent with an SAR study by Hayashi *et al.* comparing the affinity of different -X-GDW- peptides towards the integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$.⁹⁰ The authors observed an increase of the inhibitory properties after replacing the Arg in the -RGDW-sequence by unnatural amino acids with linear or branched alkyl residues. This identification of the pharmacophoric groups in the ligand molecule by STD NMR is extremely useful for the optimisation of lead structures for membrane protein targets. Epitope mapping of ligands normally requires complex synthetic work or the X-ray structure analysis of cocrystallized ligand-receptor complexes.

Another important part of this work are the NMR experiments with native human thrombozytes in deuterated tris buffer and in citrate plasma intended for thrombozyte transfusion. The low cytoplasmic volume of thrombozytes allow STD NMR experiments with $3 - 7 \times 10^9$ cells in the NMR tube. Due to the high surface concentration of receptor molecules this corresponds to 0.2 nmol to 0.6 nmol integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. An NMR sample of the thrombozytes in deuterated buffer with cyclo(RGDfV) in an approximately 300-fold excess with respect to the receptor binding sites showed the signals of the peptide ligand in the STD NMR spectrum. These STD signals originated from specific binding of the ligand to the integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ because its expression level is far above other cell surface components. The narrow signals visible in the normal proton NMR spectrum originating from small molecules in the buffer and inside the cells are cancelled out in the STD spectrum by subtraction. Some very broad resonances of cellular components are still visible.

In negative control experiments the non-binding peptides AGSE and PDTRP did not

SUMMARY

show STD signals and thus have no binding activity to the integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$

Additional NMR experiments were performed with thrombocytes in the native citrate plasma. The cell concentrate for transfusion purposes contains large amounts of water, glucose and other small molecules and represented an opportunity to investigate the limitations of the method. Despite of the crowded proton spectra NMR samples with the peptide ligand cyclo(RGDfV) revealed unambiguously STD effects for the protons Val H γ /H γ' . Resonances of other compounds of high or low molecular weight were cancelled out or are drastically reduced in the STD spectrum.

It has been shown that STD NMR spectroscopy is extremely useful for binding studies with membrane proteins. These results allow the application of STD NMR to G protein-coupled receptors (GPCRs) if they are highly expressed in cells or vesicles. The desired information about a ligands binding affinity or pharmacophoric groups are directly accessible in NMR experiments with intact cells without tedious isolation of the membrane protein.

6. Experimenteller Teil

6.1. Vorbereitung der NMR-Lösungen und NMR-Proben

Zur Umpufferung des Proteins, zur Liposomenpräparation, zum Waschen der Liposomen und für NMR-Messungen ohne Thrombozyten wurde ein LUV-NMR-Puffer benutzt, der aus Deuteriumoxid (D_2O 99.9 %, Deutero GmbH, Deutschland) besteht und 10 mM Perdeuterio-tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris- d_{11} , Cambridge Isotope Laboratories, Massachusetts, USA), 10 mM Natriumchlorid (NaCl) und 6 mM Natriumazid (NaN_3) enthält. Mit 100 mM Deuteriumchloridlösung in D_2O (DCl, Cambridge Isotope Laboratories, Massachusetts, USA) wurde der pH-Wert auf 7.4 eingestellt (nicht korrigiert für D_2O). Dieser Puffer diente als Basislösung und wurde, je nach Anwendung, zusätzlich mit einer 100 mM Calciumchloridstammlösung ($CaCl_2$) oder einer 100 g/L Triton X-100-Stammlösung auf die jeweils nötige Endkonzentration dieser Substanzen eingestellt.

Die meisten Peptidliganden wurden von der Firma Bachem AG (Schweiz) bezogen. Das Peptid TPL-NH₂ wurde von Jan Wülfken und PDTRP von Heiko Möller zur Verfügung gestellt (Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg). Eine Menge von 1 – 5 mg der Peptide wurde jeweils dreimal in 0.5 mL 1 mM DCl in D_2O gelöst und jeweils in einer SpeedVac Vacuumzentrifuge (*centrifugal concentrator*, Savant Instruments, New York, USA) lyophilisiert, um Reste von H_2O , Essigsäure oder Trifluoressigsäure zu entfernen. Aliquote der Liganden wurden entweder als Feststoff in der NMR-Probe aufgelöst oder in Form einer 5 – 20 mM Stammlösung in D_2O zu den NMR-Proben gegeben. Bei der zweiten Variante muss die Zunahme des Probenvolumens berücksichtigt werden. Proteinkonzentration und Pufferkapazität werden verringert. NMR-Proben mit fertig präparierter Liposomensuspension in LUV-NMR-Puffer enthielten 0.5 – 1.0 mM $CaCl_2$.

Um weitere NMR-Experimente durchführen zu können, wurden die Liposomen nach den Messungen von den Liganden befreit. Dazu wurde jeweils 2.8 – 3.0 mL LUV-NMR-Puffer mit 0.5 mM $CaCl_2$ zugesetzt und die Liposomensuspension durch Zentrifugation bei 6 °C in einem Ultrafree-4 Ultrafiltrationsröhrchen (MWCO 100kDa, PES-Membran) bis zu einem Endvolumen von 200 – 300 μ L konzentriert. Der Verdünnungs- und der Konzentrationsschritt wurden viermal wiederholt. Nach der Entnahme der Liposomensuspension aus dem Retentat-röhrchen wurde dieses zweimal gespült mit je 100 – 150 μ L LUV-NMR-Puffer, der auch 0.5 mM $CaCl_2$ enthielt. Die Lösungen wurden vereinigt ins NMR Röhrchen überführt.

Zur Verbesserung der Empfindlichkeit wurden einige der STD-Experimente in Shigemi-NMR-Röhrchen vom Typ BMS-005TB mit 8 mm Bodendicke oder BMS-005TJ mit 12 mm Boden (Shigemi Corporation, Ltd., Tokyo, Japan) durchgeführt. Das Probenvolumen betrug 200-250 μ L. In allen anderen Fällen sind normale 5 mm-Röhrchen wie

Kontes 897240-0008 ("Typ 240", Kontes, Vineland, New Jersey, USA) oder Wilmad 528-pp-8 (Wilmad, Buena, New Jersey, USA) verwendet worden.

Für die NMR-Experimente mit intakten Thrombozyten wurden Aliquote der Liganden entweder als Feststoff in der NMR-Probe aufgelöst oder als 5-20 mM Stammlösung in D₂O in die NMR-Proben gegeben. Teilweise wurde der Ligand als Feststoff oder als Stammlösung einer abgemessenen Menge Resuspensionspuffer zugegeben, bevor dieser mit dem Thrombozytenpellet vermischt wurde. Dadurch konnten sowohl lokal überhöhte Ligandkonzentrationen in der Thrombozytensuspension als auch übermäßige Scherkräfte durch häufiges Schütteln vermieden werden.

Um die Lipidsolubilisate und Liposomensuspensionen auf ihr DMPG / DMPC-Verhältnis und ihren Gehalt an Triton X-100 zu untersuchen, wurden 50 µL der Mischung entnommen und mit 450 µL Methanol-d₄ versetzt. Außerdem wurden 10 µL 100 mM *t*BuOH in D₂O und 10 µL 100 mM DMSO in D₂O als interner Stoffmengenstandard hinzugegeben. Die Lipide konnten durch Vergleich der NMR-Integrale der terminalen Methylgruppen und der jeweiligen Protonen H₂ am acylierten Glycerin mit den Signalen der Standardsubstanzen analysiert werden. Bei Triton X-100 wurde das Singulett der *tert*-Butylgruppe ausgewertet.

6.2. Umpufferung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$

Vor der Präparation der Integrinliposomen wurden 1 mg humanes Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa aus Humanthrombozyten, Lot. Nr. B23385, Calbiochem-Novabiochem, Californien, USA), geliefert in 270 µL Pufferlösung/Glycerin 1:1 mit 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 7.7 mM NaN₃, 1 mM CaCl₂ und 1.0 g/L Triton X-100, umgepuffert in D₂O-Puffer. Dazu wurde die ursprüngliche Proteinlösung in Puffer/Glycerin-Gemisch mit 1.8 mL LUV-NMR-Puffer, der zusätzlich 0.30 g/L Triton X-100 (Fluka/Riedel-deHaën, Deutschland) und 0.5 mM CaCl₂ enthielt verdünnt, und dann in einem Centricon-10 Ultrafiltrationsröhrchen (MWCO 10 kDa, regenerierte Zellulose, Millipore Corporation, USA) durch Zentrifugation bis zu einem Retentatvolumen von 200 µL konzentriert. Bei einer Aggregationszahl von 100 – 130 besitzen Triton X-100-Mizellen ein Molgewicht von 65 – 85 kDa und können die Membran nicht passieren. Die Triton X-100-Konzentration im Filtrat entspricht deshalb der CMC mit 0.19 – 0.30 g/L. Bei einem mittleren Molgewicht des Triton X-100 von 646.4 g/mol entspricht die CMC 300 – 460 µM Triton X-100. Für einen effektiven Austausch des Puffers wurden Verdünnungs- und Aufkonzentrationsschritt noch vier mal wiederholt. Dabei sollte die Konzentration an Triton X-100 im Retentat nicht unter die CMC absinken, damit das Integrin nicht aggregiert und ausfällt. Um sicherzustellen, dass Triton X-100 das Ultrafiltrationsröhrchen tatsächlich durch die Membran verlässt, anstatt sich im Retentat anzureichern, wurden 500 µL des ersten und fünften Filtrates mit 10 µL 100 mM Dimethylsulfoxid (1 µmol DMSO) in D₂O und 10 µL 100 mM *tert*-Butanol (1 µmol *t*BuOH)

in D₂O versetzt. Aus den Integralen der Resonanzen des Triton X-100 und der Stoffmengen-Standards im 1D-¹H-NMR-Spektrum, wurde für die Detergenzkonzentration in den Filtraten Werte von jeweils 464 μ M und 391 μ M berechnet. Wenn die Konzentration im Filtrat im unteren Bereich der CMC liegt, kann sich die Triton X-100 Konzentration im Endvolumen von 200 μ L auf bis zu 6.3 mM steigern. Dieser Wert ist für das Integrin unproblematisch, und bei der Liposomenpräparation in einem Volumen von 4 mL ist die Detergenzkonzentration wieder auf 1.3 mM verdünnt. Nach der Entnahme der Integrinlösung aus dem Retentat-röhrchen wurde dieses zweimal mit je 150 μ L LUV-NMR-Puffer, der zusätzlich 0.30 g/L Triton X-100 und 1 mM CaCl₂ enthielt gespült. Die Lösungen wurden vereinigt.

6.3. Liposomenpräparation

Auf einer Glasfritte wurden 1 g Bio-Beads SM-2 (BioRad Laboratories, USA) nacheinander gewaschen¹⁶⁶ mit 3 \times 20 mL Methanol, 12 \times 20 mL Reinstwasser, 5 \times 1 mL D₂O und 2 \times 1 mL LUV-NMR-Puffer mit zusätzlich 0,5 mM CaCl₂. Vor dem Absaugen wurde jeweils 10 min bei RT leicht bewegt. Die Bio-Beads wurden mit dem zuletzt hinzugefügten Volumen Waschpuffer bei 4 °C gelagert und nach dem Abpipettieren des Puffers jeweils im nassen Zustand eingesetzt.

Die Liposomenpräparation erfolgte nach den modifizierten Vorschriften von Gerritsen *et al.* und Müller *et al.*^{63, 64} In einem 4 mL-Glasröhrchen (Abmessungen 15 mm \times 55 mm) mit Schraubverschluss und PTFE-Dichtung wurden 195 μ L 12 g/L (2.34 mg) 1,2-Dimyristoyl-*rac*-glycero-3-phosphocholin (DMPC, Calbiochem-Novabiochem Corporation, California, USA) in Chloroform und 24 μ L 10 g/L (0.24 mg) 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)] Natriumsalz (DMPG-Na, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) in Chloroform/Methanol 2:1 gemischt. Dies entspricht 3.39 μ mol DPMC (MW = 677.9 g/mol) und 348 nmol DMPG-Na (MW = 688.9 g/mol). Chloroform und Methanol wurden im Reinheitsgrad 'Für die HPLC' verwendet. Die Lipide wurden im Stickstoffstrom unter Rotation getrocknet und dabei als dünner Film auf der Gefäßwand abgeschieden. Dies wurde bei einer Neigung des Glasröhrchens von 60° bezogen auf die senkrechte Position mittels eines modifizierten Rotationsverdampfers durchgeführt. Das Glasröhrchen wurde in einen zylindrischen NS 29-Glaskolben mit Planboden gestellt. Die Belüftungskapillare wurde für die Zuführung des Stickstoffes mit einem PTFE-Schlauch verlängert, der 15 mm tief in das Glasröhrchen eintauchte. Anschließend wurde der Lipidfilm mindestens 8 h im Vakuum (< 0.1 mbar) getrocknet. Die Lipide wurden in 3.37 mL LUV-NMR-Puffer durch Zugabe von 47 μ L 100 mM Triton X-100 in D₂O unter dreimaliger Ultraschallbehandlung für je 15 min bei 4 – 7 °C dispergiert. Bei dieser Temperatur wurden 88 μ L 20 mM CaCl₂ in D₂O hinzugegeben, da bei Raumtemperatur Ca²⁺-Ionen mit DMPG einen schwerlöslichen Niederschlag bilden können. Dann wurden 1 mg humanes Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in 500 μ L

LUV-NMR-Puffer mit 1 mM CaCl₂ und 1.4 – 2.7 g/L Triton X-100 hinzugegeben. Für die integrinfreien Liposomen wurde in diesem Schritt lediglich 500 µL LUV-NMR-Puffer mit 1 mM CaCl₂ und 1.4 – 2.7 g/L Triton X-100, aber ohne Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ hinzugegeben. Die Mischung wurde zur vollständigen Equilibrierung 50 min im Wasserbad bei 37 °C bewegt und dann 20 min bei Raumtemperatur ruhend inkubiert. Nach der Zugabe von 360 mg nassen Bio-Beads SM2, die in Puffer gelagert worden waren, wurde die Mischung 90 min im Wasserbad bei 26 °C bewegt. Der Ansatz wurde dann ohne die Bio-Beads in ein neues Glasröhrchen pipettiert, und der Absorbionsschritt bei 37 °C wurde mit einer auf 80 mg verringerten Menge Bio-Beads wiederholt. Es folgte ein Inkubationsschritt über 10 min bei RT und Lagerung über Nacht bei 4 °C. Durch Zentrifugation bei 6 °C in einem Ultrafree-4 Ultrafiltrationsröhrchen (MWCO 100kDa, PES-Membran, Millipore Corporation, USA) wurde die Liposomensuspension für die NMR-Messungen bis zu einem Endvolumen von 200 µL oder 500 µL konzentriert.

6.4. Umpufferung der humanen Thrombozyten in TBS-Puffer

Für ein verwendungsfertiges Thrombozytenkonzentrat in CPD-Plasma werden die Thrombozyten von fünf Vollblutspenden vereinigt. Die Zellzahl wird vom Hersteller mit mindestens 2.5×10^{11} angegeben. Bei einem Volumen des Transfusionsbeutels von 310 – 320 mL entspricht dies einem Gehalt von 7.96×10^8 Thrombozyten/mL. Das CPD-Plasma enthält etwa 13 mM Gesamtcitrat, 1.75 mM Gesamtphosphat und 17.4 mM Glucose. Am sechsten Tag nach der Blutentnahme gilt das Thrombozytenkonzentrat als überlagert und kann bei der Blutbank zu Forschungszwecken abgeholt werden. Ab diesem Zeitpunkt werden die Thrombozyten bei 4 – 6 °C gelagert, um Zelltod und Proteolyse zu bremsen. Alle späteren Zentrifugations- und Umpufferungsschritte werden allerdings bei Raumtemperatur durchgeführt, da gekühlte Thrombozyten eine höhere Aggregationstendenz aufweisen. Nach der Entnahme aus dem Kühlschrank werden die Thrombozyten jeweils 30 min bei Raumtemperatur akklimatisiert. Zum Waschen der Thrombozyten und für die NMR-Experimente wurde ein TBS-NMR-Puffer benutzt, der aus Deuteriumoxid (D₂O 99.9 %, Deutero GmbH, Deutschland) besteht und 10 mM Perdeuterio-tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-d₁₁, Cambridge Isotope Laboratories, Massachusetts, USA), 150 mM Natriumchlorid (NaCl), 3 mM Kaliumchlorid (KCl) und 4 mM Natriumazid (NaN₃) enthält. Mit 100 mM Deuteriumchloridlösung in D₂O (DCl, Cambridge Isotope Laboratories, Massachusetts, USA) wurde der pH-Wert auf 7.4 eingestellt (nicht korrigiert für D₂O). Dieser Puffer diente als Basis und wurde, je nach Anwendung, zusätzlich mit einer 100 mM Calciumchlorid-Stammlösung, einer 100 mM Ethylendiamin-tetraessigsäure-Dinatriumsalz-Stammlösung (EDTA-Na₂, Fluka/Riedel-deHaën, Deutschland) oder mit festem 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid-Hydrochlorid (AEBSF-HCl, Sigma-

Aldrich Chemie GmbH, Germany) auf die jeweils nötige Endkonzentration dieser Substanzen eingestellt.

In zwei 50-mL-Zentrifugenröhrchen werden jeweils 15 mL Thrombozytenkonzentrat gegeben und 20 min bei $1600 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und verworfen. Die Pellets mit dem anhaftenden Überstand hatten jeweils ein Volumen von 300 μL bis 600 μL . Es wurde in je 2 mL TBS-NMR-Puffer resuspendiert der zusätzlich 1 mM AEBSF-HCl und 1 mM EDTA- Na_2 enthielt. Die Suspension wurde in ein 15-mL-Zentrifugenröhrchen pipettiert. Wieder wurden die Zellen durch 15 min Zentrifugation bei $1600 \times g$ sedimentiert, und der Überstand wurde vom Pellet dekantiert. Die drei letzten Schritte (Resuspendierung, Sedimentierung und Dekantierung) wurden zehn mal wiederholt. Bei der siebten Wiederholung wurde allerdings mit TBS-NMR-Puffer resuspendiert, der zusätzlich nur 1 mM AEBSF-HCl enthielt. Bei der achten bis zur zehnten Wiederholung wurde mit TBS-NMR-Puffer resuspendiert, der zusätzlich 1 mM AEBSF-HCl und 1 mM CaCl_2 enthielt. Dabei wurden Pellets mit einem Volumen von je 250 μL bis 500 μL erhalten. Diese wurden jeweils resuspendiert mit 500 μL bis 750 μL TBS-NMR-Puffer, der zusätzlich 1 mM AEBSF-HCl und 1 mM CaCl_2 enthielt. Die NMR-Proben enthielten dann in jeweils 520 μL Zellsuspension ungefähr $2.7 \times 10^9 - 6.0 \times 10^9$ Thrombozyten. Bei einem durchschnittlichen Gehalt von 3×10^{11} Thrombozyten/L im menschlichem Blut entspricht diese Zahl einer Blutmenge von 9 – 20 mL. Bei einer durchschnittlichen Zahl von 5×10^4 frei zugänglichen Integrinmolekülen je Thrombozyt entspricht die NMR-Probe einer Menge von 0.22 – 0.50 nmol Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$.^{68, 69}

6.5. NMR-Proben mit humanen Thrombozyten in CPD-Plasma

Für die NMR-Messungen mit Thrombozyten in CPD-Plasma wurde jeweils ein Anteil eines H_2O -TBS-Puffers benutzt, der aus Reinstwasser mit 10 mM Tris-HCl (Fluka/Riedel-deHaën, Deutschland), 150 mM NaCl, 3 mM KCl und 4 mM NaN_3 besteht. Der pH-Wert wurde auf 7.4 eingestellt mit der korrespondierenden, alkalischen Komponente aus Reinstwasser mit 10 mM Tris-Base (Fluka/Riedel-deHaën, Deutschland), 150 mM NaCl, 3 mM KCl und 4 mM NaN_3 . Dieser resultierende H_2O -TBS-Puffer diente als Basis und wurde dann jeweils vor der Anwendung mit D_2O , CaCl_2 , AEBSF-HCl und Ligandpeptid versetzt.

Zur Thrombozytenpräparation wurde in zwei 50-mL-Zentrifugenröhrchen jeweils 15 mL Thrombozytenkonzentrat gegeben und 20 min bei $1600 \times g$ zentrifugiert. Die Menge an Thrombozytenkonzentrat entsprach ungefähr 11.7×10^9 Zellen. Der Überstand wurde dekantiert und verworfen. Die Pellets mit dem anhaftenden Überstand hatten jeweils ein Volumen von 300 μL – 600 μL . Bei einem geschätzten Volumenanteil der Zellen im Thrombozytenpellet von 70 % enthält ein Pellet im Mittel 135 μL CPD-Plasma. Zum ersten Pellet wurde 500 μL H_2O -TBS-Puffer gegeben, der neben 8 mM Tris, 120 mM NaCl, 2.4 mM

KCl und 3.2 mM NaN_3 noch 2.6 M D_2O , 1 mM CaCl_2 , 1.6 mM AEBSF-HCl und 811 μM des Peptides cyclo(RGDSPA) (Bachem AG, Schweiz) enthielt (Resuspensionspuffer). Das RGD-Peptid verhinderte dabei die Thrombozytenaggregation. Diese verdünnte Zellsuspension wurde 1 min sehr langsam geschüttelt (Vortex) und enthielt ungefähr 12.3×10^{12} Thrombozyten/L, 2.1 M D_2O , 1.3 mM AEBSF-HCl und 640 μM cyclo(RGDSPA). In der NMR-Probe mit 600 μL dieser Suspension beträgt die Zellzahl ungefähr 7.4×10^9 . Bei einem durchschnittlichen Gehalt von 3×10^{11} Thrombozyten/L im menschlichen Blut entspricht diese Zahl einer Blutmenge von 24 mL. Bei einer durchschnittlichen Zahl von 5×10^4 frei zugänglichen Integrinmolekülen je Thrombozyt entspricht die NMR-Probe einer Menge von 0.60 nmol Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$. Der D_2O -Anteil von 2.1 M in der NMR-Probe entspricht etwa 3.6 % und ergibt ein genügend intensives Signal im für den Deuteriumlock des Spektrometers. Um das Aggregationsvermögen der Thrombozyten zu kontrollieren, wurde das zweite aus dem Thrombozytenkonzentrat erhaltene Pellet mit 500 μL des gleichen Resuspensionspuffer versetzt, der allerdings kein cyclo(RGDSPA) enthielt. Hier wurde eine sofortige Aggregation und Ausflockung der Thrombozyten beobachtet.

Nach einer weiteren Thrombozytenpräparation aus 2×15 mL Thrombozytenkonzentrat wurde das erste Pellet in analoger Weise resuspendiert, wobei der Puffer diesmal 2.84 M D_2O und 1.4 mM AEBSF-HCl enthielt. Das RGD-Peptid cyclo(RGDSPA) wurde durch 925 μM PS-Hyp-GDW ersetzt. Wieder wurde die Thrombozytenaggregation durch den Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Liganden inhibiert. Diese verdünnte Zellsuspension enthielt ungefähr 9.8×10^9 Thrombozyten/mL, 1.8 M D_2O , 850 μM AEBSF-HCl und 584 μM PS-Hyp-GDW. In der NMR-Probe mit 600 μL dieser Suspension beträgt die Zellzahl ungefähr 5.9×10^9 . Diese Zahl entspricht bei einem durchschnittlichen Gehalt von 3×10^{11} Thrombozyten/L im menschlichem Blut einer Blutmenge von 20 mL. Bei einer durchschnittlichen Zahl von 5×10^4 frei zugänglichen Integrinmolekülen je Thrombozyt entspricht die NMR-Probe wiederum einer Menge von 0.5 nmol Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$. Der D_2O -Anteil von 1.8 M in der NMR-Probe entspricht etwa 3.3 %. Zur Kontrolle der Thrombozytenaggregation wurde wieder das zweite Thrombozytenpellet mit 500 μL des gleichen Resuspensionspuffer versetzt, der allerdings kein PS-Hyp-GDW enthielt. Hier wurde ebenfalls ein sofortiges Ausflocken der Thrombozyten beobachtet.

6.6. NMR-Messungen mit Liposomen, Thrombozyten und Peptiden

Die NMR-Spektren wurden an einem Bruker DRX 500 und an einem Avance 700 Spektrometer aufgenommen. Die Magneten besitzen eine magnetische Induktion von 11.67 Tesla (Larmor-Frequenz von 499.87 MHz für Protonen) bzw. 16.35 Tesla (Larmor-Frequenz von 700.13 MHz für Protonen). Beide Geräte sind mit einem inversen 5 mm Tripelresonanzprobenkopf mit einer Gradientenspule für Z-Gradienten ausgestattet. Für das

700 MHz-Spektrometer steht außerdem ein inverser 5 mm TXI-Cryoprobekopf mit Z-Gradienten zur Verfügung. Aufnahme, Prozessierung und Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Softwarepaket XWINNMR (Version 3.0 und 3.1) und AURELIA (Version 2.5.9) der Firma Bruker auf Silicon Graphics Workstations (O2, Octane).

Alle NMR-Experimente mit Liposomen oder Thrombozyten wurden bei möglichst niedriger Temperatur aufgenommen, um die Stabilität der Probe nicht zu gefährden. Es wurden Temperaturen zwischen 283 K und 285 K gewählt. Proben, die ausschließlich Ligandpeptide, Lipide oder andere niedermolekulare Komponenten enthielten, wurden bei 290 K bis 300 K vermessen.

Die Zuordnung der ^1H -chemischen Verschiebungen erfolgte mit Hilfe von 1D- ^1H -Experimenten, mit 2D-TOCSY-Spektren (Pulsprogramm *mlevgpph19*), mit 2D-NOESY-Spektren (Pulsprogramm *ngtp19v9.mm*) sowie mit 2D-COSY-Spektren (*cosygsmfprtp*). Die Solventunterdrückung wurde mittels Vorsättigung des HDO-Signals oder durch Anwendung der WATERGATE-Impulssequenz erreicht. Die 2D-Spektren wurden mit 512 Inkrementen in der F1-Dimension aufgenommen. Bei einer Spektrenweite von 10 ppm wurden 8 – 40 Scans mit jeweils 4096 Datenpunkten pro Inkrement akkumuliert. Alle Spektren wurden mittels TPPI phasensensitiv aufgenommen. Als Fensterfunktionen für die Fourier-Transformation wurden in beiden spektralen Dimensionen um 30 – 45 Grad verschobene Quadratsinusfunktionen eingesetzt.

Alle 1D-Protonenspektren wurden mit einer spektralen Weite von 10 – 12 ppm aufgenommen. Die Zahl der aufgenommenen Datenpunkte betrug 16383 oder 32786. Vor der Fourier-Transformation wurden die Primärdaten auf die doppelte Anzahl mit Nullen aufgefüllt und mit einer Exponentialfunktion multipliziert (Linienverbreiterung 0.3 – 5.0 Hz). Die Unterdrückung der Proteinresonanzen wurde über einen $T_{1\rho}$ -Filter, bestehend aus einem Spinlockpuls mit einer Länge von 30 – 80 ms erreicht. Als jeweilige Abschwächung wurde 13 – 15 dB gewählt.

Alle STD-NMR-Spektren wurden mit den Pulsprogrammen *std19sp* und *std19slsp* aufgenommen.¹⁴⁴ Für die Variante mit Spinlock wurde wieder eine Pulslänge von 30 – 80 ms bei einer Abschwächung von 13 – 15 dB gewählt. Für die Impulskaskade zur Sättigung wurden 20 – 40 Gauß-Impulse mit einer Dauer von 50 ms verwendet mit einer jeweiligen Wartezeit von 1 ms nach jedem Impuls. Daraus resultieren Gesamtsättigungszeiten von 1.02 – 2.04 s. Relative STD-Effekte wurden durch Intensitätsvergleich mit einem Referenzspektrum (Pulsprogramme *p3919gp* und *p3919gpsl.rm*) ohne Differenzbildung und ohne Sättigung bestimmt. Das Experiment wird jeweils mit identischen Akquisitionsparametern aufgenommen. Der Quotient aus der Scanzahl des Referenzexperimentes und der halben Scanzahl des STD-Experimentes fließt als Faktor in den relativen STD-Effekt ein. Die Anpassung von exponentiellen Funktionen an Messpunkte zum Sättigungsaufbau und zum Sättigungstransferaufbau wurde mit dem Programm ORIGIN 6.0 von Microcal durchgeführt.

6.7. Sicherheitshinweise

Substanzname	Gefahrensymbole	R-Sätze	S-Sätze
4-(2-Aminoethyl)- benzolsulfonylfluorid- Hydrochlorid	LD ₅₀ = 2.8 g/kg (oral, Maus)	---	---
Chloroform	Xn	22-38-40-48/ 20/22	36/37
Dimethylsulfoxid	Xi	36/38	26
Ethylendiamin- tetraessigsäure, Na ₂	Xn	22	---
Methanol	F, T	11-23/24/25-39/ 23/24/25	7-16-36/ 37-45
Natriumazid	T+, N	28-32-50/53	28.1-45-60-61
<i>tert</i> -Butanol	Xn	10-20	2-16
Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan	Xi	36/38	---
Triton X-100	Xn	22-36/41	23/26/36

7. Literatur

1. Stryer, L., *Biochemie*. Deutsche Ausgabe ed. 1994, Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
2. Singer, S. J. and Nicholson, G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731.
3. Bockaert, J. and Pin, J. P. (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J* **18**, 1723-1729.
4. Vassilatis, D. K., Hohmann, J. G., Zeng, H., Li, F., Ranchalis, J. E., Mortrud, M. T., Brown, A., Rodriguez, S. S., Weller, J. R., Wright, A. C., Bergmann, J. E., and Gaitanaris, G. A. (2003) The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4903-4908.
5. Levchenko, M. E., Katayama, T., and Kanehisa, M. Discovery and Classification of Peptide Family G-Protein Coupled Receptors in the Human Genome Sequence. in *Genome Informatics*. 2001.
6. Henderson, R., Baldwin, J. M., Ceska, T. A., Zemlin, F., Beckmann, E., and Downing, K. H. (1990) Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J Mol Biol* **213**, 899-929.
7. Subramaniam, S. and Henderson, R. (2000) Molecular mechanism of vectorial proton translocation by bacteriorhodopsin. *Nature* **406**, 653-657.
8. Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., and Miyano, M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**, 739-745.
9. Ketchum, R. R., Hu, W., and Cross, T. A. (1993) High-resolution conformation of gramicidin A in a lipid bilayer by solid-state NMR. *Science* **261**, 1457-1460.
10. Opella, S. J., Marassi, F. M., Gesell, J. J., Valente, A. P., Kim, Y., Oblatt-Montal, M., and Montal, M. (1999) Structures of the M2 channel-lining segments from nicotinic acetylcholine and NMDA receptors by NMR spectroscopy. *Nat Struct Biol* **6**, 374-379.
11. Salgado, J., Grage, S. L., Kondejewski, L. H., Hodges, R. S., McElhaney, R. N., and Ulrich, A. S. (2001) Membrane-bound structure and alignment of the antimicrobial β -sheet peptide gramicidin S derived from angular and distance constraints by solid state ¹⁹F-NMR. *J Biomol NMR* **21**, 191-208.
12. Fu, R. and Cross, T. A. (1999) Solid-state nuclear magnetic resonance investigation of protein and polypeptide structure. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **28**, 235-268.

LITERATUR

13. Thompson, L. K. (2002) Solid-state NMR studies of the structure and mechanisms of proteins. *Curr Opin Struct Biol* **12**, 661-669.
14. McDermott, A., Polenova, T., Bockmann, A., Zilm, K. W., Paulson, E. K., Martin, R. W., Montelione, G. T., and Paulsen, E. K. (2000) Partial NMR assignments for uniformly (¹³C, ¹⁵N)-enriched BPTI in the solid state. *J Biomol NMR* **16**, 209-219.
15. Pauli, J., van Rossum, B., Forster, H., de Groot, H. J., and Oschkinat, H. (2000) Sample optimization and identification of signal patterns of amino acid side chains in 2D RFDR spectra of the α spectrin SH3 domain. *J Magn Reson* **143**, 411-416.
16. Pauli, J., Baldus, M., van Rossum, B., de Groot, H., and Oschkinat, H. (2001) Backbone and side-chain ¹³C and ¹⁵N signal assignments of the α spectrin SH3 domain by magic angle spinning solid-state NMR at 17.6 Tesla. *Chembiochem* **2**, 272-281.
17. Glaubitz, C. and Watts, A. (1998) Magic angle-oriented sample spinning (MAOSS): A new approach toward biomembrane studies. *J Magn Reson* **130**, 305-316.
18. Watts, A., Ulrich, A. S., and Middleton, D. A. (1995) Membrane Protein Structure: the Contribution and Potential of Novel Solid State NMR Approaches (Review). *Mol Membrane Biol* **12**, 233-246.
19. Watts, A. (2002) Direct studies of ligand-receptor interactions and ion channel blocking (Review). *Mol Membr Biol* **19**, 267-275.
20. Fu, R., Tian, C., and Cross, T. A. (2002) NMR spin locking of proton magnetization under a frequency-switched Lee- Goldburg pulse sequence. *J Magn Reson* **154**, 130-135.
21. Patzelt, H., Ulrich, A. S., Ebringhoff, H., D \ddot{u} x, P., Ashurst, J., Simon, B., Oschkinat, H., and Oesterhelt, D. (1997) Towards structural investigations on isotope labelled native bacteriorhodopsin in detergent micelles by solution-state NMR spectroscopy. *J Biomol NMR* **10**, 95-106.
22. Arora, A., Abildgaard, F., Bushweller, J. H., and Tamm, L. K. (2001) Structure of outer membrane protein A transmembrane domain by NMR spectroscopy. *Nat Struct Biol* **8**, 334-338.
23. Arora, A. and Tamm, L. K. (2001) Biophysical approaches to membrane protein structure determination. *Curr Opin Struct Biol* **11**, 540-547.
24. Pervushin, K., Riek, R., Wider, G., and W \ddot{u} thrich, K. (1997) Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12366-12371.
25. Salzmann, M., Pervushin, K., Wider, G., Senn, H., and W \ddot{u} thrich, K. (1998) TROSY in triple-resonance experiments: new perspectives for sequential NMR assignment of large proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13585-13590.

26. Salzmann, M., Pervushin, K., Wider, G., Senn, H., and Wüthrich, K. (2000) NMR Assignment and Secondary Structure Determination of an Octameric 110 kDa Protein using TROSY in Triple Resonance Experiments. *J Am Chem Soc* **122**, 7543-7548.
27. Pervushin, K., Braun, D., Fernandez, C., and Wüthrich, K. (2000) [15N,1H]/[13C,1H]-TROSY for simultaneous detection of backbone 15N-1H, aromatic 13C-1H and side-chain 15N-1H2 correlations in large proteins. *J Biomol NMR* **17**, 195-202.
28. Chou, J. J., Delaglio, F., and Bax, A. (2000) Measurement of one-bond ¹⁵N-¹³C' dipolar couplings in medium sized proteins. *J Biomol NMR* **18**, 101-105.
29. Chou, J. J., Gaemers, S., Howder, B., Louis, J. M., and Bax, A. (2001) A simple apparatus for generating stretched polyacrylamide gels, yielding uniform alignment of protein and detergent micelles. *J Biomol NMR* **21**, 377-382.
30. Drews, J. (1996) Genomic sciences and the medicine of tomorrow. *Nat Biotechnol* **14**, 1516-1518.
31. Crump, M. P., Gong, J. H., Loetscher, P., Rajarathnam, K., Amara, A., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J. L., Baggiolini, M., Sykes, B. D., and Clark-Lewis, I. (1997) Solution structure and basis for functional activity of stromal cell- derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *Embo J* **16**, 6996-7007.
32. Axelrod, D. (2001) Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic* **2**, 764-774.
33. Kalb, E. and Engel, J. (1990) Binding of proteins to specific target sites in membranes measured by total internal reflection fluorescence microscopy. *Biochemistry* **29**, 1607-1613.
34. Cooper, M. A., Hansson, A., Lofas, S., and Williams, D. H. (2000) A vesicle capture sensor chip for kinetic analysis of interactions with membrane-bound receptors. *Anal Biochem* **277**, 196-205.
35. Cooper, M. A., Try, A. C., Carroll, J., Ellar, D. J., and Williams, D. H. (1998) Surface plasmon resonance analysis at a supported lipid monolayer. *Biochim Biophys Acta* **1373**, 101-111.
36. Masson, L., Mazza, A., and Brousseau, R. (1994) Stable immobilization of lipid vesicles for kinetic studies using surface plasmon resonance. *Anal Biochem* **218**, 405-412.
37. Brandish, P. E., Hill, L. A., Zheng, W., and Scolnick, E. M. (2003) Scintillation proximity assay of inositol phosphates in cell extracts: High-throughput measurement of G-protein-coupled receptor activation. *Anal Biochem* **313**, 311-318.

LITERATUR

38. Culliford, S. J., McCauley, P., Sutherland, A. J., McCairn, M., Sutherland, J., Blackburn, J., and Kozlowski, R. Z. (2002) A novel cell-based scintillation proximity assay for studying protein function and activity in vitro using membrane-soluble scintillants. *Biochem Biophys Res Commun* **296**, 857-863.
39. Martin, R. L., Renosto, F., and Segel, I. H. (1991) A simple method for calculating the dissociation constant of a receptor (or enzyme)-unlabeled ligand complex from radioligand displacement measurements. *Arch Biochem Biophys* **284**, 26-29.
40. Lund, J. (1981) Radioreceptor assay for benzodiazepines in biological fluids using a new dry and stable receptor preparation. *Scand J Clin Lab Invest* **41**, 275-280.
41. Albelda, S. M. and Buck, C. A. (1990) Integrins and other cell adhesion molecules. *Faseb J* **4**, 2868-2880.
42. Hynes, R. O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25.
43. Argraves, W. S., Suzuki, S., Arai, H., Thompson, K., Pierschbacher, M. D., and Ruoslahti, E. (1987) Amino acid sequence of the human fibronectin receptor. *J Cell Biol* **105**, 1183-1190.
44. Kunicki, T. J. (1990) The molecular biology of platelet membrane glycoproteins. *Transfus Med Rev* **4**, 91-97.
45. Gehlsen, K. R., Sriramarao, P., Furcht, L. T., and Skubitz, A. P. (1992) A synthetic peptide derived from the carboxy terminus of the laminin A chain represents a binding site for the $\alpha_3\beta_1$ integrin. *J Cell Biol* **117**, 449-459.
46. D'Souza, S. E., Ginsberg, M. H., and Plow, E. F. (1991) Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif. *Trends Biochem Sci* **16**, 246-250.
47. Faull, R. J. and Ginsberg, M. H. (1995) Dynamic regulation of integrins. *Stem Cells* **13**, 38-46.
48. Faull, R. J. and Ginsberg, M. H. (1996) Inside-out signaling through integrins. *J Am Soc Nephrol* **7**, 1091-1097.
49. Calvete, J. J. (1994) Clues for understanding the structure and function of a prototypic human integrin: the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex. *Thromb Haemost* **72**, 1-15.
50. Giancotti, F. G. (1999) Complexity and specificity of integrin signalling. *Nature Cell Biology* **2**, E13-E14.
51. Turner, C. E. (2000) Paxillin and focal adhesion signalling. *Nature Cell Biology* **2**, E231-E236.

LITERATUR

52. Calderwood, D. H. and Ginsberg, M. H. (2003) Integrin β cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: A structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2272-2277.
53. Zhang, X. A. and Hemler, M. E. (1999) Interaction of the integrin β_1 cytoplasmic domain with ICAP-1 protein. *J Biol Chem* **274**, 11-19.
54. Xiong, J. P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D. L., Joachimiak, A., Goodman, S. L., and Arnaout, M. A. (2001) Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_v\beta_3$. *Science* **294**, 339-345.
55. Springer, T. A. (1997) Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin α subunits into a β propeller domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 65-72.
56. Plow, E. F., Pierschbacher, M. D., Ruoslahti, E., Marguerie, G., and Ginsberg, M. H. (1987) Arginyl-glycyl-aspartic acid sequences and fibrinogen binding to platelets. *Blood* **70**, 110-115.
57. Kloczewiak, M., Timmons, S., Lukas, T. J., and Hawiger, J. (1984) Platelet receptor recognition site on human fibrinogen. Synthesis and structure-function relationship of peptides corresponding to the carboxy-terminal segment of the γ chain. *Biochemistry* **23**, 1767-1774.
58. Leahy, D. J., Aukhil, I., and Erickson, H. P. (1996) 2.0 Å crystal structure of a four-domain segment of human fibronectin encompassing the RGD loop and synergy region. *Cell* **84**, 155-164.
59. Pierschbacher, M. D., Ruoslahti, E., Sundelin, J., Lind, P., and Peterson, P. A. (1982) The cell attachment domain of fibronectin. Determination of the primary structure. *J Biol Chem* **257**, 9593-9597.
60. Bowditch, R. D., Hariharan, M., Tominna, E. F., Smith, J. W., Yamada, K. M., Getzoff, E. D., and Ginsberg, M. H. (1994) Identification of a novel integrin binding site in fibronectin. Differential utilization by β_3 integrins. *J Biol Chem* **269**, 10856-10863.
61. Aota, S., Nomizu, M., and Yamada, K. M. (1994) The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function. *J Biol Chem* **269**, 24756-24761.
62. Schulte, B. Darstellung und Untersuchung integrinbindender Peptide. Diplomarbeit Universität Hamburg (2002).
63. Gerritsen, W. J., Verkley, A. J., Zwaal, R. F., and Van Deenen, L. L. (1978) Freeze-fracture appearance and disposition of band 3 protein from the human erythrocyte membrane in lipid vesicles. *Eur J Biochem* **85**, 255-261.
64. Müller, B., Zerwes, H. G., Tangemann, K., Peter, J., and Engel, J. (1993) Two-step binding mechanism of fibrinogen to $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin reconstituted into planar lipid bilayers. *J Biol Chem* **268**, 6800-6808.

LITERATUR

65. Redick, S. D., Settles, D. L., Briscoe, G., and Erickson, H. P. (2000) Defining fibronectin's cell adhesion synergy site by site-directed mutagenesis. *J Cell Biol* **149**, 521-527.
66. McEver, R. P., Bennett, E. M., and Martin, M. N. (1983) Identification of two structurally and functionally distinct sites on human platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa using monoclonal antibodies. *J Biol Chem* **258**, 5269-5275.
67. Pidard, D., Montgomery, R. R., Bennett, J. S., and Kunicki, T. J. (1983) Interaction of AP-2, a monoclonal antibody specific for the human platelet glycoprotein IIb-IIIa complex, with intact platelets. *J Biol Chem* **258**, 12582-12586.
68. Newman, P. J., Allen, R. W., Kahn, R. A., and Kunicki, T. J. (1985) Quantitation of membrane glycoprotein IIIa on intact human platelets using the monoclonal antibody, AP-3. *Blood* **65**, 227-232.
69. Wagner, C. L., Mascelli, M. A., Neblock, D. S., Weisman, H. F., Coller, B. S., and Jordan, R. E. (1996) Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood* **88**, 907-914.
70. Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M. D. (1987) New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* **238**, 491-497.
71. Phillips, D. R., Charo, I. F., Parise, L. V., and Fitzgerald, L. A. (1988) The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* **71**, 831-843.
72. Lanza, F., Stierle, A., Fournier, D., Morales, M., Andre, G., Nurden, A. T., and Cazenave, J. P. (1992) A new variant of Glanzmann's thrombasthenia (Strasbourg I). Platelets with functionally defective glycoprotein IIb-IIIa complexes and a glycoprotein IIIa 214Arg / 214Trp mutation. *J Clin Invest* **89**, 1995-2004.
73. Honda, S., Tomiyama, Y., Pelletier, A. J., Annis, D., Honda, Y., Orzechowski, R., Ruggeri, Z., and Kunicki, T. J. (1995) Topography of ligand-induced binding sites, including a novel cation-sensitive epitope (AP5) at the amino terminus, of the human integrin β_3 subunit. *J Biol Chem* **270**, 11947-11954.
74. Li, R., Mitra, N., Gratkowski, H., Vilaire, G., Litvinov, R., Nagasami, C., Weisel, J. W., Lear, J. D., DeGrado, W. F., and Bennett, J. S. (2003) Activation of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ by modulation of transmembrane helix associations. *Science* **300**, 795-798.
75. Tranqui, L., Andrieux, A. H.-C., G., Ryckewaert, J.-J., Soye, S., Chapel, A., Ginsberg, M. H., Plow, E. F., and Marguerie, G. (1989) Differential structural requirements for fibrinogen binding to platelets and to endothelial cells. *J Cell Biol* **108**, 2519-2527.
76. Foster, M. R., Hornby, E. J., Brown, S., Kitchin, J., Hann, M., and Ward, P. (1993) Improved potency and specificity of Arg-Gly-Asp (RGD) containing peptides as fibrinogen receptor blocking drugs. *Thromb Res* **72**, 231-245.

LITERATUR

77. Pfaff, M., Tangemann, K., Müller, B., Gurrath, M., Müller, G., Kessler, H., Timpl, R., and Engel, J. (1994) Selective recognition of cyclic RGD peptides of NMR defined conformation by $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_V\beta_3$, and $\alpha_5\beta_1$ integrins. *J Biol Chem* **269**, 20233-20238.
78. Ali, F. E., Bennett, D. B., Calvo, R. R., Elliott, J. D., Hwang, S. M., Ku, T. W., Lago, M. A., Nichols, A. J., Romoff, T. T., Shah, D. H., and et al. (1994) Conformationally constrained peptides and semipeptides derived from RGD as potent inhibitors of the platelet fibrinogen receptor and platelet aggregation. *J Med Chem* **37**, 769-780.
79. Keenan, R. M., Callahan, J. F., Samanen, J. M., Bondinell, W. E., Calvo, R. R., Chen, L., DeBrosse, C., Eggleston, D. S., Haltiwanger, R. C., Hwang, S. M., Jakas, D. R., Ku, T. W., Miller, W. H., Newlander, K. A., Nichols, A., Parker, M. F., Southhall, L. S., Uzinskas, I., Vasko-Moser, J. A., Venslavsky, J. W., Wong, A. S., and Huffman, W. F. (1999) Conformational preferences in a benzodiazepine series of potent nonpeptide fibrinogen receptor antagonists. *J Med Chem* **42**, 545-559.
80. Kunicki, T. J. (1989) Platelet membrane glycoproteins and their function: an overview. *Blut* **59**, 30-34.
81. Savage, B., Bottini, E., and Ruggeri, Z. M. (1995) Interaction of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ with multiple fibrinogen domains during platelet adhesion. *J Biol Chem* **270**, 28812-28817.
82. Padoin, E., Alexandre, A., Cavallini, L., Polverino de Laureto, P., Rao, G. H., and Doni, M. G. (1996) Human platelet activation is inhibited by the occupancy of glycoprotein IIb/IIIa receptor. *Arch Biochem Biophys* **333**, 407-413.
83. Scarborough, R. M., Rose, J. W., Hsu, M. A., Phillips, D. R., Fried, V. A., Campbell, A. M., Nannizzi, L., and Charo, I. F. (1991) Barbourin. A GPIIb-IIIa-specific integrin antagonist from the venom of *Sistrurus m. barbouri*. *J Biol Chem* **266**, 9359-9362.
84. Scarborough, R. M., Rose, J. W., Naughton, M. A., Phillips, D. R., Nannizzi, L., Arfsten, A., Campbell, A. M., and Charo, I. F. (1993) Characterization of the integrin specificities of disintegrins isolated from American pit viper venoms. *J Biol Chem* **268**, 1058-1065.
85. Gan, Z. R., Gould, R. J., Jacobs, J. W., Friedman, P. A., and Polokoff, M. A. (1988) Echistatin. A potent platelet aggregation inhibitor from the venom of the viper, *Echis carinatus*. *J Biol Chem* **263**, 19827-19832.
86. Dennis, M. S., Henzel, W. J., Pitti, R. M., Lipari, M. T., Napier, M. A., Deisher, T. A., Bunting, S., and Lazarus, R. A. (1990) Platelet glycoprotein IIb-IIIa protein antagonists from snake venoms: evidence for a family of platelet-aggregation inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 2471-2475.
87. Saudek, V., Atkinson, R. A., and Pelton, J. T. (1991) Three-dimensional structure of echistatin, the smallest active RGD protein. *Biochemistry* **30**, 7369-7372.

LITERATUR

88. Scarborough, R. M., Naughton, M. A., Teng, W., Rose, J. W., Phillips, D. R., Nannizzi, L., Arfsten, A., Campbell, A. M., and Charo, I. F. (1993) Design of potent and specific integrin antagonists. Peptide antagonists with high specificity for glycoprotein IIb-IIIa. *J Biol Chem* **268**, 1066-1073.
89. Katada, J., Hayashi, Y., Sato, Y., Muramatsu, M., Takiguchi, Y., Harada, T., Fujiyoshi, T., and Uno, I. (1997) A novel peptide motif for platelet fibrinogen receptor recognition. *J Biol Chem* **272**, 7720-7726.
90. Hayashi, Y., Katada, J., Sato, Y., Igarashi, K., Takiguchi, Y., Harada, T., Muramatsu, M., Yasuda, E., and Uno, I. (1998) Discovery and structure-activity relationship studies of a novel and specific peptide motif, Pro-X-X-X-Asp-X, as a platelet fibrinogen receptor antagonist. *Bioorg Med Chem* **6**, 355-364.
91. Seymour, J. L., Henzel, W. J., Nevins, B., Stults, J. T., and Lazarus, R. A. (1990) Decorsin. A potent glycoprotein IIb-IIIa antagonist and platelet aggregation inhibitor from the leech *Macrobdella decora*. *J Biol Chem* **265**, 10143-10147.
92. Wang, X., Coons, L. B., Taylor, D. B., Stevens, S. E., Jr., and Gartner, T. K. (1996) Variabilin, a novel RGD-containing antagonist of glycoprotein IIb-IIIa and platelet aggregation inhibitor from the hard tick *Dermacentor variabilis*. *J Biol Chem* **271**, 17785-17790.
93. Campbell, B., Chuhran, C. M., Lefer, D. J., and Lefer, A. M. (1999) Cardioprotective effects of abciximab (ReoPro) in an isolated perfused rat heart model of ischemia and reperfusion. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* **21**, 529-534.
94. Phillips, D. R. and Scarborough, R. M. (1997) Clinical pharmacology of eptifibatide. *Am J Cardiol* **80**, 11B-20B.
95. Egbertson, M. S., Chang, C. T., Duggan, M. E., Gould, R. J., Halczenko, W., Hartman, G. D., Laswell, W. L., Lynch, J. J., Jr., Lynch, R. J., Manno, P. D., and et al. (1994) Non-peptide fibrinogen receptor antagonists. 2. Optimization of a tyrosine template as a mimic for Arg-Gly-Asp. *J Med Chem* **37**, 2537-2551.
96. Lincoff, A. M. (1998) Trials of platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists during percutaneous coronary revascularization. *Am J Cardiol* **82**, 36P-42P.
97. Haubner, R., Finsinger, D., and Kessler, H. (1997) Stereoisomeric Peptide Libraries and Peptidomimetics for Designing Selective Inhibitors of the $\alpha_v\beta_3$ Integrin for a New Cancer Therapy. *Angew Chem Int Ed* **36**, 1374-1389.
98. Goodman, S. L., Holzemann, G., Sulyok, G. A., and Kessler, H. (2002) Nanomolar small molecule inhibitors for $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_5$, and $\alpha_v\beta_3$ integrins. *J Med Chem* **45**, 1045-1051.
99. Dechantsreiter, M. A., Planker, E., Matha, B., Lohof, E., Holzemann, G., Jonczyk, A., Goodman, S. L., and Kessler, H. (1999) N-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective $\alpha_v\beta_3$ integrin antagonists. *J Med Chem* **42**, 3033-3040.

LITERATUR

100. Keenan, R. M., Miller, W. H., Kwon, C., Ali, F. E., Callahan, J. F., Calvo, R. R., Hwang, S. M., Kopple, K. D., Peishoff, C. E., Samanen, J. M., Wong, A. S., Yuan, C. K., and Huffman, W. F. (1997) Discovery of potent nonpeptide vitronectin receptor (α_{1Vb_3}) antagonists. *J Med Chem* **40**, 2289-2292.
101. Szoka, F., Olson, F., Heath, T., Vail, W., Mayhew, E., and Papahadjopoulos, D. (1980) Preparation of unilamellar liposomes of intermediate size (0.1-0.2 μm) by a combination of reverse phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim Biophys Acta* **601**, 559-571.
102. Lasic, D. D. (1998) Novel applications of liposomes. *Trends Biotechnol* **16**, 307-321.
103. Mimms, L. T., Zampighi, G., Nozaki, Y., Tanford, C., and Reynolds, J. A. (1981) Phospholipid vesicle formation and transmembrane protein incorporation using octyl glucoside. *Biochemistry* **20**, 833-840.
104. Stahn, R., Schafer, H., Kernchen, F., and Schreiber, J. (1998) Multivalent sialyl Lewis^x ligands of definite structures as inhibitors of E-selectin mediated cell adhesion. *Glycobiology* **8**, 311-319.
105. Papahadjopoulos, D., Allen, T. M., Gabizon, A., Mayhew, E., Matthay, K., Huang, S. K., Lee, K. D., Woodle, M. C., Lasic, D. D., Redemann, C., and et al. (1991) Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 11460-11464.
106. Meyer, O., Kirpotin, D., Hong, K., Sternberg, B., Park, J. W., Woodle, M. C., and Papahadjopoulos, D. (1998) Cationic liposomes coated with polyethylene glycol as carriers for oligonucleotides. *J Biol Chem* **273**, 15621-15627.
107. Caaveiro, J. M., Molina, A., Rodriguez-Palenzuela, P., Goni, F. M., and Gonzalez-Manas, J. M. (1998) Interaction of wheat α -thionin with large unilamellar vesicles. *Protein Sci* **7**, 2567-2577.
108. Phillips, W. T., Klipper, R. W., Awasthi, V. D., Rudolph, A. S., Cliff, R., Kwasiborski, V., and Goins, B. A. (1999) Polyethylene glycol-modified liposome-encapsulated hemoglobin: a long circulating red cell substitute. *J Pharmacol Exp Ther* **288**, 665-670.
109. Ladbroke, B. D. and Chapman, D. (1969) Thermal analysis of lipids, proteins and biological membranes. A review and summary of some recent studies. *Chem Phys Lipids* **3**, 304-356.
110. Papahadjopoulos, D., Poste, G., Schaeffer, B. E., and Vail, W. J. (1974) Membrane fusion and molecular segregation in phospholipid vesicles. *Biochim Biophys Acta* **352**, 10-28.
111. Hargreaves, W. R. and Deamer, D. W. (1978) Liposomes from ionic, single-chain amphiphiles. *Biochemistry* **17**, 3759-3768.

LITERATUR

112. MacDonald, R. C., MacDonald, R. I., Menco, B. P., Takeshita, K., Subbarao, N. K., and Hu, L. R. (1991) Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1061**, 297-303.
113. Anholt, R. R. (1988) Functional reconstitution of the olfactory membrane: incorporation of the olfactory adenylate cyclase in liposomes. *Biochemistry* **27**, 6464-6468.
114. Richard, P., Rigaud, J. L., and Graber, P. (1990) Reconstitution of CF0F1 into liposomes using a new reconstitution procedure. *Eur J Biochem* **193**, 921-925.
115. Hu, B., Finsinger, D., Peter, K., Guttenberg, Z., Barmann, M., Kessler, H., Escherich, A., Moroder, L., Bohm, J., Baumeister, W., Sui, S. F., and Sackmann, E. (2000) Intervesicle cross-linking with integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and cyclic-RGD-lipopeptide. A model of cell-adhesion processes. *Biochemistry* **39**, 12284-12294.
116. Devesa, F., Chams, V., Dinadayala, P., Stella, A., Ragas, A., Auboiroux, H., Stegmann, T., and Poquet, Y. (2002) Functional reconstitution of the HIV receptors CCR5 and CD4 in liposomes. *Eur J Biochem* **269**, 5163-5174.
117. Niu, L., Kim, J. M., and Khorana, H. G. (2002) Structure and function in rhodopsin: asymmetric reconstitution of rhodopsin in liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13409-13412.
118. Nishiya, T., Kainoh, M., Murata, M., Handa, M., and Ikeda, Y. (2002) Reconstitution of adhesive properties of human platelets in liposomes carrying both recombinant glycoproteins Ia/IIa and Ib α under flow conditions: specific synergy of receptor-ligand interactions. *Blood* **100**, 136-142.
119. Meyer, B. and Peters, T. (2003) NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors. *Angew Chem Int Ed* **42**, 864-890.
120. "Method for Detecting Biologically Active Compounds from Compound Libraries": Peters, T. and Meyer, B., German Pat. No. 19649359 (1996).
121. Meyer, B., Weimar, T., and Peters, T. (1997) Screening Mixtures for Biological Activity by NMR. *Eur J Biochem* **246**, 705-709.
122. Mayer, M. and Meyer, B. (2000) Mapping the Active Site of Angiotensin-Converting Enzyme by Transferred NOE Spectroscopy. *J Med Chem* **43**, 2093-2099.
123. Weimar, T. and Peters, T. (1994) Aleuria-aurantia-agglutinin erkennt unterschiedliche Konformationen des Saccharids α -L-Fuc-(1->6)- β -D-GlcNAc-OMe. *Angew Chem* **106**, 79-82.
124. Haselhorst, T., Espinosa, J. F., Jimenez-Barbero, J., Sokolowski, T., Kosma, P., Brade, H., Brade, L., and Peters, T. (1999) NMR Experiments Reveal Distinct Antibody-Bound Conformations of a Synthetic Disaccharide Representing a General

- Structural Element of Bacterial Lipopolysaccharide Epitopes. *Biochemistry* **38**, 6449-6459.
125. Shuker, S. B., Hajduk, P. J., Meadows, R. P., and Fesik, S. W. (1996) Discovering High-Affinity Ligands for Proteins: SAR by NMR. *Science* **274**, 1531-1534.
126. Hajduk, P. J., Gerfin, T., Boehlen, J.-M., Häberli, M., Marek, D., and Fesik, S. W. (1999) High-Throughput Nuclear Magnetic Resonance-Based Screening. *J Med Chem* **42**, 2315-2317.
127. Hajduk, P. J., Augeri, D. J., Mack, J., Mendoza, R., Yang, J., Betz, S. F., and Fesik, S. W. (2000) NMR-Based Screening of Proteins Containing ¹³C-Labeled Methyl Groups. *J Am Chem Soc* **122**, 7898-7904.
128. Dalvit, C., Pevarello, P., Tato, M., Veronesi, M., Vulpetti, A., and Sundström, M. (2000) Identification of Compounds with Binding Affinity to Proteins via Magnetization Transfer from Bulk Water. *J Biomol NMR* **18**, 65-68.
129. Chen, A. and Shapiro, M. J. (1998) NOE Pumping: A Novel NMR Technique for Identification of Compounds with Binding Affinity to Macromolecules. *J Am Chem Soc* **120**, 10258-10259.
130. Chen, A. and Shapiro, M. J. (2000) NOE Pumping. 2. A High-Throughput Method To Determine Compounds with Binding Affinity to Macromolecules by NMR. *J Am Chem Soc* **122**, 414-415.
131. Lin, M., Shapiro, M. J., and Wareing, R. (1997) Diffusion-Edited NMR-Affinity NMR for Direct Observation of Molecular Interactions. *J Am Chem Soc* **119**, 5249-5250.
132. Chen, A., Johnson, C. S. J., Lin, M., and Shapiro, M. J. (1998) Chemical Exchange in Diffusion NMR Experiments. *J Am Chem Soc* **120**, 9094-9095.
133. Gounarides, J. S., Chen, A., and Shapiro, M. J. (1999) Nuclear magnetic resonance chromatography: applications of pulse field gradient diffusion NMR to mixture analysis and ligand-receptor interactions. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **725**, 79-90.
134. Cayley, P. J., Albrand, J. P., Feeney, J., Roberts, G. C., Piper, E. A., and Burgen, A. S. (1979) Nuclear magnetic resonance studies of the binding of trimethoprim to dihydrofolate reductase. *Biochemistry* **18**, 3886-3895.
135. Hyde, E. I., Birdsall, B., Roberts, G. C., Feeney, J., and Burgen, A. S. (1980) Proton nuclear magnetic resonance saturation transfer studies of coenzyme binding to *Lactobacillus casei* dihydrofolate reductase. *Biochemistry* **19**, 3738-3746.
136. Kalman, J. R. and Williams, D. H. (1980) An NMR study of the interaction between the antibiotic ristocetin A and a cell wall peptide analog. Negative nuclear Overhauser effects in the investigation of drug binding sites. *J Am Chem Soc* **102**, 906-912.

LITERATUR

137. Clore, G. M., Roberts, G. C., Gronenborn, A. M., Birdsall, B., and Feeney, J. (1981) Transfer of saturation NMR studies of protein-ligand complexes. Three site exchange. *J Magn Reson* **45**, 151-161.
138. Boulat, B. and Rance, M. (1996) Selective transfer of magnetization by incoherent processes in nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Magn Reson B* **110**, 288-297.
139. Boulat, B., Epstein, D. M., and Rance, M. (1999) Selective Injection of Magnetization by Slow Chemical Exchange in NMR. *J Magn Reson* **138**, 268-276.
140. Forsen, S. and Hoffmann, R. A. (1963) Study of moderately rapid chemical exchange by means of nuclear magnetic resonance. *J Chem Phys* **39**, 2892-2901.
141. Forsen, S. and Hoffman, R. A. (1964) Exchange rates by nuclear magnetic resonance. III. Exchange reactions in systems with several nonequivalent sites. *J Chem Phys* **40**, 1189-1198.
142. Mayer, M. and Meyer, B. (1999) Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angew Chem Int Ed* **38**, 1784-1788.
143. Vogtherr, M. and Peters, T. (2000) Application of NMR Based Binding Assays to Identify Key Hydroxy Groups for Intermolecular Recognition. *J Am Chem Soc* **122**, 6093-6099.
144. Mayer, M. STD-NMR-Spektroskopie: Eine neue Methode zur Identifizierung und Charakterisierung von Ligand-Rezeptor-Interaktionen. Dissertation Universität Hamburg (2001).
145. Mayer, M. and Meyer, B. (2001) Group Epitope Mapping (GEM) by STD NMR to Identify Segments of a Ligand in Direct Contact with a Protein Receptor. *J Am Chem Soc* **123**, 6108-6117.
146. Maaheimo, H., Kosma, P., Brade, L., Brade, H., and Peters, T. (2000) Mapping the binding of synthetic disaccharides representing epitopes of chlamydial lipopolysaccharide to antibodies with NMR. *Biochemistry* **39**, 12778-12788.
147. Haselhorst, T., Weimar, T., and Peters, T. (2001) Molecular Recognition of Sialyl LewisX and Related Saccharides by Two Lectins. *J Am Chem Soc* **123**, 10705-10714.
148. Klein, J., Meinecke, R., Mayer, M., and Meyer, B. (1999) Detecting Binding Affinity to Immobilized Receptor Protein in Compound Libraries by HR-MAS NMR. *J Am Chem Soc* **121**, 5336-5337.
149. Scatchard, G. (1949) The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann N Y Acad Sci* **51**, 660-672.

LITERATUR

150. Meyer, B. (2003) Dependence of the STD effect on kinetic constants of the binding reaction and on NMR relaxation parameters. *Unveröffentlichte Ergebnisse*.
151. Jayalakshmi, V. and Krishna, N. R. (2002) Complete relaxation and conformational exchange matrix (CORCEMA) analysis of intermolecular saturation transfer effects in reversibly forming ligand-receptor complexes. *J Magn Reson* **155**, 106-118.
152. Zhou, Z., Sayer, B. G., Hughes, D. W., Stark, R. E., and Eppard, R. M. (1999) Studies of phospholipid hydration by high-resolution magic-angle spinning nuclear magnetic resonance. *Biophys J* **76**, 387-399.
153. Scherf, T. and Anglister, J. (1993) A $T_{1\rho}$ -filtered two-dimensional transferred NOE spectrum for studying antibody interactions with peptide antigens. *Biophys J* **64**, 754-761.
154. Piotto, M., Saudek, V., and Sklenar, V. (1992) Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J Biomol NMR* **2**, 661-665.
155. Sklenar, V., Piotto, M., Leppik, R., and Saudek, V. (1993) Gradient-Tailored Water Suppression for ^1H - ^{15}N HSQC Experiments Optimized to Retain Full Sensitivity. *J Magn Reson A* **102**, 241-245.
156. Liu, M., Mao, X., Ye, C., Huang, H., Nicholson, J. K., and Lindon, J. C. (1998) Improved WATERGATE Pulse Sequences for Solvent Suppression in NMR Spectroscopy. *J Magn Reson* **132**, 125-129.
157. Hwang, T. L. and Shaka, A. J. (1995) Water Suppression that works. Excitation Sculpting using arbitrary waveforms and pulsed field gradients. *J Magn Reson A* **112**, 275-279.
158. Aumailley, M., Gurrath, M., Muller, G., Calvete, J., Timpl, R., and Kessler, H. (1991) Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1. *FEBS Lett* **291**, 50-54.
159. Cantor, C. R. and Schimmel, P. R., *Biophysical Chemistry*. 1980, New York: W. H. Freeman and Company. 943.
160. Deschermeier, C. Molekulare Erkennung von Inositolphosphaten durch ihre Rezeptorproteine - Untersuchung von Struktur-Funktions Beziehungen am Beispiel der Inositol 1,4,5-trisphosphat 3-Kinase. Dissertation Universität Hamburg (2002).
161. Miyashita, M., Akamatsu, M., Ueno, H., Nakagawa, Y., Nishimura, K., Hayashi, Y., Sato, Y., and Ueno, T. (1999) Structure-activity relationships of RGD mimetics as fibrinogen-receptor antagonists. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**, 1684-1690.
162. Barker, P. L., Bullens, S., Bunting, S., Burdick, D. J., Chan, K. S., Deisher, T., Eigenbrot, C., Gadek, T. R., Gantzos, R., Lipari, M. T., and et al. (1992) Cyclic RGD peptide analogues as antiplatelet antithrombotics. *J Med Chem* **35**, 2040-2048.

LITERATUR

163. Xiong, J. P., Stehle, T., Zhang, R., Joachimiak, A., Frech, M., Goodman, S. L., and Arnaout, M. A. (2002) Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_v\beta_3$ in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* **296**, 151-155.
164. Serber, Z., Keatinge-Clay, A. T., Ledwidge, R., Kelly, A. E., Miller, S. M., and Dötsch, V. (2001) High-resolution macromolecular NMR spectroscopy inside living cells. *J Am Chem Soc* **123**, 2446-2447.
165. Meinecke, R. and Meyer, B. (2001) Determination of the Binding Specificity of an Integral Membrane Protein by Saturation Transfer Difference NMR: RGD Peptide Ligands Binding to Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *J Med Chem* **44**, 3059-3065.
166. Holloway, P. W. (1973) A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples. *Anal Biochem* **53**, 304-308.

8. Anhang

8.1. Pulsprogramme

zgprsl.rm

Dieses Pulsprogramm basiert auf dem Bruker-Pulsprogramm *zgpr*. Nach dem 90°-Impuls wurde ein Spinlockimpuls zur Unterdrückung breiter Resonanzen von Makromolekülen eingefügt (T_{1ρ}-Filter).¹⁵³

```
;zgprsl.rm
;avance-version
;1D sequence with f1 presaturation during relaxation delay d1
;with T1rho filter after 90 deg pulse (spinlock)
;for suppression of protein resonances
;T. Scherf & J. Anglister, Biophys. J. 64, 754-761 (1993)

#include <Avance.incl>

1 ze
2 20u p19:f1
  d1 cw:f1
  3u do:f1
  20u p11:f1
  p1 ph1
  20u p12:f1
  p2 ph2
  go=2 ph31
  wr #0
exit

ph1=0 2 2 0 1 3 3 1
ph2=1 3 1 3 2 0 2 0
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1

;*****POWER LEVEL*****
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f1 channel - power level for spin lock pulse(10-20 dB)
;p19 : f1 channel - power level for presaturation
;
;*****PULSE*****
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : spin lock pulse (10-100 ms, depending on the protein)
;
;*****DELAY*****
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
```

p3919gp

Dieses Pulsprogramm stammt aus der Bruker-Bibliothek.

```
;p3919gp
;avance-version (00/02/07)
;1D sequence
;water suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients
;M. Piotto, V. Saudek & V. Sklenar, J. Biomol. NMR 2, 661 - 666 (1992)
;V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik & V. Saudek, J. Magn. Reson.,
; Series A 102, 241 -245 (1993)

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
```

ANHANG

```
1 ze
2 d1 p11:f1
  p1 ph1
  50u UNBLKGRAD
  p16:gp1
  d16 p118:f1
  p27*0.231 ph3
  d19*2
  p27*0.692 ph3
  d19*2
  p27*1.462 ph3
  d19*2
  p27*1.462 ph4
  d19*2
  p27*0.692 ph4
  d19*2
  p0*0.231 ph4
  46u
  p16:gp1
  d16
  4u BLKGRAD
  go=2 ph31
  wr #0
exit

ph1=0 2
ph3=0 0 1 1 2 2 3 3
ph4=2 2 3 3 0 0 1 1
ph31=0 2 2 0

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p118: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate)
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at p118
;
;      use for fine adjustment
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p27: f1 channel - 90 degree pulse at p118
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
;      d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;NS: 8 * n
;DS: 4

;use gradient :
,gp 1: 20

;for z-only gradients:
,gpz1: 20%

;use gradient file:
,gpnam1: SINE.100

;$Id: p3919gp,v 1.8.2.1 2001/09/11 10:14:37 ber Exp $
```

p3919.rm

Dieses Pulsprogramm basiert auf dem Bruker-Pulsprogramm p3919gp. Die Gradientenimpulse und die Anweisungen zum Blanking der Gradientenspule wurden entfernt.

```
;p3919.rm
;avance-version

#include <Avance.incl>

1 ze
2 d1 p11:f1
```

ANHANG

```
p1 ph1
20u p118:f1
p28*0.231 ph3
d19*2
p28*0.692 ph3
d19*2
p28*1.462 ph3
d19*2
p28*1.462 ph4
d19*2
p28*0.692 ph4
d19*2
p0*0.231 ph4
46u
go=2 ph31
wr #0
exit
```

```
ph1=0 2
ph3=0 0 1 1 2 2 3 3
ph4=2 2 3 3 0 0 1 1
ph31=0 2 2 0
```

```
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p118: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate)
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at p118
;
; use for fine adjustment
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p28: f1 channel - 90 degree pulse at p118
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d19: delay for binomial water suppression
; d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;NS: 8 * n
;DS: 4
```

w5gp.rm

Dieses Pulsprogramm basiert auf dem Bruker-Pulsprogramm p3919gp. Das 3-9-19-Impulsarray wurde ersetzt durch das W5-Impulsarray, das sich auch im Bruker-Pulsprogramm zggpw5 findet.¹⁵⁶ Die Blanking-Anweisungen wurden umgestellt analog zum Bruker-Pulsprogramm zgesgp.

```
;w5gp.rm
;avance-version
;1D sequence
;water suppression using w5 pulse sequence with gradients
;using single gradient echo
;M. Liu, X. Mao, C. Ye, H. Huang, J. K. Nicholson & J. C. Lindon
; J. Magn. Reson. 132, 125 - 129 (1998)
```

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
```

```
1 ze
2 4u BLKGRAD
d1 p11:f1
p1 ph1
50u UNBLKGRAD
p16:gp1
d16 p118:f1
p28*0.0867 ph3
d19*2
p28*0.2056 ph3
d19*2
p28*0.4133 ph3
d19*2
p28*0.7822 ph3
d19*2
```

ANHANG

```
p28*1.4911 ph3
d19*2
p28*1.4911 ph4
d19*2
p28*0.7822 ph4
d19*2
p28*0.4133 ph4
d19*2
p28*0.2056 ph4
d19*2
p0*0.0867 ph4
46u
p16:gp1
d16
go=2 ph31
wr #0
4u BLKGRAD
exit

ph1=0 2
ph3=0 0 1 1 2 2 3 3
ph4=2 2 3 3 0 0 1 1
ph31=0 2 2 0

;*****POWER LEVEL*****
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p118: f1 channel - power level for w5-pulse (watergate)
;
;*****PULSE*****
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at p118
;
;      use for fine adjustment
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse (1ms)
;p28: f1 channel - 90 degree pulse at p118
;
;*****DELAY*****
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d16: delay for homospoil/gradient recovery (100...500us)
;d19: delay for binomial water suppression
;      d19 = (1/(2*d)), d = distance of next nulls (in Hz)
;NS: 8 * n
;DS: 4...16
;
;*****GRADIENT*****
;gp1: z-only gradient pulse (20%)
;gpnam1: gradient shapefile (SINE.100)
```

zgw5esgp.rm

Dieses Pulsprogramm basiert auf dem Bruker-Pulsprogramm *zggpw5*. Die Blanking-Anweisungen wurden umgestellt analog zum Bruker-Pulsprogramm *zgesgp*.

```
;zgw5esgp.rm
;avance-version
;1D sequence
;water suppression using watergate W5 pulse sequence with gradients
;and double echo (dpfgse, excitation sculpting)
;M. Liu, X. Mao, C. He, H. Huang, J.K. Nicholson & J.C. Lindon,
; J. Magn. Reson. 132, 125 - 129 (1998)

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>

1 ze
2 4u BLKGRAD
   d1 p11:f1
   p1 ph1
```

ANHANG

```

50u UNBLKGRAD
p16:gp1
d16 p118:f1
p28*0.0867 ph3
d19*2
p28*0.2056 ph3
d19*2
p28*0.4133 ph3
d19*2
p28*0.7822 ph3
d19*2
p28*1.4911 ph3
d19*2
p28*1.4911 ph4
d19*2
p28*0.7822 ph4
d19*2
p28*0.4133 ph4
d19*2
p28*0.2056 ph4
d19*2
p0*0.0867 ph4
50u
p16:gp1
d16
4u
p16:gp2
d16
p28*0.0867 ph5
d19*2
p28*0.2056 ph5
d19*2
p28*0.4133 ph5
d19*2
p28*0.7822 ph5
d19*2
p28*1.4911 ph5
d19*2
p28*1.4911 ph6
d19*2
p28*0.7822 ph6
d19*2
p28*0.4133 ph6
d19*2
p28*0.2056 ph6
d19*2
p0*0.0867 ph6
50u
p16:gp2
d16
go=2 ph31
wr #0
4u BLKGRAD
exit

ph1=0 2
ph3=0 0 1 1 2 2 3 3
ph4=2 2 3 3 0 0 1 1
ph5=0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1
    2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3
ph6=2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3
    0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1
ph31=0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p118: f1 channel - power level for w5-pulse (watergate)
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at p118
;
;      use for fine adjustment
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p16: gradient pulse (1ms)
;p28: f1 channel - 90 degree pulse at p118
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d16: delay for gradient recovery (100-500us)
;d19: delay for binomial water suppression
;      d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)

```

ANHANG

```
;NS: 32 * n
;DS: 8

;use gradient ratio:      gp 1      :      gp 2
;          34%           :      22%
;          (c.f. pulseprogram zgppw5)
;          31%           :      11%
;          (c.f. pulseprogram zgesgp)
;          7.5 G/cm      :      4.5 G/cm
;          (c.f. parella_virgili98_mrc36_245_249)
;          5.0 G/cm      :      3.5 G/cm

;for z-only gradients:
;gpz1: 34%
;gpz2: 22%

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
```


Lebenslauf

Name Robert Meinecke

Geburtsort Hamburg

Geburtsdatum 12. November 1967

Schulbesuch

6/1974 – 6/1979 Grundschule in Hamburg, Essen und Bremen

6/1979 – 5/1987 Gymnasium Voßhagen in Hamburg (Abitur)

Zivildienst

9/1987 – 4/1989 Zivildienst

Studium

10/1989 – 9/1998 Chemiestudium an der Universität Hamburg
Studienschwerpunkt: Organische Chemie
Wahlpflichtfach: Technische und Makromolekulare Chemie

7/1992 Vordiplom

11/1997 Diplomprüfung

1/1998 – 9/1998 Diplomarbeit bei Prof. B. Meyer, Universität Hamburg
Titel: "Saccharidbindung an immobilisierte Lektine –
NMR-spektroskopische Untersuchung mit 1D-Saturation
Transfer- und 2D-NOESY-Methoden"

ab 1/1999 Promotion unter der Anleitung von Prof. B. Meyer am Institut
für Organische Chemie, Universität Hamburg
Thema: "STD-NMR-Spektroskopie zur Untersuchung
der Bindungsspezifität des integralen Membranproteins
Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf Liposomen und auf intakten Thrombozyten"

Veröffentlichungen

- 1999 Klein, J.; Meinecke, R.; Mayer, M.; Meyer, B., Detecting Binding Affinity to Immobilized Receptor Protein in Compound Libraries by HR-MAS NMR. Journal of the American Chemical Society 1999, 121, 5336–5337
- 2001 Meinecke, R.; Meyer, B., Determination of the Binding Specificity of an Integral Membrane Protein by Saturation Transfer Difference NMR: RGD Peptide Ligands Binding to Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Journal of Medicinal Chemistry 2001, 44, 3059–3065

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.