

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine neue und leistungsfähige Methode zur Identifizierung und Charakterisierung von Ligand-Rezeptor-Interaktionen mit NMR-Spektroskopie entwickelt.

Die Differenz zwischen einem normalen NMR-Spektrum und einem Spektrum, das mit einer selektiven Sättigung des Rezeptors aufgenommen wurde, liefert ein Sättigungstransfer-Differenz (STD)-NMR-Spektrum. Diese 1D oder 2D STD-NMR-Spektren enthalten nur NMR-Signale von Molekülen, die während der Sättigungsdauer Kontakt zum Rezeptor hatten. Somit sind diese Spektren sehr gut zur Aufklärung von Bindungsprozessen geeignet. Alle Signale nicht-bindender Moleküle werden über die Differenzbildung ausgelöscht, daher können selbst aus Substanzmischungen eindeutig diejenigen Moleküle identifiziert werden, die an den Rezeptor binden.

Zunächst wurden 1D und 2D STD-NMR-Experimente zum Screening eingesetzt. Die erhaltenen Spektren lieferten den Nachweis, dass in einer Mischung aus dem Lektin *Wheat germ* Agglutinin (WGA) und sieben Sacchariden einzig das in der Probe enthaltene *N*-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) ein Ligand für den Rezeptor ist. Selbst in den Bereichen, die im normalen NMR-Spektrum der Mischung überlagert waren, lassen sich im STD-NMR-Spektrum nur die Ligandensignale beobachten. Dies ist ein klarer Vorteil gegenüber den üblichen Screening-Verfahren, die keinerlei Möglichkeit zur direkten Identifizierung von Substanzen aus Mischungen haben. Die Erweiterung dieser Methode auf 2D Experimente wurde anhand eines 2D STD-TOCSY-Spektrums demonstriert. Auch in dem 2D Spektrum wurden nur Signale des bindenden Saccharids *N*-Acetyl-D-glucosamin beobachtet. Diese 2D STD-NMR-Experimente führen bei komplexen Mischungen bzw. Liganden zu einer deutlichen Vereinfachung der Auswertung.

Bei der Untersuchung einer weiteren Mischung aus 16 Sacchariden in Gegenwart des Lektins *Aleuria aurantia* Agglutinin, lieferte auch hier ausschliesslich die bindende Komponente Methyl- α -L-fucosid STD-Signale. Mit dieser Probe wurde zusätzlich zu dem 2D STD-TOCSY-Experiment ein 2D STD-HSQC-Spektrum aufgenommen. Die Erweiterung der Methode auf heteronukleare NMR-Experimente ermöglicht die Identifizierung von Substanzen, die auf der Protonenskala stark überlagert sind. Anhand von drei in der ^1H -Dimension überlagerten Signalen der

Fucose wurde demonstriert, dass die Signale über ihre ^{13}C -chemischen Verschiebungen in der zweiten Dimension eindeutig identifiziert werden konnten.

Weiter wurde gezeigt, dass gegenüber den üblichen NMR-Screening-Methoden die benötigte Proteinmenge deutlich reduziert werden kann. 1 nmol (18 μg) des Lektins WGA reichten aus, um innerhalb von einer Stunde auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer ein STD-NMR-Spektrum des bindenden Liganden *N*-Acetyl-D-glucosamin aufzunehmen. Durch den Einsatz der neuen Cryo-Probenköpfe oder der sogenannten Nano-Probenköpfe wird die benötigte Menge an Rezeptor und Ligand weiter um mindestens eine Potenz reduzierbar sein.

Die maximale Bibliotheksgröße, die über die STD-NMR-Spektren analysiert werden kann, hängt hauptsächlich von der Anzahl und der Konzentration der in der Mischung enthaltenen bindungsaktiven Substanzen ab. Der Bereich an Dissoziationskonstanten, der mit STD-NMR-Spektren effizient untersuchbar ist, liegt mindestens zwischen 10^{-3} und 10^{-7} M. Dieses Verfahren ist daher besonders in den frühen Screening Phasen einzusetzen. Auch lagen die in dieser Arbeit analysierten Liganden, mit einem Molekulargewicht zwischen 200 – 1800 Da, exakt in dem Bereich, der für potentielle Wirkstoffe anvisiert wird.

Vier Galactose-haltige Saccharide wurden in Gegenwart des Lektins *Ricinus communis* Agglutinin (RCA_{120}) untersucht. Im STD-NMR-Spektrum haben Ligandensignale von Protonen, die nahe an der Oberfläche des Rezeptors liegen, verglichen mit Protonen, die weiter entfernt sind, eine höhere Intensität. Die STD-NMR-Spektren zeigten, dass die Spezifität von RCA_{120} eindeutig dem nicht-reduzierenden Ende der Monosaccharide Methyl- α -D-galactosid (α -GalOMe) und Methyl- β -D-galactosid (β -GalOMe) gilt. Die H2-, H3- und H4-Protonen wurden am stärksten gesättigt während die STD-Signale des anomeren Protons und der *O*-Methylgruppe nur kleine STD-Signale erreichten. Somit ist es möglich, selbst innerhalb eines kleinen Liganden diejenigen Regionen zu bestimmen, die massgeblich an der Bindung zum Rezeptor beteiligt sind. Die anderen beiden untersuchten Saccharide, *N*-Acetyl-lactosamin (LacNAc) und das biantennäre Komplex-Typ-Decasaccharid (NA_2), haben eine höhere Affinität zu RCA_{120} als die beiden Monosaccharide. Auch hier wurden die terminalen Galactosen am stärksten gesättigt. Weiter wurde gezeigt, dass die Protonen H2, H3 und H4 des benachbarten GlcNAc-Restes STD-Signale von ca. 60 - 70% relativ zu den STD-Signalen des am stärksten gesättigten H3-Protons der

Galactose aufwiesen. Diese Region von LacNAc und NA₂ hat somit direkten Kontakt zum Lektin.

Eine Klassifizierung der Liganden gemäss ihrer Affinität ist mittels STD-NMR-Titrationsexperimenten gut durchführbar. Die Grösse und der Verlauf der STD-Titrationskurve zeigte eine sehr gute qualitative Übereinstimmung mit den ebenfalls an diesen Sacchariden durchgeführten *surface plasmon resonance* (SPR)-Untersuchungen. Sowohl SPR- als auch STD-NMR-Analysen zeigten, dass die Affinität des Lektins RCA₁₂₀ gegenüber den Liganden in der Reihe α -GalOMe < β -GalOMe < LacNAc < NA₂ steigt. Schwach bindende Liganden erreichten dabei aufgrund ihrer höheren Austauschkinetik – und somit besseren Sättigungseffizienz – grosse absolute STD-Signale. Die verminderte Austauschkinetik bei starken Bindern hingegen bewirkt, dass die STD-Signale kleiner sind, wodurch auch die Empfindlichkeit des STD-NMR-Experiments sinkt. Weiter wurde gezeigt, dass ein hoher Überschuss an Ligand die Analyse der STD-NMR-Spektren erleichtert, da die Unterschiede zwischen den stark und schwach bindenden Regionen mit der Erhöhung des Überschusses zunehmen. Da bei hohen Überschüssen die absoluten STD-Signale grösser werden, ist auch aus diesem Grund ein hoher Ligandenüberschuss vorteilhaft.

Über STD-NMR-Kompetitionsexperimente konnte bewiesen werden, dass die Bindung des Lektins an Galactose-haltige Saccharide spezifisch ist, da sie sich gegenseitig aus der Bindungstasche verdrängen. Bei bekanntem K_D -Wert eines der beiden Binder, lässt sich aus den Competitionsexperimenten der K_I -Wert des anderen bestimmen. Abweichend zu Literaturwerten, zeigten die aus den STD-NMR-Experimenten erhaltenen Daten, dass NA₂ in Lösung kein im Nanomolaren Bereich bindender Ligand ist, sondern einen K_D -Wert von 2.6×10^{-5} M hat, was in Einklang zu den SPR-Daten steht.

STD-NMR-Spektren bieten somit auch in der Optimierungsphase der Leitstruktur ein effizientes Hilfsmittel. Mit ihnen lässt sich, wie von mir anhand der RCA₁₂₀-Saccharid-Komplexe gezeigt, schnell und auf atomarer Ebene das Bindungsepitop von Liganden bestimmen. Ferner können mit Titrations- und Competitionsexperimenten die Affinität und Spezifität der Liganden charakterisiert werden. Diese Informationen sind für eine gerichtete Optimierung von Leitstrukturen von grosser Bedeutung.

6 Summary

A new and efficient method for identification and characterization of ligand-receptor-interactions by NMR-spectroscopy was developed in this work.

The difference of a normal NMR spectrum and a NMR spectrum which was recorded with selective saturation of the receptor, yields a saturation transfer difference (STD) NMR spectrum. These 1D and 2D STD NMR experiments contain only NMR signals of molecules which had contact to the receptor during the saturation period. Therefore these spectra are particularly suited to detect binding processes. All signals of non-binding molecules are subtracted in the difference NMR spectra. This allows for an unambiguous identification of molecules binding to the receptor even from compound mixtures.

1D and 2D STD NMR spectra were used for screening of substance libraries. The obtained STD NMR spectra proved, that of the seven saccharides contained in the sample, only *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) binds to the lectin *wheat germ* agglutinin. Even in the regions of the normal 1D NMR spectra which are convoluted, the STD NMR spectra showed exclusively signals of the binding molecule. This is a clear advantage in comparison to the normally used screening methods, which have no means to directly identify the binding compound from a library. The extension of this method to 2D NMR spectra was demonstrated by the acquisition of a 2D STD TOCSY spectrum. This 2D STD NMR spectrum also contained only resonances originating from the binding saccharide *N*-acetylglucosamine. This additional option of acquiring 2D STD NMR spectra is especially useful for analyzing complex mixtures or ligands.

The analysis of another mixture of 16 saccharides in presence of the lectin *Aleuria aurantia* agglutinin revealed, that also in this case only the binding component of the mixture methyl- α -L-fucoside yields STD signals. With this sample, in addition to the 2D STD TOCSY spectrum, we also recorded a 2D STD HSQC spectrum. The application of this method to heteronuclear NMR experiments enables the identification of substances which have overlapping signals in the ^1H -dimension. As an example, three protons of the fucose which could not be unambiguously identified in the homonuclear STD spectra, were analyzed by their ^{13}C chemical shifts in the second dimension.

I could further show that compared to other NMR-based screening techniques the amount of receptor needed can be considerably reduced. Only 1 nmol (18 μg) of the lectin WGA were sufficient to record a 1D STD NMR spectrum of the binding ligand *N*-acetylglucosamine within 1 hour on a 500 MHz NMR spectrometer. The implementation of the new cryo-probeheads or the so called nano-probeheads will lead to a further reduction of the amount of receptor and ligand needed by an additional order of magnitude.

The size of the compound library which can be analyzed by STD NMR spectra, is primarily dependent on the number of binding ligands and their concentration in the NMR sample. The range of dissociation constants which can be efficiently studied by STD NMR spectra is at least between 10^{-3} and 10^{-7} M. This method can therefore be effectively applied to the early screening phases, where low affinity ligands are frequent. Also, the molecular weights of the ligands studied in this work range from 200 – 1800 Da. This is exactly the regime which is sought after in potential lead substances and drug candidates.

Four galactose containing saccharides were studied in presence of the lectin *Ricinus communis* agglutinin (RCA_{120}). In STD NMR spectra the ligand resonances of protons which are in close contact to the receptor have a higher STD signal intensity compared to the STD signals of protons which are at a larger distance. The STD NMR spectra showed, that the specificity of RCA_{120} is directed towards the non-reducing end of the monosaccharides methyl- α -D-galactoside (α -GalOMe) and methyl- β -D-galactoside (β -GalOMe). The NMR signals of the H2, H3 and H4 protons were saturated to the highest degree in the STD NMR spectra, whereas those of the anomeric proton and the *O*-methyl group had the smallest STD signals. Therefore it is possible to determine the regions which are crucial for the binding interactions even within a small ligand. The other two studied ligands, *N*-acetylglucosamine (LacNAc) and the biantennary complex-type deca-saccharide (NA_2), have a higher affinity towards RCA_{120} than the two monosaccharides. As with the monosaccharides, the studies showed, that the signals corresponding to the terminal galactoses are saturated to the highest degree. In addition, the H2, H3 and H4 protons of the adjacent GlcNAc residue had STD intensities of ca. 60 – 70% of the value reached by the H3 proton of the galactose – the proton with the highest degree of saturation. Therefore this region of LacNAc and NA_2 also has direct contact to the lectin.

STD NMR titration experiments allowed a ranking of the ligands according to their binding affinity. The size and progression of the STD titration curves showed a very good qualitative agreement to the surface plasmon resonance (SPR) experiments which were also conducted with these saccharides. Both, the SPR, and the STD NMR experiments revealed that the affinity of the lectin RCA₁₂₀ increases in the following order: α -GalOMe < β -GalOMe < LacNAc < NA₂. Weakly binding ligands reach higher absolute STD signal intensities due to their higher turnover number, which results in a better saturation efficiency. The reduced exchange kinetics of the higher affinity ligands yields smaller STD signals which also decreases the sensitivity of the STD NMR experiment. It was also shown, that a high ligand excess results in more pronounced differences in the STD intensities of strongly and weakly interacting regions of the ligand, leading to an easier interpretation of these spectra. Since the absolute STD signal intensity also increases with the ligand excess, these conditions are of advantage for recording STD NMR spectra.

By conducting STD NMR competition experiments I could prove that binding of the galactose-containing saccharides to RCA₁₂₀ is specific, since they displace one another from the binding site. If the K_D value of one of the ligands is known, the K_I value of the other ligand can be determined from the competition experiments. Diverging from the literature data, the STD NMR experiments showed, that NA₂ is not a ligand with nanomolar affinity in solution, but rather has a K_D value of 2.6×10^{-5} M, which is in agreement to the SPR data.

Therefore STD NMR spectra provide a valuable tool in the optimization phase of a potential lead structure. The binding epitope of a ligand can be determined at an atom level, as was shown for the RCA₁₂₀-saccharide-complex. Moreover, the use of STD NMR titration and competition experiments yields the affinity and specificity of the ligand. This information is very important for a directed optimization of lead structures.