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 Enwicklung 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 Bindungsepitop des Ligandmoleküls und damit zu seinen pharmakophoren Gruppen.

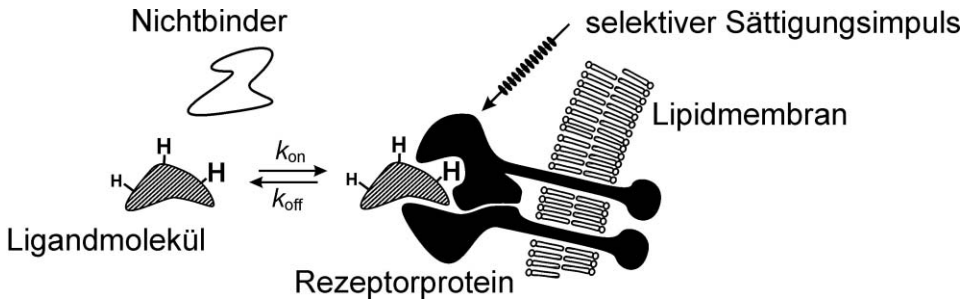

Abbildung 46 STD-NMRSpektroskopie:
Detektion eines Liganden mit Bioaffinität zu einem Membranprotein.

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 Kompetitionsexperimenten 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 $K_D = 24$ μM eine mehr als 40-fach höhere Affinität zum Rezeptor als RGD.[77, 100, 158] In weiteren Kompetitionsexperimenten an den Integrin-liposomen 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 $K_D = 24$ μM wurde eine Inhibitionskonstante für RGDS von $K_I = 116$ μM berechnet. Demzufolge hat der Ligand cyclo(RGDfV) eine 4.8-fach größere Affinität zum Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ 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 Hα, Arg Hβ/Hγ, D-Phe Hβ, D-Phe Hδ, D-Phe Hε/Hζ und Val Hγ/Hγ' 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 Hα- und Arg Hβ/Hγ-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 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 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 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 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 $\alpha_{IIb}\beta_3$-Bindungsstellen

zeigte im STD-Spektrum neben einigen sehr breiten Resonanzen von Zellbestandteilen nur die Signale des Liganden. Diese STD-Signale sind auf die spezifischen 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 Kontrollexperimenten 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 enhält dann das ursprüngliche Citratplasma mit einem hohen Anteil an Wasser, Glucose und anderen niedermolekularen Verbindungen. Trotz vieler Signalüberlagerungen im ^{1}H-Spektrum konnten mit dem Ligandpeptid cyclo(RGDfV) eindeutige STD-Effekte für die Resonanzen der Protonen Val Hγ/Hγ' 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 desireable.

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

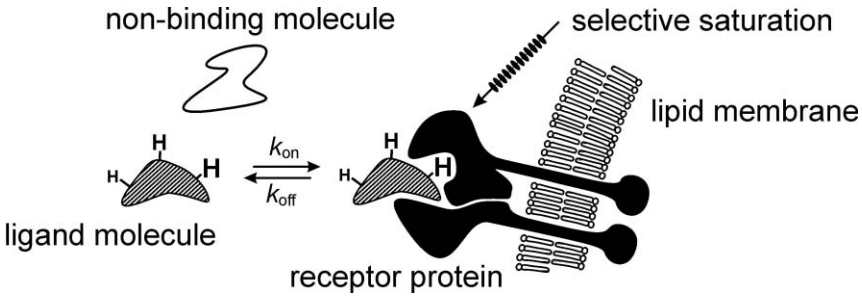

Figure 47 **STD-NMR spectroscopy:**
Detection of molecules with binding affinity to a membrane protein.

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 lipidvesicles (liposomes) according to a modified published procedure.[63, 64] The aminoacid 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 $K_D = 24\ \mu M$.[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 μM) an inhibition constant for RGDS of K_I = 116 μM 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 Hα, Arg Hβ/Hγ, D-Phe Hβ, D-Phe Hδ, D-Phe Hε/Hζ and Val Hγ/Hγ'. 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 Hα, Hβ/Hγ, 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

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 Hγ/Hγ'. 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 extremly 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.